

การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction ร่วมกับแผ่นทดสอบ
Dipstick chromatography เพื่อใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่สัมพันธ์กับ
การดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION
COMBINED WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY STRIP FOR DIAGNOSIS OF *katG* AND
inhA MUTATIONS ASSOCIATED WITH ISONIAZID RESISTANCE IN *Mycobacterium*
tuberculosis



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 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-
polymerase chain reaction ร่วมกับแผ่นทดสอบ
Dipstick chromatography เพื่อใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์
ของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา
Isoniazid ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

โดย

น.ส.นवलนภา จรจำรัส

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์
และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์)

นวนลภา จรจรัส : การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เพื่อใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*. (DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION COMBINED WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY STRIP FOR DIAGNOSIS OF *katG* AND *inhA* MUTATIONS ASSOCIATED WITH ISONIAZID RESISTANCE IN *Mycobacterium tuberculosis*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาทัน รุ่งวงศ์จิรกุล

เชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรค ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขทั้งในประเทศไทยและในระดับโลก โดยเฉพาะเมื่อโรคพัฒนาสู่ภาวะวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant Tuberculosis: MDR-TB) ยา Isoniazid เป็นหนึ่งในยาขนานแรกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาผู้ป่วยวัณโรค ดังนั้นการดื้อยา Isoniazid จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรค และยิ่งพบว่าผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid มีโอกาสสูงที่จะพัฒนาไปเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และมีโอกาสในการรักษาสำเร็จที่ลดลง สาเหตุหลักของการดื้อยา Isoniazid จากการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ตามลำดับ การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เพื่อใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ผลการทดสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography มีความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 91.67% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบทางพีโนไทป์ ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ณ ตำแหน่งโคดอน 315 มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 99.28% ตามลำดับ และในการตรวจหายีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 99.51% ตามลำดับ โดยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography มีความสอดคล้องในระดับดีมากกับทุกเทคนิคที่นำมาเปรียบเทียบ เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography สามารถตรวจพบความเข้มข้นน้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบของยีน *IS1081* และการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เท่ากับ 2 ng และการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เท่ากับ 20 ng ทั้งนี้เทคนิคดังกล่าว ไม่ทำปฏิกิริยาร่วมกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนการทดสอบไม่ซับซ้อน อาศัยเพียงเครื่อง Thermocycler ทำให้มีการเพิ่มปริมาณอย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพ ร่วมกับการอ่านผลด้วยตาเปล่าอย่างรวดเร็ว ทำให้ใช้เวลาในการทดสอบทั้งหมดสั้นลง ทั้งนี้ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการพัฒนาปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อาศัยอุณหภูมิคงที่ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตบนแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เพื่อให้ได้เทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะอย่างสมบูรณ์ และสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยา Isoniazid สำหรับงานภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ ซึ่งจะช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
	ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2563	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076761137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Mycobacterium tuberculosis, Isoniazid, Multiplex Allele Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR), KatG, inhA, Dipstick Chromatography

Nualnapa Chornchomrat : DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE SPECIFIC-POLYMERASE CHAIN REACTION COMBINED WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY STRIP FOR DIAGNOSIS OF *katG* AND *inhA* MUTATIONS ASSOCIATED WITH ISONIAZID RESISTANCE IN *Mycobacterium tuberculosis*. Advisor: Asst. Prof. Dr. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL

Mycobacterium tuberculosis is a bacterium causing tuberculosis (TB), a staggering health country and global impacts, especially when the disease became multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Isoniazid is one of the most potent anti-TB first-line drugs. Thus isoniazid resistance has led to difficulty in tuberculosis control. Furthermore, isoniazid-resistant TB patients are more likely to develop multidrug resistance than those susceptible and have a higher chance of treatment failure. Significant factors of isoniazid resistance are associated with *katG* and *inhA* mutations. This study developed multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) combined with dipstick chromatography strip to detect mutations of *katG* codon 315 and *inhA* codon (-15) of *M. tuberculosis* associate with isoniazid resistance. When tested with 250 DNA samples extracted from *M. tuberculosis* colonies, MAS-PCR combined with dipstick chromatography exhibited 91.67% sensitivity and 100% specificity compared to a phenotypic susceptibility test. Compared with Sanger DNA sequencing, MAS-PCR combined with dipstick chromatography showed excellent sensitivity and specificity, 100% and 99.28%, respectively, when detected *katG* codon 315 mutation, and 100% and 99.51%, respectively, when detected *inhA* codon (-15) mutation. In addition, MAS-PCR combined with dipstick chromatography had an almost perfect agreement with all reference methods. The detection limit of MAS-PCR combined with dipstick chromatography against IS1081 and *katG* codon 315 mutation was 2 ng, while *inhA* codon (-15) was 20 ng, and MAS-PCR combined with dipstick chromatography did not cross-react with other bacterial pathogens. MAS-PCR combined with dipstick chromatography was simplistic and depended on a simple thermocycler, which improves a specific and efficient amplification. The results could be rapidly read out by a naked eye that shortening an overall testing period. However, further study with isothermal amplification should be conducted to improve an absolute instrumentation free method for the detection of *M. tuberculosis* mutations associated with isoniazid resistance, which could help control the spread of TB, especially in low-resource healthcare settings or fieldworks.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากคณะบุคคลต่างๆ จึงขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณาอบความรู้ คำแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ทั้งในแง่ของการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการใช้ชีวิตในระหว่างทำงานประจำและเรียนต่อไปพร้อมๆกัน และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาอบความรู้ รวมทั้งอนุเคราะห์ตีเอนเอของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจ และตีเอนเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาสำหรับนิสิตคณะสหเวชศาสตร์ ระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่ออุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิตในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านเพื่อศึกษาต่อ และทำที่สุดนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง แห่งคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาต่างๆ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

CHULALONGKORN UNIVERSITY

นवलนภา จรจรัส

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ฉ	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....ณ	ณ
บทที่ 1 บทนำ..... 1	1
1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 5	5
3. ขอบเขตของงานวิจัย..... 6	6
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย..... 6	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7	7
1. ลักษณะทั่วไปของวัณโรค..... 7	7
1.1 สาเหตุของวัณโรค..... 7	7
1.2 การติดต่อแพร่กระจาย..... 7	7
1.3 การเกิดพยาธิสภาพ..... 8	8
1.4 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> 10	10
1.5 อุบัติการณ์วัณโรค 11	11
2. การรักษาวัณโรค..... 11	11
3. ยา Isoniazid..... 12	12
3.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid..... 12	12

3.2	ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid.....	14
3.3	ผลข้างเคียงของยา Isoniazid	15
3.4	วัณโรคดื้อยา.....	15
3.4.1	คำจำกัดความของวัณโรคดื้อยาประเภทต่างๆ.....	15
3.4.2	สถานการณ์วัณโรคดื้อยา.....	16
3.4.3	กลไกการดื้อยา Isoniazid.....	17
3.4.3.1	ยีน <i>katG</i>	17
3.4.3.2	ยีน <i>inhA</i>	19
3.4.3.3	ยีน <i>ahpC</i> และยีนอื่นๆ.....	20
3.4.4	ผลกระทบของวัณโรคดื้อยา Isoniazid	20
3.5	การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ.....	21
3.5.1.	การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางพีโนไทป์	21
3.5.2.	การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางจีโนไทป์.....	22
3.6	Allele specific PCR (AS-PCR).....	25
3.7	การตรวจสอบสารชีวภาพด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....		30
1.	สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	30
2.	เครื่องมือ.....	30
3.	วิธีการทดลอง	31
3.1	การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง.....	31
3.2	การขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์	32
3.3	ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	32
3.4	เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv	33

3.5	เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ตัวแทนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i>	33
3.6	การออกแบบ Primer	33
3.7	การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing.....	35
3.7.1	การเพิ่มปริมาณยีน <i>katG</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	35
3.7.2	การเพิ่มปริมาณยีน <i>inhA</i> ด้วยเทคนิค PCR	36
3.7.3	การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing.....	37
3.8	การทดสอบเบื้องต้นของ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน <i>katG</i> ที่มีการกลายพันธุ์ ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ด้วยเทคนิค PCR.....	37
3.8.1	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย IS1081 primer ด้วยเทคนิค PCR	37
3.8.2	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย <i>katG</i> 315 primer ด้วยเทคนิค PCR.....	38
3.8.3	การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย <i>inhA</i> (-15) primer ด้วยเทคนิค PCR	38
3.9	การเตรียมแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	39
3.10	การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับทดสอบความไวต่อยา Isoniazid.....	40
3.10.1	การทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR43	
3.10.2	การทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer แต่ละชนิดที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR.....	44
3.10.3	การทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR.....	45
3.10.4	การทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ในความเข้มข้นต่างๆ.....	46
3.10.5	การทดสอบหาความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ในความเข้มข้นต่างๆ.....	47

3.10.6 การทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่เหมาะสม ในการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	48
3.10.7 การทดสอบปริมาณของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสม ในการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	48
3.10.8 การทดสอบหาสัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม.....	48
3.10.9 การทดสอบหาระยะเวลาในการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่เหมาะสม	49
3.11 การทดสอบหาค่า Limit of detection ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography.....	49
3.12 การทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	50
3.13 การวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	50
3.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography.....	50
3.15 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa.....	54
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	56
1. ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวอย่างถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอ	56
2. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i> ด้วยเทคนิค PCR	59
3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i>	60
3.1 ยีน <i>katG</i>	60
3.2 ยีน <i>inhA</i>	61
4. ผลการทดสอบ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน <i>katG</i> ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ด้วยเทคนิค PCR.....	64

5. ผลการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315 และยีน <i>inhA</i> (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	67
5.1 อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR.....	67
5.2 ความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR	70
5.2.1 Primer ชุดที่ 1	70
5.2.2 Primer ชุดที่ 2	72
5.2.3 Primer ชุดที่ 3	74
5.2.4 Primer ชุดที่ 4	76
5.2.5 Primer ชุดที่ 5	78
5.2.6 Primer ชุดที่ 6	80
5.2.7 Primer ชุดที่ 7	82
5.2.8 Primer ชุดที่ 8	84
5.2.9 Primer ชุดที่ 9	86
5.2.10 Primer ชุดที่ 10.....	88
5.3 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR.....	90
5.4 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR.....	94
5.5 ความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR	97
5.6 ความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่เหมาะสม.....	100
5.7 ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสม.....	101
5.8 สัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม.....	103
5.9 ระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่เหมาะสม	105
5.10 สรุปสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315 และยีน <i>inhA</i> (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	107

5.11	ค่า Limit of detection (LOD) ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	107
5.12	การทำปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	110
5.13	ผลการวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG315</i> และยีน <i>inhA</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography	112
5.14	ผลการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค MAS-PCR	114
บทที่ 5	อภิปรายผลการทดลอง	121
บทที่ 6	สรุปผลการทดลอง	134
ภาคผนวก	136
บรรณานุกรม	137
ประวัติผู้เขียน	148

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อัตราความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ในประเทศต่างๆ	18
ตารางที่ 2 รายละเอียด Primer ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้	35
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ IS1081 primer, <i>katG</i> 315 primer และ <i>inhA</i> (-15) primer ที่ใช้ในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR	45
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เปรียบเทียบกับเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test เมื่อวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง	51
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis(AGE) เปรียบเทียบกับเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test เมื่อวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง	51
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง	52
ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง	52
ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง	53
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15)	

เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง.....53

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 การทดสอบ จากเทคนิคต่างๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa54

ตารางที่ 11 เกณฑ์การพิจารณาความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis และ Koch55

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC = 0.25 µg/ml) ยา Rifampicin ยา Streptomycin และยา Ethambutol ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 217 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960.....57

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง (MIC ≥ 0.5 µg/ml) ยา Ethionamide ยา Amikacin ยา Kanamycin ยา Rifabutin ยา Moxifloxacin และยา Ofloxacin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวนทั้งสิ้น 33 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Sensititre MYCOTB Broth microdilution57

ตารางที่ 14 สรุปผลความไวต่อยา Isoniazid ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและสูง ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรค จำนวนทั้งหมด 250 ตัวอย่าง58

ตารางที่ 15 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง.....61

ตารางที่ 16 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* และความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง.....62

ตารางที่ 17 รูปแบบและการกระจายตัวของตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ/หรือยีน *inhA* ที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid จำนวน 168 ตัวอย่าง.....63

ตารางที่ 18 สรุปสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* 107

ตารางที่ 19 สรุปความเข้มข้นน้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ปฏิกิริยา MAS-PCR สามารถวินิจฉัยของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ภายหลังการตรวจสอบผลผลิตบนแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และ Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % 108

ตารางที่ 20 สรุปการตรวจพบแถบยีนบนแผ่นตรวจและแถบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ภายหลังเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ด้วยยีน IS1081 และวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315 ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง.....	113
ตารางที่ 21 การแปลผลวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis.....	114
ตารางที่ 22 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยพบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ด้วยชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test จำนวน 250 ตัวอย่าง.....	115
ตารางที่ 23 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยพบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ในตัวอย่างจำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test.....	116
ตารางที่ 24 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ จำนวน 250 ตัวอย่าง.....	117
ตารางที่ 25 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์จำนวน 250 ตัวอย่าง.....	118
ตารางที่ 26 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315 และยีน <i>inhA</i> (-15) ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing.....	119

ตารางที่ 27 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing..... 120



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยา Isoniazid ประกอบด้วยวงแหวน Pyridine และหมู่ Hydrazid....	13
รูปที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid ต่อเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	14
รูปที่ 3 หลักการออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา AS-PCR ซึ่งออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว.....	26
รูปที่ 4 หลักการตรวจวัดสารพันธุกรรมของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	28
รูปที่ 5 หลักการออกแบบ Allele specific primer ตามวิธีของ Yaku-Bonczyk	35
รูปที่ 6 รูปจำลองแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	40
รูปที่ 7 ตัวอย่างของผลการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	42
รูปที่ 8 จำนวนของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อต่อยา Isoniazid เพียงชนิดเดียว (INH-R) ดื้อต่อยา Rifampicin ชนิดเดียว (RIF-R) และดื้อยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin (MDR-TB)	59
รูปที่ 9 จำนวนของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อต่อยา Isoniazid (INH-R) และดื้อร่วมกับยา Ethionamide (ETO)	59
รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>katG</i> และยีน <i>inhA</i> เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	60
รูปที่ 11 สัดส่วนการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> และ/หรือยีน <i>inhA</i> ที่พบในเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 250 ตัวอย่าง ซึ่งส่งผลให้เชื้อดื้อยา Isoniazid	64
รูปที่ 12 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 ด้วย IS1081 primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	65
รูปที่ 13 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>katG</i> ด้วย <i>katG</i> 315 primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	66

รูปที่ 14 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>inhA</i> ด้วย <i>inhA</i> (-15) primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> ตำแหน่งเหนือยีน (-15) บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	66
รูปที่ 15 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR จากการหาอุณหภูมิ Annealing ที่ 60, 62, 64, 66 และ 68 °C บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	68
รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR จากการหาอุณหภูมิ Annealing ที่ 60, 62, 64, 66 และ 68 °C บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography.....	69
รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	71
รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	72
รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	73
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	74
รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	75
รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	76
รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	77
รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	78
รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	79
รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	80

รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	81
รูปที่ 28 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	82
รูปที่ 29 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	83
รูปที่ 30 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	84
รูปที่ 31 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 81 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	85
รูปที่ 32 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 8 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	86
รูปที่ 33 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	87
รูปที่ 34 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	88
รูปที่ 35 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	89
รูปที่ 36 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	90
รูปที่ 37 การตรวจสอบผลผลิตแต่ละจำนวนรอบของปฏิกิริยา MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	92
รูปที่ 38 การตรวจสอบผลผลิตแต่ละจำนวนรอบของปฏิกิริยา MAS-PC บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	93
รูปที่ 39 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR กับดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณต่างๆ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	95

รูปที่ 40 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR กับดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณต่างๆ บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography.....	96
รูปที่ 41 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อทดสอบกับ dNTPs ความเข้มข้นต่างๆ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %	98
รูปที่ 42 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อทดสอบกับ dNTPs ความเข้มข้นต่างๆ บนแผ่น ทดสอบ Dipstick chromatography.....	99
รูปที่ 43 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับ Dipstick developing buffer ที่ NaCl ความเข้มข้นต่างๆ.....	101
รูปที่ 44 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตรต่างๆ.....	103
รูปที่ 45 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับการเจือ จางผลผลิตที่สัดส่วนต่างๆ.....	105
รูปที่ 46 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่ออ่านผล ที่เวลาต่างกัน	106
รูปที่ 47 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ กับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นต่างๆ.....	109
รูปที่ 48 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นต่างๆ	110
รูปที่ 49 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ กับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ	111
รูปที่ 50 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ.....	111

บทที่ 1 บทนำ

1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

การติดเชื้อวัณโรคนับว่าเป็นปัญหาใหญ่ที่สำคัญในปัจจุบันของระบบสาธารณสุขของโลก เนื่องจากเป็นหนึ่งในสิบของสาเหตุการเสียชีวิตที่พบได้สูงสุดของประชากรทั่วโลก วัณโรคมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ชื่อว่า *Mycobacterium tuberculosis* จากรายงานการติดเชื้อวัณโรคของโลกในปี พ.ศ. 2560 (Global tuberculosis report 2018) โดยองค์การอนามัยโลกได้คาดประมาณอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรคทั้งที่เป็นผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยกลับเป็นซ้ำทั่วโลกมีสูงถึง 10.4 ล้านคน หรือเท่ากับอัตรา 140 คนต่อแสนประชากร โดยมีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคที่เสียชีวิตประมาณ 1.3 ล้านคน ซึ่งในจำนวนผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมดนี้คาดว่าเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid และดื้อยาหลายขนาน ประมาณ 6 แสนคน โดยเป็นผู้ป่วยรายใหม่ 4.1% และผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาก่อน 19% สำหรับสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 30 ประเทศของโลกที่ประสบปัญหาการติดเชื้อวัณโรคอย่างรุนแรง (1, 2) จากการประมาณอุบัติการณ์ขององค์การอนามัยโลก ปี พ.ศ.2560 ประเทศไทยมี จำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และผู้ป่วยกลับมาเป็นซ้ำเท่ากับ 119,000 คน ผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) ร่วมด้วย จำนวน 10,000 คน และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานจำนวน 4,700 คน สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานผลการดำเนินงานควบคุมวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2559 พบว่า มีผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรักษาวัณโรคทั้งที่เป็นผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยกลับเป็นซ้ำเป็นจำนวนมากถึง 70,114 คน ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย มีจำนวน 6,794 คน ซึ่งคิดเป็น 11% ของผู้ที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ HIV ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานมีจำนวน 955 คน และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก 13 คน (3)

แนวทางการรักษาการติดเชื้อวัณโรคในประเทศไทย ได้ถูกกำหนดตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกและแนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค พ.ศ. 2561 (3, 4) ในกรณีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ควรได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคขนานแรก ได้แก่ ยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Pyrazinamide และยา Ethambutol ร่วมกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน ตามด้วยยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin เป็นระยะเวลาต่อเนื่องอีก 4 เดือน (เรียกว่าสูตร 2HRZE/4HR) (3, 5) ทั้งนี้ยา Isoniazid และยา Rifampicin จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาวัณโรคในปัจจุบัน (3, 6) อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดปัญหาวัณโรคดื้อยาด้านวัณโรคในอัตราที่สูงขึ้นทั้งในประเทศไทยและในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งถือเป็นหนึ่งในอุปสรรคสำคัญของการรักษา การควบคุมและลด

อุบัติการณ์ของวัณโรค เนื่องจากการเกิดวัณโรคดื้อยาส่งผลต่ออัตราการรักษาสำเร็จที่ลดลงและอัตราการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ผู้ป่วยยังคงแพร่กระจายเชื้อสู่บุคคลอื่นได้อย่างต่อเนื่อง ทำให้มีจำนวนผู้ติดเชื้อวัณโรคเพิ่มสูงขึ้น (7) และยังมีผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (8, 9)

การดื้อยาที่พบในผู้ป่วยวัณโรคที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญและควรได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วนคือ วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis; MDR-TB) ซึ่งหมายถึงการเกิดวัณโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid พร้อมกับยา Rifampicin (3,7) ในปี พ.ศ. 2560 องค์การอนามัยโลกได้ประมาณการอัตราผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่พบในประเทศไทยเท่ากับ 3,900 คน (1) อย่างไรก็ตามจากข้อมูลการเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยา ปี พ.ศ. 2555-2556 ของสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (7) พบอัตราผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid ทั้งแบบดื้อยาชนิดเดียวและพบรวมกับการดื้อยาชนิดอื่น มีจำนวนเท่ากับ 12.2% ในผู้ป่วยใหม่และ 29.6% ในผู้ป่วยรักษาซ้ำ (7, 10) ในขณะที่ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกพบอัตราส่วนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid มีจำนวนเท่ากับ 13.2% คน และเป็นอัตราที่สูงกว่าวัณโรคดื้อยา Rifampicin ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 10.8% คน (3,4)

วัณโรคดื้อยาที่มีชื่อว่า Isoniazid-resistant tuberculosis (Hr-TB) หมายถึงการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid แต่ยังไม่ดื้อต่อยา Rifampicin (3, 7, 9) เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อการรักษาที่พบนอกเหนือจากวัณโรคดื้อยาหลายขนาน จากข้อมูลการสำรวจแบบ Meta-analysis พบว่าผู้ป่วย Hr-TB ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคขนานแรกตามสูตรมาตรฐาน 2HRZE/4HR มีโอกาสพัฒนาเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ในภายหลัง (Acquired MDR-TB) สูงถึง 12% ในขณะที่ผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อที่ยังไม่ดื้อยา Isoniazid จะมีโอกาสพัฒนาไปเป็น Acquired MDR-TB ได้เพียง 0.8% และผลการรักษาจะประสบความสำเร็จในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid ยังมีอัตราที่ต่ำ โดยมีอัตราการรักษาล้มเหลว 11% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 10% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ไม่ดื้อยา Isoniazid พบอัตราการรักษาล้มเหลวเพียง 1% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 5% (11) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid มีโอกาสที่จะดื้อยา Ethionamide ในภายหลัง เนื่องจากยาทั้งสองชนิดเป็นยาที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยตนเอง จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้นด้วยเอนไซม์จากตัวเชื้อ *M. tuberculosis* และมีเป้าหมายการออกฤทธิ์ที่คล้ายกัน (12, 13) โดยยา Ethionamide เป็นหนึ่งในยาในกลุ่มตัวเลือกที่ 2 ที่แพทย์ใช้ในกรณีผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิด MDR-TB (14) ดังนั้นปัญหาวัณโรคดื้อยา Isoniazid จึงมีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะในการเลือกสูตรยาให้เหมาะสมตั้งแต่เริ่มรับการรักษา รวมไปถึงกรณีที่สงสัยหรือทราบตั้งแต่แรกว่าผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Isoniazid ทั้งนี้เพื่อทำให้การรักษาได้ผลสำเร็จ ลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำและการเกิดการติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานในภายหลัง (15)

การกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมเป่าหมายหรือตำแหน่งการออกฤทธิ์ของยาของเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นกลไกสำคัญที่เป็นสาเหตุให้เกิดภาวะดื้อยาของผู้ป่วยวัณโรค (15) โดยการดื้อยา Isoniazid พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีนมากกว่า 1 ชนิด เนื่องจากยา Isoniazid เป็นยาที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบบางอย่างจากตัวเชื้อ *M. tuberculosis* เพื่อช่วยในการออกฤทธิ์ของยา ซึ่งส่วนประกอบเหล่านั้นจะถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีนที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามยีนที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* มากที่สุด คือ ยีน *katG* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Catalase/peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการกระตุ้นให้ยา Isoniazid อยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน มากกว่า 60-80% เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid มักพบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และทำให้เกิดการดื้อยา Isoniazid ในระดับปานกลางถึงสูง โดยตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุด คือ โคดอน 315 คิดเป็น 96 % ของการกลายพันธุ์ทั้งหมดของยีน *katG* ในขณะที่ตำแหน่งโคดอนอื่นพบการกลายพันธุ์ในอัตราที่ต่ำ เช่น โคดอน 309 พบได้ 0.7 % หรือโคดอน 316 พบได้ 0.6 % (16) นอกจากนี้ยีนที่เป็นสาเหตุหลักรองลงมาที่ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยา Isoniazid คือยีน *inhA* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของ Enoyl-acyl carrier protein (ACP)-reductase ที่เป็นองค์ประกอบในการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ ประมาณ 13.8-33% ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid มักพบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* และทำให้เกิดการดื้อยา Isoniazid ในระดับต่ำ โดยตำแหน่งที่มักพบการกลายพันธุ์ คือตำแหน่งเหนือยีน (-15) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก Cytosine เป็น Thymine และคิดเป็น 77.3% ของการกลายพันธุ์ทั้งหมดของยีน *inhA* ในขณะที่การกลายพันธุ์ของตำแหน่งอื่นในยีนดังกล่าวพบได้ในอัตราที่ต่ำ เช่น ตำแหน่งเหนือยีน (-8) พบได้ 2% หรือโคดอน 94 พบได้ 2.7% (16, 17)

ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่หรือผู้ป่วยที่เคยรักษาไม่เกิน 1 เดือน ด้วยยาต้านวัณโรคขนานแรกสูตร 2HRZE/4HR (3,5) จะถูกติดตามผลการรักษาโดยการส่งตรวจเสมหะด้วยวิธีย้อมสีทครดทุกๆ 1 เดือน พร้อมกับส่งทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคและการตรวจทางอณูชีววิทยา โดยที่ยังไม่มีการปรับหรือเปลี่ยนชนิดยา จนกระทั่งได้ผลการทดสอบความไวต่อยาที่สามารถระบุว่าเป็นการติดเชื้อวัณโรคชนิดดื้อยาหรือไม่ ดังนั้นการทดสอบทางห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค จึงเป็นหนึ่งในส่วนประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการวางแผนการรักษาผู้ป่วยเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของวัณโรค แนวทางมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* อาศัยหลักการทางพีโนไทป์ ได้แก่ การเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อด้วยเทคนิค Agar Proportion ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีส่วนผสมของยาและมีส่วนผสมของยาเป็นส่วนประกอบ โดยการทดสอบทำได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและชนิดเหลว ซึ่งมีข้อจำกัดที่ใช้เวลาในการทดสอบค่อนข้างนาน 4-8 สัปดาห์ (18) แม้ว่าจะปัจจุบันมีการพัฒนาการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางพีโนไทป์อื่นๆ สำหรับใช้ใน

ห้องปฏิบัติการที่ให้ผลการทดสอบรวดเร็วมากยิ่งขึ้น (19) อาทิเช่น การตรวจวัดการเจริญของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT) ของบริษัท Becton Dickinson จำกัด แต่ยังคงใช้เวลาทดสอบที่นานมากกว่า 7 วันขึ้นไป (18, 20)

การทดสอบทางอณูชีววิทยามีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการทดสอบทางพีโนไทป์ที่สำคัญ คือ ใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่สั้น เนื่องจากสามารถทำการทดสอบจากสิ่งส่งตรวจได้โดยตรงไม่เสียเวลาในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำโคโลนิของเชื้อมาทดสอบซึ่งใช้ระยะเวลาขั้นต่ำ 3 สัปดาห์ รวมถึงการทดสอบทางอณูชีววิทยาใช้หลักการการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทำให้เทคนิคดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะถึง 80 และ 98-99% ตามลำดับ ถึงแม้เชื้อจะมีปริมาณน้อยก็สามารถตรวจพบได้ ปัจจุบันห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเพิ่มมากขึ้นเพื่อลดระยะเวลาในการทดสอบ (21) องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้เทคนิค Xpert MTB/RIF ซึ่งอาศัยหลักการ Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมงในการตรวจวิเคราะห์ และสามารถตรวจจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยได้โดยตรง (22) การทดสอบด้วยเทคนิค Line Probe Assay (LPA) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่องค์การอนามัยโลกแนะนำสำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction ตามด้วยการทำ Reverse hybridization เพื่อตรวจจับชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจและตรวจจับส่วนของ Nucleotide ในยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยา สามารถตรวจวินิจฉัยวัณโรคและทดสอบความไวต่อยา Rifampicin และยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* (23) มีความไวและความจำเพาะของการทดสอบความไวต่อยา Rifampin เท่ากับ 96.7 และ 98.8% ตามลำดับ มีความไวและความจำเพาะของการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid เท่ากับ 90.2 และ 99.2% ตามลำดับ และความไวของการบ่งชี้การดื้อเชื้อ *M. tuberculosis* เท่ากับ 94% (24) แม้ว่าการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา มีความจำเพาะและความไวที่สูง อีกทั้งมีระยะเวลาการทดสอบที่สั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางพีโนไทป์ แต่ยังคงพบว่ามีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น ราคาต่อการทดสอบที่ค่อนข้างสูง จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะและการบำรุงรักษาเครื่องมืออย่างต่อเนื่อง ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับสถานพยาบาลขนาดเล็ก การอ่านผลต้องอาศัยความชำนาญในกรณีของเทคนิค Line Probe Assay (25) หรือข้อจำกัดที่สามารถทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ได้เพียงชนิดเดียวในกรณีของเทคนิค Xpert MTB/RIF (22)

ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อช่วยในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพ พร้อมทั้งมีขั้นตอนการทดสอบที่สะดวก รวดเร็ว และราคาประหยัด สามารถ

นำไปใช้ในห้องปฏิบัติการหรือพื้นที่ที่มีข้อจำกัดทางด้านทรัพยากรเครื่องมือได้ การศึกษานี้มุ่งพัฒนาการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคที่ให้ความไว ความจำเพาะสูง ใช้เวลาในการทดสอบที่สั้นขึ้น ผู้ทดสอบไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญเฉพาะทาง จึงได้พัฒนาเทคนิค Multiplex Allele Specific-Polymerase Chain Reaction ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography (MAS-PCR/DC) เพื่อใช้วินิจฉัยวัณโรคดื้อยา Isoniazid โดยเป็นการวินิจฉัยหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ *inhA* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียวของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และ *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-8) และ (-15) ซึ่งเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์หลักของเชื้อ *M. tuberculosis* ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ร่วมกับการใช้เทคนิค Multiplex Allele Specific-Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้งสามตำแหน่งพร้อมกันในหนึ่งหลอดปฏิกิริยา จากนั้นตรวจหาผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนต่างๆ ด้วยตาเปล่า โดยอาศัยหลักการเข้าจับผลผลิตการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมด้วยองค์ประกอบทางเคมีบนแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography (DC) ในรูปแบบลักษณะแถบสี ณ ตำแหน่งที่ต่างกันของแต่ละยีน เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้สามารถทำการทดสอบวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาชนิด Isoniazid ได้อย่างรวดเร็ว วิธีการตรวจหาผลผลิตภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน อีกทั้งราคาไม่แพงและไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่มีความจำเพาะในการทดสอบ ผู้อ่านผลไม่จำเป็นต้องมีความชำนาญ ดังนั้นจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดสูง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการพยากรณ์การรักษาด้วยยา Isoniazid และยา Ethambutol ของเชื้อวัณโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยให้แพทย์เลือกใช้ยาที่ถูกต้องและเหมาะสมเพื่อควบคุมการระบาดของเชื้อวัณโรค

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค MAS-PCR/DC สำหรับวินิจฉัยจำแนกเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis*
2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR/DC กับวิธีทดสอบทางพีโนไทป์ และเทคนิค DNA Sequencing ในการวินิจฉัยความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis*
3. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR/DC กับวิธีทดสอบจากชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test ในการวินิจฉัยความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis*

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาตัวอย่างดีเอ็นเอเหลือใช้ (Leftover DNA) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งสกัดได้จากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 250 ตัวอย่าง โดยไม่ซ้ำกัน จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของเชื้อบริเวณยีน *katG* และยีน *inhA* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing และพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ DC เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมกับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) โดยการหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ primer อุณหภูมิระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยา และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้แผ่นทดสอบ DC ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR เปรียบเทียบควบคู่ไปกับการทำ Agarose gel electrophoresis นำเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาได้มาทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ทางคลินิก เพื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างเทคนิค MAS-PCR/DC กับผลการวินิจฉัยจำแนกเชื้อและการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ และเทคนิค DNA Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานทางอนุชีววิทยา เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-PCR/DC ที่ได้พัฒนาขึ้นมา

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ได้เทคนิค MAS-PCR/DC ซึ่งเป็นเทคนิคทางอนุชีววิทยาเพื่อใช้จำแนกเชื้อและตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis*
2. เทคนิค MAS-PCR/DC สามารถนำมาพัฒนาต่อเป็นชุดตรวจหาการดื้อยา Isoniazid ในเชื้อ *M. tuberculosis* เช่น การพัฒนาชุดทดสอบภายใต้อุณหภูมิไดอูมโนมิกที่ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ระยะเวลาการทดสอบที่รวดเร็ว ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้กับสถานพยาบาลขนาดเล็ก หรือสถานพยาบาลที่อยู่ห่างไกลได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของวัณโรค

1.1 สาเหตุของวัณโรค

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดต่อที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* (26) ซึ่งจัดอยู่ในไฟลัม *Actinobacteria* ชั้น *Actinobacteria* อันดับ *Actinomycetales* วงศ์ *Mycobacteriaceae* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1882 โดย Robert Koch แพทย์ชาวเยอรมัน (27) เชื้อ *Mycobacterium* เป็นเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* ประกอบไปด้วยสมาชิกอย่างน้อย 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* และ *M. orygis* โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุหลักที่พบได้บ่อยที่สุดของการเกิดวัณโรค เชื้อ *M. tuberculosis* ไม่ผลิต Spore และไม่เคลื่อนที่ ที่บริเวณผนังเซลล์ภายนอกมีชั้นไขมัน (Waxy) ที่หนาและประกอบด้วยสารคุณสมบัติเป็นกรดเรียกว่า Mycolic acid ที่ยึดติดสีแกรมทั่วไปไม่ได้ไม่ตี จึงสังเกตเห็นการติดสีได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึงทำให้ทนต่อการถูกชะล้างด้วยแอลกอฮอล์ของการย้อมแกรมทั่วไป(28) จึงต้องใช้การย้อมพิเศษที่อาศัยการชะล้างด้วยกรดผสมแอลกอฮอล์ เรียกว่า Acid-fast Stains เช่น Ziehl-Neelsen เนื่องจากตัวเชื้อมีคุณสมบัติทนต่อการถูกชะล้างด้วยกรดผสมแอลกอฮอล์ หรือการย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ โดยอาศัยคุณสมบัติของสี Auramine ที่สามารถซึมผ่านชั้นไขมันของเชื้อและเรืองแสงภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ได้ (5)

เชื้อ *M. tuberculosis* ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิ 35-37 °C บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมไข่ เช่น Lowenstein-Jensen (LJ) medium และ Ogawa medium หรือผสมสารอาหารพิเศษ เช่น Middlebrook เพื่อช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญช้า มีการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าในทุกๆ 15-20 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *M. tuberculosis* มีทั้งแบบชนิดแข็งและเหลว แต่เชื้อมักมีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารชนิดเหลวได้ดีกว่าชนิดแข็ง ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งสามารถสังเกตเห็นได้ภายใน 4-8 สัปดาห์ โดยมีลักษณะโคโลนีผิวขรุขระคล้ายดอกกระหล่ำ สีขาวครีม และไม่สร้างรงควัตถุ (5, 28)

1.2 การติดต่อแพร่กระจาย

วัณโรคเป็นโรคติดต่อผ่านทางอากาศ (Airborne transmission) เป็นหลัก เมื่อผู้ป่วยวัณโรคระบบทางเดินหายใจ ไอ จาม พุด หรือหัวเราะ จะมีละอองฝอยที่มีเชื้อ *M. tuberculosis* ปะปน

ออกมาในอากาศ (Droplet nuclei) ละอองฝอยที่มีขนาดใหญ่จะลอยตกลงพื้นและแห้งไป ขณะที่ ละอองฝอยที่มีขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 1-5 μm จะสามารถลอยฟุ้งในอากาศได้เป็นระยะ เวลานาน การติดต่อเกิดจากการหายใจเอาละอองฝอยเหล่านี้เข้าไป หากสูดหรือหายใจเอาละอองฝอยที่มี อนุภาคใหญ่เข้าไปจะติดอยู่ที่จมูกหรือลำคอจึงไม่ก่อให้เกิดโรค แต่หากหายใจเอาละอองฝอยที่มีขนาด เล็กเข้าไป ละอองฝอยขนาดเล็กเหล่านี้จะสามารถผ่านจมูกลำคอ และระบบทางเดินหายใจส่วนบนไป ยังหลอดลมฝอยของปอด (Bronchiole) เข้าสู่ถุงลมปอด (Alveoli) และปอดจึงสามารถก่อโรคได้ (3, 26, 27)

การติดต่อผ่านช่องทางอื่นพบได้ในอุบัติการณ์ที่ต่ำ อาทิเช่น การติดเชื้อมีโรคระยะแฝงจากผู้ บริจาคอวัยวะ เช่น การปลูกถ่ายไต การปลูกถ่ายไขกระดูก เนื่องจากก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะ จำเป็นต้องมีการคัดกรองทางภูมิคุ้มกันของผู้รับบริจาคทำให้เชื้อมีโรคระยะแฝงจากอวัยวะ ปลูกถ่ายสามารถกลับมาก่อโรคกับผู้รับบริจาคได้อีกครั้ง (29) หรือการติดเชื้อมีโรคของเด็กแรกเกิด ที่เกิดจากมารดามีภาวะการติดเชื้อมีโรคขณะตั้งครรภ์และไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสม (30, 31)

1.3 การเกิดพยาธิสภาพ

เมื่อเชื้อ *M. tuberculosis* เข้าสู่ระบบทางเดินหายใจและเดินทางมาถึงถุงลมปอด ร่างกายจะ เริ่มการกำจัดเชื้อโดยเซลล์ที่ทำหน้าที่หลักคือ Alveolar macrophages ผ่านกระบวนการ Phagocytosis โดยเป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมตามระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดของร่างกาย (Innate immune response) หากมีการติดเชื้อมีโรคเป็นเวลานานประมาณ 42 วัน ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune responses) ของร่างกาย ประกอบด้วย T cell, B cell และ Major histocompatibility complex (MHC) จะเริ่มทำงานเพื่อช่วยในการกำจัดสิ่ง แผลงปลอม อย่างไรก็ตามเชื้อสามารถปรับตัวและต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่พยายามกำจัด เชื้อ โดยอาศัยกระบวนการต่างๆ อาทิเช่น 1. เชื้อมีกลไกยับยั้งกระบวนการ Lysosome acidification เพื่อหลบหลีกการถูกทำลายด้วย Lysosome ภายในเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อ 2. คุณสมบัติของผนังเซลล์ที่หนาและมีความเป็นกรดสูงจึงสามารถทนต่อการถูกทำลายด้วยสารต่างๆ ที่ หลังจากเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อได้ 3. เชื้อมีการหลั่งสารต่างๆ ซึ่งจัดเป็น Virulence factor ที่ช่วยในการแพร่กระจายการติดเชื้อมีโรคจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง 4. เชื้อ *M. tuberculosis* มีกลไกในการยับยั้งการตายของเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อ ทำให้เชื้อที่ก่อโรคมียังมีชีวิตอยู่ใน เซลล์เจ้าบ้านได้เป็นเวลานาน (32)

หาก Alveolar macrophages ไม่สามารถกำจัดหรือควบคุมเชื้อ *M. tuberculosis* นี้ได้ เชื้อ จะสามารถเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าเพื่อแพร่กระจายเชื้อภายในเซลล์เจ้าบ้านโดยไม่แสดงความเสียหาย ของเซลล์อย่างเด่นชัดและทำลาย Alveolar macrophages ทำให้มีรอยโรคในเนื้อปอดเรียกว่า

Primary focus หรือ Ghon's focus ที่เกิดจากผลปฏิกิริยาของสารน้ำจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองการติดเชื้อ และมักพบบริเวณตรงกลาง (Mid-zone) ซึ่งเป็นส่วนล่างของปอดกลีบบนหรือส่วนบนของปอดกลีบล่าง (3) จากนั้นเชื้อ *M. tuberculosis* จะเพิ่มจำนวนภายใน Alveolar macrophage ที่ไม่มีฤทธิ์ในการต่อต้านการติดเชื้อ (Immature nonactivated macrophages) โดยเฉพาะเชื้อที่มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคสูงจะมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและทำลาย Alveolar macrophages จนตัวเชื้อถูกปล่อยออกมาลุกลามไปต่อมน้ำเหลือง (Lymphohematogenous dissemination) เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอด (Hilar lymph node) ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตขึ้น และเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตโดยผ่านหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดง แสดงให้เห็นถึงผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* สามารถมีการแพร่กระจายเชื้อไปในอวัยวะอื่นๆ ของร่างกายได้ (Miliary tuberculosis) เช่น สมอง กระดูก ไต ปอด เป็นต้น เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune responses) จะแสดงพยาธิสภาพของเซลล์ติดเชื้อที่ถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว ร่วมกับมีการหลั่งสารน้ำทางระบบภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์ที่มีการติดเชื้อ ในช่วงเวลานี้จำนวนของเชื้อ *M. tuberculosis* จะอยู่ในระดับคงที่ จึงสามารถบ่งชี้ลักษณะทางคลินิกของวัณโรคได้ (32) โดยอาการของผู้ป่วยจะขึ้นอยู่กับการหลั่ง Cytokine จาก Macrophages (TNF และ IL-1) ซึ่งมักปรากฏในระยะแรก ๆ ของโรค อาการเหล่านั้นได้แก่ ไข้ต่ำๆ เหงื่อออกตอนกลางคืน อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามตัว เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ไอมีเสมหะ เริ่มแรกเสมหะจะเป็นเมือกต่อมาเสมหะจะเป็นหนอง บางรายมีอาการไอเป็นเลือดร่วมด้วย อาการเจ็บหน้าอกแบบเสียด ๆ (Pleuritic pain) ซึ่งเกิดจากมีการลุกลามของการอักเสบไปยังเยื่อหุ้มปอด นอกจากนี้ผู้ป่วยอาจมีอาการของระบบอวัยวะที่มีการแพร่กระจายของเชื้อ *M. tuberculosis* (33)

อย่างไรก็ตามผู้ที่ได้รับเชื้อ *M. tuberculosis* มีเพียง 10% ที่มีการดำเนินของโรคไปเป็นวัณโรค ในขณะที่ประมาณ 90% ไม่ป่วยเป็นวัณโรคหรือไม่มีอาการผิดปกติใดๆ เลยตลอดชีวิต โดยผู้ที่ได้รับเชื้อบางส่วนอาจมีการกำจัดเชื้อให้หมดไปจากร่างกายด้วยระบบภูมิคุ้มกัน และมีบางส่วนที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถเก็บกักเชื้อเอาไว้ได้ ทำให้ไม่มีอาการแสดงของวัณโรคแม้มีเชื้ออยู่ในร่างกาย และเรียกภาวะดังกล่าวนี้ว่าวัณโรคแฝง (Latent tuberculosis infection; LTBI) (34) แต่กลุ่มผู้ที่เป็นวัณโรคแฝงจะมีโอกาสที่พัฒนาไปเป็นผู้ป่วยวัณโรคได้เมื่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลงจนไม่สามารถเก็บกักเชื้อเอาไว้ได้ (35) ทั้งนี้ประมาณครึ่งหนึ่งหรือ 5% มักป่วยเป็นวัณโรคภายใน 2 ปีหลังได้รับเชื้อและที่เหลืออีก 5% มักป่วยเป็นวัณโรคภายหลังจาก 2 ปีที่ได้รับเชื้อ (3)

1.4 ปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ *M. tuberculosis*

เมื่อเปรียบเทียบเชื้อ *M. tuberculosis* กับแบคทีเรียชนิดอื่นที่ส่วนใหญ่แล้วจะมีการสร้างพิษเพื่อก่อให้เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อ แต่สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* ไม่มีปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุหลักของการก่อพยาธิสภาพของเซลล์ที่ติดเชื้อแต่จะเป็นการก่อให้เกิดความรุนแรงจากการทำปฏิกริยาร่วมกันของคุณสมบัติพิเศษของตัวเชื้อต่อระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อ (36) ความรุนแรงของเชื้อ *M. tuberculosis* จึงเกิดจากองค์ประกอบภายในของตัวเชื้อเอง ได้แก่ 1. Nitrate reductase เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่เชื้อ *M. tuberculosis* สร้างขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการหายใจในสภาวะปราศจากออกซิเจน ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยเฉพาะเมื่อเชื้ออยู่ในเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เชื้อยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยมียีน *narG* ควบคุมการแสดงออก 2. Catalase/peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งให้เกิดปฏิกิริยาสลายฤทธิ์ของสารจำพวก Reactive oxygen intermediates (ROI) ซึ่งเป็นสารที่ถูกหลั่งจากผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อ เช่น Neutrophils เพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม ควบคุมการแสดงออกโดยยีน *katG* นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ต่อการตอบสนองต่อการรักษาการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยยา Isoniazid 3. AhpC หรือ Alkyl hydroperoxide reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการสลายฤทธิ์ของ Organic hydroxyperoxides ที่ถูกหลั่งจากระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ที่ติดเชื้อ เพื่อให้เชื้อไม่ถูกทำลาย คล้ายคลึงกับเอนไซม์ Catalase/peroxidase ทั้งนี้ยังพบว่าในสภาวะที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ Catalase/peroxidase มีการแสดงออกของเอนไซม์ Alkyl hydroperoxide reductase สูงขึ้น โดยการควบคุมการแสดงออกด้วยยีน *ahpC* 4. HspX หรือที่เรียกว่า α -crystalline protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนหลักของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่ามีการแสดงออกของแอนติเจน α -crystalline protein เพิ่มขึ้นภายหลังการติดเชื้อ (37) 5. Lipoarabinomannan (LAM) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ และเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของน้ำตาลจำพวก Arabinose-mannose disaccharide เป็นหลักและไขมัน มีความสามารถป้องกันตัวเชื้อจากการถูกทำลายด้วยสารน้ำจากระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการเกิดปฏิกิริยาของ Macrophage ในการตอบสนองการติดเชื้อทำให้ปฏิกิริยาดังกล่าวไม่สมบูรณ์ เช่น Phagosome maturation (38) รวมถึงเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการหลั่ง IFN- γ ทางระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ (37) องค์ประกอบที่ยกตัวอย่างมาทั้งหมดเหล่านี้ เป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและยาต้านวัณโรคได้ จึงทำให้เชื้อดำรงชีพและก่อให้เกิดพยาธิสภาพแก่ร่างกายของผู้ป่วย

1.5 อุบัติการณ์วัณโรค

องค์การอนามัยโลกได้สรุปอุบัติการณ์ผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคในปี พ.ศ. 2560 ในแต่ละประเทศ ประมาณ 10,000,000 คน ทั้งผู้ป่วยรายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ โดยพบมากที่สุดในพื้นที่ภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ 44% รองลงมาคือ แอฟริกาและแปซิฟิกตะวันตก 25% และ 18% ตามลำดับ ผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่ถึง 87% ที่อยู่ในกลุ่ม 30 ประเทศที่เป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของวัณโรคมากที่สุด โดยองค์การอนามัยโลกได้จำแนกกลุ่มประเทศที่มีผู้ติดเชื้อมากที่สุดเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มประเทศที่มีผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคสูง กลุ่มประเทศที่มีผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคร่วมกับเชื้อ HIV สูงและกลุ่มประเทศที่มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาสูง อัตราการเสียชีวิตของผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคในแต่ละปี สูงถึง 1,300,000 ล้านคน และวัณโรคจัดเป็นหนึ่งในสิบที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก สำหรับประเทศไทยจากรายงานล่าสุดปี พ.ศ. 2559 ขององค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยอยู่ใน 30 ประเทศที่มีผู้ติดเชื้อสูงที่สุดในโลก และเป็นประเทศที่จำแนกอยู่ในกลุ่มพื้นที่ที่มีประชากรที่ติดเชื้อวัณโรคสูงทั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่ามีจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ 119,000 ราย ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 10,000 ราย และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Rifampin และดื้อยาหลายขนาน Multidrug resistance *M. tuberculosis* 4,700 ราย (1)

จากข้อมูลอุบัติการณ์การเสียชีวิตย้อนหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543-2560 มีอัตราการเสียชีวิตลดลงเพียงปีละประมาณ 1.5% ด้วยเหตุนี้องค์การอนามัยโลกจึงได้จัดทำยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (End TB strategy) โดยกำหนดเป้าหมาย ในปี พ.ศ. 2578 คือ ลดอุบัติการณ์วัณโรคให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากร และลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตให้ลดลง 95% เทียบกับปี พ.ศ.2558 รวมถึงประเทศไทยก็ได้มีการจัดทำยุทธศาสตร์ดังกล่าวเช่นกัน เช่น ลดอุบัติการณ์ผู้ติดเชื้อวัณโรคเหลือเพียง 88 ต่อแสนประชากรในปี พ.ศ. 2564 เร่งรัดการค้นหาผู้ติดเชื้อให้เร็วที่สุดเพื่อลดการแพร่ระบาดของเชื้อ รวมถึงการพัฒนาบุคลากรเพื่อป้องกัน ดูแลรักษา และควบคุมโรค (3)

2. การรักษาวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคที่สามารถรักษาให้หายขาดได้ด้วยสารต้านจุลชีพในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *M. tuberculosis* หรือเรียกว่ายาต้านวัณโรค ในทางตรงกันข้ามประมาณ 50-65% ของผู้ป่วยวัณโรคไม่ได้รับการรักษาจะมีโอกาสเสียชีวิตภายใน 5 ปีภายหลังจากได้รับเชื้อ ยาต้านวัณโรคถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ 1. ยาต้านวัณโรคขนานแรก (First-line anti-tuberculosis drug) ประกอบด้วยยา Isoniazid (INH) ยา Rifampin (RIF) ยา Pyrazinamide (PZA) ยา Ethambutol (EMB) และยา Streptomycin (SM) 2. ยาต้านวัณโรคขนานที่สอง (Second-line anti-tuberculosis drug) แบ่งออกเป็น 4 ประเภท 2.1 ยากลุ่ม Fluoroquinolones เช่น ยา Ofloxacin (OFX) ยา Levofloxacin (LEV) ยา Moxifloxacin (MOX) และยา Ciprofloxacin (CIP) 2.2 ยาต้านวัณโรคชนิดฉีด (Injectable anti-tuberculosis drugs) เช่น ยา Kanamycin (KAN) ยา Amikacin (AMK) และยา

Capreomycin (CAP) 2.3 ยาต้านวัณโรคชนิดกิน (Oral second-line anti-tuberculosis drugs) เช่น ยา Ethionamide ยา Cycloserine และยา Para-aminosalicylic acid และ 2.4 ยาต้านวัณโรคนานาใหม่ (New anti-tuberculosis drugs) ประกอบไปด้วย ยา Bedaquiline ยา Delamanid ยา Linezolid ยา Clofazimine และยา Clarithromycin (39)

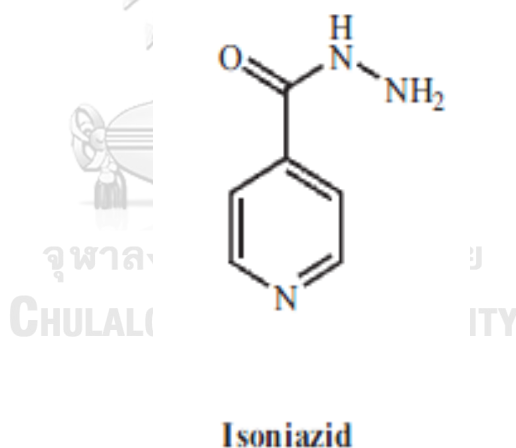
องค์การอนามัยโลกได้กำหนดแนวทางการรักษาวัณโรคสำหรับผู้ป่วยรายใหม่ที่ผลการวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยการย้อมเสมหะด้วยสีทึบกรดเป็นบวก โดยการให้รับประทานยาต้านวัณโรคด้วยสูตรระยะสั้น 6 เดือน ได้แก่ ยาสูตร 2HRZE/4HR ซึ่งหมายถึงการรักษาด้วยยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Ethambutol และยา Pyrazinamide ร่วมกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน แล้วตามด้วยยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin เป็นระยะเวลาอีก 4 เดือน (5) การออกฤทธิ์ของยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่กำลังมีการแบ่งตัว ดังนั้นการเริ่มใช้ยาในระยะเริ่มต้นหรือระยะเข้มข้น (Intensive phase) หากเชื่อมีการตอบสนองต่อยาดี ยาจะฆ่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่กำลังมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้อาการทางคลินิกของผู้ป่วยลดลง พบว่าประมาณ 80% ของผู้ป่วยวัณโรคมีผลการตรวจหาเชื้อจากเสมหะด้วยการย้อมสีทึบกรดเป็นลบภายหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคดังกล่าวข้างต้นเป็นเวลา 2 เดือน สำหรับผู้ป่วยวัณโรคบางรายที่ผลการตรวจหาเชื้อจากเสมหะด้วยการย้อมสีทึบกรดยังคงเป็นบวก แพทย์จะทำปรับการใช้ยาให้เหมาะสมตามผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค (32) โดยส่วนใหญ่เมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 4 ของการได้รับยา ผลการตรวจหาเชื้อจากเสมหะด้วยการย้อมสีทึบกรดมักเป็นลบในทุกๆราย และสามารถปรับลดยาลงเป็น 2 ชนิด (Maintenance phase) และควรรับประทานยาต่อเนื่องไปอีก 4 เดือน อย่างไรก็ตามหากผู้ป่วยวัณโรคมีเชื้อที่ดื้อต่อยาต้านวัณโรคนานแรก แพทย์จะทำการเปลี่ยนไปใช้ยาต้านวัณโรคนานที่สอง ประกอบไปด้วยยา Kanamycin ยา Amikacin ยา Levofloxacin ยา Para-aminosalicylic acid และยา Ethionamide เป็นต้น (40)

3. ยา Isoniazid

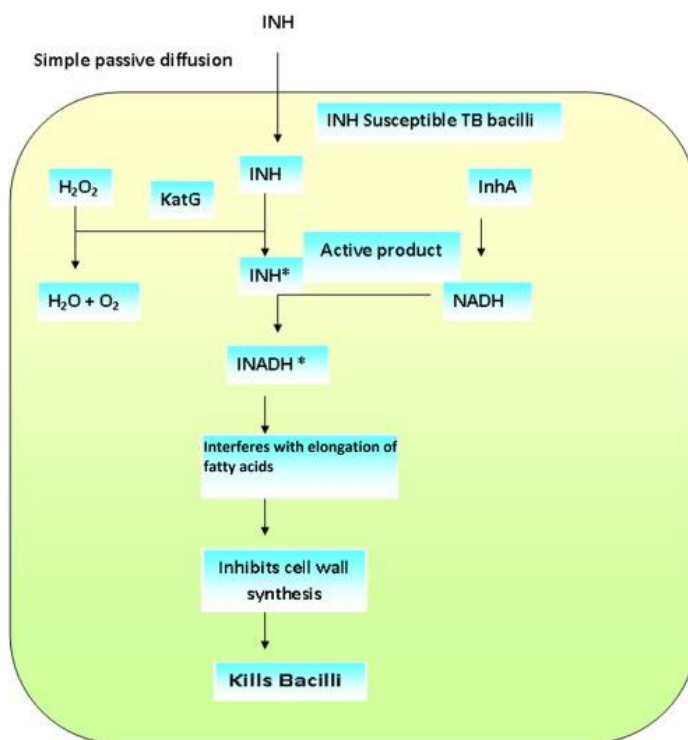
3.1 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid

ยา isoniazid ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1912 แต่ถูกนำมาใช้ในการติดเชื้อมวัณโรคครั้งแรกในปี ค.ศ. 1952 เป็นหนึ่งในยาต้านวัณโรคนานแรกที่ใช้รักษาผู้ป่วย โดยออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *M. tuberculosis* (Bactericidal) ต่อตัวเชื้อที่กำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเท่านั้น จะไม่มีผลฆ่าเชื้อหากเชื้ออยู่ในสภาวะพัก (Stationary phase) และเชื้อที่โตในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Anaerobe bacteria) ยา Isoniazid สามารถใช้ได้ทั้งการรับประทาน การฉีดใต้ผิวหนังหรือการให้ยาทางกระแสเลือด หลังจากผู้ป่วยได้รับยา ยาจะออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรคภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นยาจะมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Bacteriostatic) เท่านั้น (41) ยา Isoniazid เข้าสู่เซลล์เชื้อ *M. tuberculosis* โดยกระบวนการ Passive diffusion เพื่อไปยังยังกระบวนการสร้าง Mycolic acid ที่

เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทำให้เชื้อสูญเสียคุณสมบัติความเป็นกรดของผนังเซลล์ และทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตหรือตายในที่สุด ยา Isoniazid ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ Catalase/peroxidase hemoprotein ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *katG* เอนไซม์ดังกล่าวใช้ปฏิกิริยา Peroxidation ภายในเซลล์ กระตุ้นยา Isoniazid ให้อยู่ในรูปพร้อมทำงาน (6) ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนของ Isonicotinic acyl radical ซึ่งเกิดขึ้นตามธรรมชาติกับ NADH เพื่อสร้าง Nicotinoyl-NAD adduct จากนั้นยา Isoniazid จะทำปฏิกิริยากับ Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) ได้ผลผลิตเป็นสารประกอบระหว่าง Isoniazid-NAD เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Enoyl-acyl carrier protein (ACP)-reductase ซึ่งเป็นเป้าหมายของยาและถูกควบคุมการแสดงออกโดยยีน *inhA* (16),(42) หลังจาก Isoniazid-NAD เข้าจับกับเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้เกิดการยับยั้งของกระบวนการสร้างเชื่อมต่อกันของกรดไขมัน (Elongation cycle of fatty acid) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Mycolic acid ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ส่งผลให้เชื้อตายในที่สุด (43) รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยา Isoniazid (44) ในขณะที่รูปที่ 2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid ต่อเชื้อ *M. tuberculosis* (41)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยา Isoniazid ประกอบด้วยวงแหวน Pyridine และหมู่ Hydrazid (44)



รูปที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid ต่อเชื้อ *M. tuberculosis*(41)

3.2 ขอบเขตการออกฤทธิ์ของยา Isoniazid

ยา Isoniazid สามารถออกฤทธิ์ได้กับเชื้อ *Mycobacterium* หลายสายพันธุ์ อาทิเช่น *M. tuberculosis*, *M. bovis* และ *M. kansasii* ไม่พบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้กับเชื้อจุลชีพชนิดอื่นที่มีระบบเผาผลาญ (Metabolism) ที่ผิดปกติ โดยเฉพาะการทำงานของเอนไซม์ Catalase/peroxidase และการอาศัยพลังงานในรูป ATP ในตัวเชื้อจุลชีพนั้นๆ เพื่อเร่งการขับออกของยา (Efflux pump) (45) ยา Isoniazid ถูกใช้ร่วมกับยาต้านวัณโรคชนิดอื่นอีก 3 ชนิด ได้แก่ ยา Rifampin ยา Pyrazinamide และยา Ethambutol ซึ่งรู้จักกันในชื่อสูตรยา 2HRZE/4HR สำหรับการรักษาวัณโรคในผู้ป่วยใหม่ เนื่องจากยาสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่กำลังแบ่งตัวได้ดี

นอกจากการใช้ยาดังกล่าวจะถูกใช้ในทางการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคแล้วยังเป็นยาที่ใช้เชิงป้องกันการแพร่กระจายเชื้อวัณโรค (INH preventive therapy (IPT)) โดยใช้ในกลุ่มผู้ติดเชื้อวัณโรคแต่ไม่แสดงอาการ (Latent tuberculosis) หากผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวมีภาวะติดต่อยา Isoniazid จึงทำให้เพิ่มโอกาสการแพร่กระจายเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน (41) จากการรายงานอุบัติการณ์ขององค์การอนามัยโลกปี ค.ศ. 2017 พบผู้ที่มีสุขภาพดีที่ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงโดยไม่แสดงอาการจำนวน 1,700 ล้านคน หรือ 23% ของประชากรทั่วโลก (1)

3.3 ผลข้างเคียงของยา Isoniazid

ผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับยา Isoniazid อาจมีผลข้างเคียงของยาได้หลายอาการ พบว่าผู้ป่วยประมาณ 10-20% มีการทำงานของตับผิดปกติหลังได้รับยา ทั้งนี้ภายหลังผู้ป่วยได้รับยาต้านวัณโรคแพทย์จะตรวจติดตามการทำงานของตับร่วมด้วย และมักพบเอนไซม์ที่บ่งชี้ภาวะการทำงานของตับเพิ่มสูงขึ้นโดยไม่แสดงอาการทางคลินิกของภาวะตับอักเสบ ความเสี่ยงของผลข้างเคียงนี้จะมีโอกาสเกิดได้สูงขึ้นในผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคตับอยู่เดิม หรือผู้ป่วยที่มีพฤติกรรมบริโภคเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ในปริมาณมาก โดยกลุ่มผู้ป่วยเหล่านี้มักมีอาการแสดงออกของภาวะตับอักเสบร่วมด้วย เช่น อ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ตาเหลือง ตัวเหลือง เป็นต้น ผู้ป่วยบางรายอาจมีผลข้างเคียงในลักษณะอื่น เช่น ชาตามปลายประสาทซึ่งอาการนี้มักแปรผันตามขนาดยาที่ได้รับ อาการข้างเคียงต่อระบบผิวหนัง อาจมีสิ่ว ผื่นงอก หรือผื่น อาการข้างเคียงต่อระบบเลือด ที่อาจมีภาวะโลหิตจางหรือเม็ดเลือดขาวต่ำ และอาการข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง หรือท้องเสีย เป็นต้น (46)

3.4 วัณโรคดื้อยา

3.4.1 คำจำกัดความของวัณโรคดื้อยาประเภทต่างๆ

วัณโรคดื้อยา หมายถึง วัณโรคที่เกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีคุณสมบัติต่อต้านสารต้านจุลชีพที่ใช้ในการรักษา การเกิดวัณโรคดื้อยาสามารถเกิดจากการกรณีที่ผู้ป่วยวัณโรครับประทานยาต้านวัณโรคอย่างไม่เหมาะสมหรือไม่ต่อเนื่อง ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ภายในร่างกายผู้ป่วยเกิดการกลายพันธุ์และพัฒนาเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยา นอกจากนี้ยังเกิดจากการได้รับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีคุณสมบัติดื้อยาจากการแพร่กระจายจากผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาและเกิดการติดเชื้อได้เหมือนกับกรณีวัณโรคทั่วไป (47)

องค์การอนามัยโลกได้ให้คำจำกัดความของวัณโรคดื้อยาประเภทต่าง ๆ ไว้ตามลักษณะของการดื้อยาแต่ละชนิด ดังนี้ Monodrug-resistant tuberculosis หมายถึง วัณโรคดื้อยาเพียงชนิดเดียวของยาในกลุ่มยาต้านวัณโรคขนานแรก Polydrug-resistant tuberculosis หมายถึง วัณโรคดื้อยาในกลุ่มยาต้านวัณโรคขนานแรกมากกว่าหนึ่งชนิดขึ้นไปแต่ไม่ใช่ยา Isoniazid และยา Rifampicin พร้อมกัน Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB หรือ วัณโรคดื้อยาหลายขนาน) หมายถึง วัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid และยา Rifampicin พร้อมกัน และอาจดื้อยาชนิดอื่นในกลุ่มยาต้านวัณโรคขนานแรกด้วยหรือไม่ก็ได้ Pre-extensively drug-resistant tuberculosis (Pre-XDR-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ ดื้อยาต้านวัณโรคขนานที่สองในกลุ่ม Fluoroquinolones หรือยาต้านวัณโรคชนิดฉีด อย่างใดอย่างหนึ่งร่วมด้วย และ Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB หรือ วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก) หมายถึง วัณโรค

ดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยาต้านวัณโรคขนานที่สองในกลุ่ม Fluoroquinolones ร่วมกับยาต้านวัณโรคชนิดฉีด Rifampicin-resistant tuberculosis (RR-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยา rifampicin ซึ่งตรวจพบโดยวิธีพีโนไทป์หรือจีโนไทป์และอาจดื้อยาต้านวัณโรคอื่นร่วมด้วย ซึ่งอาจเป็น Monodrug resistant TB, Polydrug resistant TB, MDR-TB, Pre-XDR-TB หรือ XDR-TB ก็ได้ (3) จากผลการสำรวจและการวิเคราะห์ท่อนุমান (Meta-analysis) ของ Menzies และคณะพบว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Isoniazid จะทำให้การรักษาประสบความสำเร็จลดลงและเพิ่มโอกาสเสี่ยงที่จะดื้อยาชนิดอื่นภายหลัง (41)

ปัญหาวัณโรคดื้อยาเป็นหนึ่งในอุปสรรคสำคัญของการควบคุมและลดอุบัติการณ์ของวัณโรคทั้งในระดับโลกและในประเทศไทย เนื่องจากการเกิดวัณโรคดื้อยาส่งผลต่ออัตราการสำเร็จที่ลดลง และมีข้อจำกัดของกลุ่มยาต้านวัณโรคที่สามารถใช้ในการรักษาเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ระยะเวลาในการรักษายังยาวนานขึ้น และยังมีผลกระทบต่อค่าใช้จ่ายในการรักษาที่เพิ่มสูงขึ้น (40) ตัวอย่างเช่น กรณีผู้ป่วยวัณโรคทั่วไปที่ใช้ยาสูตร 2HRZE/4HR เป็นระยะเวลา 6 เดือน อัตราการรักษาสำเร็จอยู่ที่ 98-100% โดยมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่อรายประมาณ 2,000-4,000 บาท แต่หากเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน อาจต้องเปลี่ยนสูตรยาที่ใช้ในการรักษาโดยใช้ยา Kanamycin ยา Moxifloxacin ยา Clofazimine ยา Ethambutol ยา High-dose Isoniazid ยา Pyrazinamide และ ยา Prothionamide รวมระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาทั้งระยะเข้มข้นและระยะต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 2 ปี มีอัตราการรักษาสำเร็จลดลงมาเหลือเพียง 60-80% และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่อรายประมาณ 200,000 บาท ในกรณีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง จำเป็นต้องใช้ในกลุ่มที่ผู้ป่วยไม่เคยได้รับมาก่อนขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและปริมาณของยา โดยอาจนำยาในกลุ่ม Second line injectable drugs (SLIs) และ/หรือยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ร่วมกับการเลือกใช้ยาใหม่ในการรักษาวัณโรค เช่น ยา Linezolid (Lzd), ยา Bedaquiline (Bdq), ยา Delamanid (Dlm), ยา Sutezolid (PNU-100480) เพิ่มเข้ามาและต้องใช้เวลาในการรักษามากกว่า 2 ปีขึ้นไป ในขณะที่อัตราการสำเร็จเหลือเพียง 44-50% และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาต่อรายประมาณ 1 ล้านบาท (7)

3.4.2 สถานการณ์วัณโรคดื้อยา

รายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2560 เกี่ยวกับสถานการณ์ของวัณโรคดื้อยาจากการสำรวจประเทศในกลุ่มที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคดื้อยามากที่สุดจำนวน 40 ประเทศ พบอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ประมาณ 490,000 คน โดย 19% เป็นผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และ 43% เป็นผู้ป่วยวัณโรคที่เคยรักษามาแล้ว โดย 8.5% ของผู้ป่วยวัณโรคชนิดดื้อยาหลายขนานสามารถพัฒนากลายเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (XDR-TB) จำนวนผู้ป่วย XDR-TB ทั่วโลกพบประมาณ 10,800 ราย ในปี พ.ศ. 2560 โดยพบการระบาดในแถบภูมิภาคยุโรปและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มากที่สุด (1) นอกจากนี้อุบัติการณ์การดื้อยา

หลายขนานของเชื้อวัณโรคแล้ว การดื้อยาในกลุ่มแรกที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้เลือกใช้ในการรักษาผู้ติดเชื้อวัณโรค คือ ยา Rifampicin และยา Isoniazid ก็มีความสำคัญมากเช่นกัน เพราะเชื้อวัณโรคที่เริ่มดื้อยาชนิดใดชนิดหนึ่งในยาในกลุ่มแรกนี้มีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จในทางการรักษาด้วยสูตรยา 2HREZ/4HR ลดลง โดยจากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่ากลุ่มผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid ประมาณ 7.1% และทำให้การรักษาล้มเหลว 11% ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรก และประมาณ 10% ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำ ที่ทำให้การรักษาล้มเหลว 11% ตรงกันข้ามหากผู้ป่วยไม่มีภาวะการดื้อยาของเชื้อวัณโรคจะมีโอกาสการรักษาล้มเหลวเพียง 2 % ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรก และ 5% ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซ้ำ และมีโอกาสสูงที่เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid จะพัฒนาเป็นเชื้อกลุ่มดื้อยาหลายขนานหรือดื้อยา Rifampicin ร่วมด้วยในภายหลัง (48)

สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2559 องค์การอนามัยโลกได้คาดประมาณอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ 119,000 ราย เป็นผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 10,000 ราย และผู้ป่วยวัณโรค ดื้อยาหลายขนานหรือดื้อยา Rifampicin (MDR-TB/RR-TB) จำนวน 4,700 ราย และประมาณ 5-10% ของ MDR-TB เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) (9) จากจำนวนผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมดพบว่าประสบความสำเร็จในการรักษา 82.9% ทั้งผู้ป่วยรายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ (3)

3.4.3 กลไกการดื้อยา Isoniazid

ในช่วงแรกเริ่มของการสังเคราะห์ยา Isoniazid และใช้ในการรักษาวัณโรคด้วยยา Isoniazid เพียงชนิดเดียว พบว่ามีผลก่อให้เกิดเชื้อดื้อยาดังกล่าวได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันมีการค้นพบกลไกทางโมเลกุลที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการดื้อยา Isoniazid ที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นกลไกที่ค่อนข้างซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนหลายชนิด อาทิเช่น ยีน *katG* ยีน *inhA* ยีน *kasA* ยีน *ndh* และบริเวณระหว่างยีน *oxyR-ahpC* (41) รายละเอียดการกลายพันธุ์ของแต่ละยีนที่ส่งผลให้เชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยา Isoniazid ดังนี้

3.4.3.1 ยีน *katG*

ยีน *katG* มีบทบาทควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ Catalase/peroxidase ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนยา Isoniazid ให้อยู่ในรูปพร้อมทำงาน ตำแหน่งของยีน *katG* มักอยู่บริเวณที่มีความหลากหลาย (Highly variable region) บนจีโนมของเชื้อ ส่งผลต่ออัตราการกลายพันธุ์ของยีนที่สูงในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ดื้อยา Isoniazid (41) เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ของยีน *katG* จะทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ Catalase /peroxidase ที่ลดลงหรือไม่สามารถสร้างได้เลย (49) ส่งผลให้เกิดสารประกอบระหว่าง Isoniazid-NAD ที่ลดลง จนทำให้ยาไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ Enoyl-acyl carrier protein (ACP)-reductase ได้ เชื้อจึงยังคงสามารถสร้าง Mycolic acid ที่เป็น

ส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์และดำรงชีพต่อไปได้ การกลายพันธุ์ของยีน *katG* ส่งผลต่อการดื้อยา Isoniazid ระดับปานกลางถึงสูงของเชื้อ *M. tuberculosis* (ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ หรือ Minimum inhibitory concentration; MIC > 0.4 µg/ml ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว) (50, 51) โดยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* เกิดได้หลายรูปแบบ เช่น การกลายพันธุ์ของเบสหนึ่งตำแหน่ง (Point mutation) การขาดหายไปของ เบส (Deletion) หรือมีการแทรกของเบสอื่นเข้ามา (Insertion) แต่รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดคือ การกลายพันธุ์ของเบสหนึ่งตำแหน่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (Single-nucleotide polymorphisms: SNPs) ซึ่งพบได้มากถึง 68-86% ของการกลายพันธุ์ โดยตำแหน่งโคดอนที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุดและส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ของยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* คือ โคดอน 315 ทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจาก Serine เป็น Threonine (S315T) (52-54) การกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวยังพบได้มากในวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงจากวัณโรคดื้อยาหลายขนานไปเป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก อย่างไรก็ตาม ความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 มีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศ ดังที่ได้สรุปในตารางที่ 1 (41) สำหรับในประเทศไทยพบว่า 84.9% ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 (52) อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอนอื่น เช่น โคดอน 104 โคดอน 248 และโคดอน 463 สามารถพบได้ในอัตราที่ค่อนข้างต่ำมาก (พบแต่ละโคดอนได้น้อยกว่า 1%) (41)

ตารางที่ 1 อัตราความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ในประเทศต่างๆ (41)

ประเทศ	อัตราความชุกการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ที่ตำแหน่งโคดอน 315
Spain	25
Taiwan	29
USA	36
Korea	38
Italy	38
Syria	42
Canada	43

South China	51
Netherlands	53
England	56
Philippines	59
California	61
Dubai	64
Australia	65
South India	66
Mexico	67
Vietnam	73
Germany	84
Thailand	85
Russia	93
South Africa	97

3.4.3.2 ยีน *inhA*

การกลายพันธุ์ยีน *inhA* ที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ส่งผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ Enoyl-acyl carrier protein reductase ที่สูงขึ้น จึงทำให้กระบวนการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อดำเนินต่อไปได้ และเป็นสาเหตุทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อยา Isoniazid ในระดับต่ำ (ค่า MIC 0.1-0.4 µg/ml ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว) (51, 55) ของเชื้อ *M. tuberculosis* และยังสัมพันธ์กับการตื้อยา Ethionamide ในระดับต่ำ เนื่องจากยาทั้งสองชนิดนี้มีโครงสร้างที่คล้ายกัน จึงมีตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์ Enoyl-acyl carrier protein reductase บริเวณเดียวกัน (42, 56) ตำแหน่งของยีน *inhA* ที่พบว่าการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้บ่อยคือภายในบริเวณ promoter ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Cysteine เป็น Threonine (C(-15)T) (56) รองลงมาคือ ตำแหน่งเหนื่อยีนโคดอนที่ (-8) ทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Threonine เป็น Glycine หรือ Alanine (T(-8)G/A) และที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-6) ทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Alanine เป็น Glycine (A(-6)G) รวมไปถึงการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 94 ที่ทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปจาก Serine เป็น Alanine (S94A) (41) การศึกษาก่อนหน้าพบว่าความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนื่อยีนโคดอนที่ 15 ซึ่งสัมพันธ์กับการตื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีเท่ากับ 93% (57) ในขณะที่ความชุกของการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวใน

ประเทศไทยมีอัตราเท่ากับ 5.4% และ 22% ในเชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อยาต้านวัณโรคหลายขนาน และที่ไม่ใช่เชื้อคือยาต้านวัณโรคหลายขนาน ตามลำดับ (52)

3.4.3.3 ยีน *ahpC* และยีนอื่นๆ

การกลายพันธุ์ตำแหน่งยีน *ahpC* เป็นสาเหตุทำให้เอนไซม์ Alkyl hydroperoxidase reductase ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีการแสดงออกที่สูงขึ้น และทำให้เชื้อมีความคงทนต่อปฏิกิริยา Reactive oxygen และ Reactive nitrogen ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Isoniazid นอกจากนี้ยังมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีนอื่นๆ อาทิเช่น ยีน *oxyR* ยีน *kasA* ยีน *ndh* ที่มีความสัมพันธ์ต่อการดื้อยา isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* แต่พบได้ในอัตราที่น้อยมาก รวมกันไม่ถึง 10 % ของการกลายพันธุ์ทั้งหมดที่ทำให้เชื้อดื้อยา Isoniazid (56)

3.4.4 ผลกระทบของวัณโรคดื้อยา Isoniazid

ปัจจุบันสามารถพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ได้หลายรูปแบบ อาทิเช่น วัณโรคดื้อยาหลายขนาน คือ การดื้อต่อยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin หรือวัณโรคดื้อยา Isoniazid ร่วมกับยาชนิดอื่นๆ รวมถึงวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid แต่ยังไม่ดื้อต่อยา Rifampicin ที่เรียกว่า Isoniazid-resistant tuberculosis (Hr-TB) (3) จากการสำรวจการดื้อยาต้านวัณโรคขนานแรกโดยองค์การอนามัยโลก พบว่าอัตราการเกิด Acquired drug resistance ซึ่งหมายถึงวัณโรคดื้อยาในผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคมาก่อน ทั้งนี้รวมถึงผู้ป่วยที่การรักษาล้มเหลว (Treatment failure) ผู้ป่วยที่กลับเป็นซ้ำ (Relapse) และผู้ป่วยที่ขาดการรักษา (Defaulter cases) มีอัตรามากกว่า Primary drug resistance หรือวัณโรคดื้อยาที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อนหรือมีประวัติการรักษาไม่ชัดเจน โดยผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาก่อนมีอัตราการดื้อยาต้านวัณโรคอย่างน้อย 1 ชนิด เท่ากับ 36% และพบผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Primary MDR-TB) เท่ากับ 1.4% พบ ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ในภายหลัง (Acquired MDR-TB) เท่ากับ 13% ในขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อนมีอัตราการดื้อยาต้านวัณโรคอย่างน้อย 1 ชนิด เท่ากับ 9.9% โดยดื้อยาเท่ากับ Isoniazid 7.3% ยา Streptomycin เท่ากับ 6.5% ยา Rifampin 1.8% และยา Ethambutol เท่ากับ 1% (58)

จากข้อมูลการเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยา ปี พ.ศ. 2555-2556 ของสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (7) พบอัตราผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid ทั้งแบบดื้อยาชนิดเดียวและพบร่วมกับการดื้อยาชนิดอื่น มีจำนวนเท่ากับ 12.2% ในผู้ป่วยใหม่และ 29.9% ในผู้ป่วยรักษาซ้ำ (10) ในขณะที่ข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกพบอัตราส่วนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid มีจำนวนเท่ากับ 13.2% คน และเป็นอัตราที่สูงกว่าวัณโรคดื้อยา Rifampicin ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 10.8% คน (59) ข้อมูลจากงานวิจัยของ Boonsarngsuk และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ที่ทำการศึกษา

ความชุกและปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาซึ่งแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลรามาธิบดี ประเทศไทย พบอัตราส่วนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 6.9% และวัณโรคดื้อยา Rifampicin เท่ากับ 4.5 % (60) จากข้อมูลข้างต้น จะพบว่าอัตราส่วนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid สูงกว่าอัตราส่วนของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Rifampicin เช่นเดียวกับข้อมูลความชุกของวัณโรคดื้อยา Isoniazid ในประเทศอินเดีย (61) เปรู (62) เวียดนาม (63) และจีน (64) เป็นต้น

การสำรวจแบบ Meta-analysis ที่ได้รายงานในปี พ.ศ. 2560 พบว่าหากผู้ป่วย Hr-TB ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคขนานแรกตามสูตรมาตรฐาน 2HRZE/4HR จะมีโอกาสพัฒนาไปเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ในภายหลังสูงถึง 12% ในขณะที่ผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อที่ยังไวต่อยา Isoniazid จะมีโอกาสพัฒนาไปเป็น Acquired MDR-TB ได้เพียง 0.8% นอกจากนี้ผลการรักษาสำเร็จในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid ยังมีอัตราที่ต่ำ โดยมีอัตราการรักษาล้มเหลว 11% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 10% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ไวต่อยา Isoniazid พบอัตราการรักษาล้มเหลวเพียง 1% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 5% (11) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid มีโอกาสที่จะดื้อยา Ethionamide ซึ่งเป็นยาทางเลือกที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เนื่องจากยา Ethionamide มีตำแหน่งการออกฤทธิ์บริเวณเดียวกับยา Isoniazid (13) ดังนั้นปัญหาวัณโรคดื้อยา Isoniazid จึงมีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะในการเลือกสูตรยาให้เหมาะสมตั้งแต่เริ่มรับการรักษา รวมไปถึงกรณีที่สงสัยหรือทราบตั้งแต่แรกว่าผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Isoniazid ทั้งนี้เพื่อให้การรักษาได้ผลสำเร็จ ลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำและการเกิดการติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานในภายหลัง (65)

3.5 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการในด้านการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคช่วยในการตัดสินใจในการรักษาหรือการปรับเปลี่ยนยาโดยแพทย์ ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่รวดเร็ว มีส่วนช่วยให้แพทย์ตัดสินใจให้การรักษาผู้ป่วยอย่างเหมาะสมได้ทันทั่วทั้งที่ ซึ่งจะช่วยลดการแพร่กระจายเชื้อและลดอัตราจำนวนของผู้ป่วยได้ การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคสามารถตรวจได้ทั้งวิธีทางพีโนไทป์และวิธีทางจีโนไทป์ ดังนี้

3.5.1. การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางพีโนไทป์

อาศัยหลักการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่ แล้วสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อที่เกิดขึ้น ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกกำหนดวิธีมาตรฐานการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* (Gold standard) ได้แก่ วิธี Agar proportion โดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาและมียาเป็นส่วนผสม ภายหลังจากบ่มเชื้อและมีเชื้อเจริญขึ้น ทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อบน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขึ้นทั้งสองสภาวะ เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียากับมียา หากมีการเติบโตของเชื้อมากกว่า 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียา แผลผลได้ว่าเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ดังกล่าวคือยา (66) แม้ว่าวิธี Agar proportion จะเป็นวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อเสียคือใช้เวลาในการทดสอบนาน 4-6 สัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และ 8-12 สัปดาห์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (24, 66)

ในขณะที่วิธี Modified proportion method อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดเหลวโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ซึ่งใช้ระยะเวลาในการทดสอบ 4-14 วัน ขึ้นอยู่กับหลักการตรวจวัดของแต่ละเครื่องและบริษัทผู้ผลิต (58) ตัวอย่างเช่น เครื่อง BACTEC MGIT 960 (บริษัท Becton, Dickinson and Company (BD) จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) (67) ซึ่งอาศัยหลักการการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เจริญขึ้น เมื่อเชื้อใช้ออกซิเจนภายในหลอดทดลองซึ่งถูกจับกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้สารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ถูกปล่อยเป็นอิสระและเปล่งแสงออกมาทำให้ตรวจวัดได้ ภายหลังตรวจวัดเครื่องจะคำนวณปริมาณเชื้อที่เจริญขึ้นมาโดยมีหน่วยการวัด คือ Growth unit หากสามารถวัด Growth unit ได้มากกว่า 100 แผลผลได้ว่าเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ดังกล่าวคือยา เครื่อง BACTEC MGIT 960 ใช้เวลาในการทดสอบนานประมาณ 1-2 สัปดาห์ และยังได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขนานแรกทุกชนิด (ยกเว้นยา Pyrazinamide) และยาต้านวัณโรคขนานที่สอง (66)

3.5.2. การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางจีโนมไทป์

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางจีโนมไทป์มีข้อได้เปรียบ คือ ใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่สั้น มีความไวประมาณ 80% และความจำเพาะประมาณ 98-99% จึงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันเนื่องจากสามารถช่วยลดระยะเวลาการทดสอบได้เร็วขึ้น (68) การทดสอบทางจีโนมไทป์อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) (69) องค์การอนามัยโลกได้แนะนำวิธีทางจีโนมไทป์ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ได้แก่ การตรวจด้วย Xpert MTB/RIF assay ที่ใช้เทคนิค Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) และสามารถตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ไปพร้อมกับทดสอบการดื้อยา Rifampicin ในเวลาเดียวกันจากสิ่งส่งตรวจ โดยใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เมื่อทดสอบในผู้ป่วยที่มีผลการย้อมเสมหะด้วยสีทึบกรดเป็นบวกและลบ พบว่ามีความไว 98% และ 68% ตามลำดับ และมีความจำเพาะเท่ากับ 99% (70, 71) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารชนิดเหลว การตรวจด้วย Xpert MTB/RIF assay มีขั้นตอนการทดสอบที่ง่าย ไม่ซับซ้อน สามารถตรวจได้ทั้งสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยวัณโรคปอดและวัณโรคนอกปอด และยังมีน้ำยาสำหรับทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับการตรวจการติดเชื้อชนิดอื่นๆ เช่น Human immunodeficiency virus (HIV) และ Hepatitis B virus (HBV) (72) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม Xpert

MTB/RIF assay มีข้อจำกัดที่สามารถทดสอบความไวต่อยาได้เพียงยา Rifampicin เท่านั้น และการวินิจฉัยจากเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นลบยังพบความไวของการทดสอบที่ค่อนข้างต่ำ (71) นอกจากนี้การตรวจด้วยวิธี Line probe assay (LPA) ยังเป็นการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีทางจีโนมที่อีกหนึ่งวิธีที่องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการ (70) วิธี LPA อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค PCR และตรวจผลผลิตด้วยเทคนิค Reverse hybridization ทั้งนี้ในการตรวจสอบผลผลิตอาศัยการออกแบบตัวติดตามการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ยีน *katG* และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งที่มักพบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับยา Rifampin และยา Isoniazid เพื่อใช้จำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งสายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (Wild type) และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (Mutant) ออกจากกัน (24) ผลการตรวจวิเคราะห์จะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีบนแผ่นเมมเบรน และแปลผลได้โดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบซึ่งแต่ละแถบสีจะมีความจำเพาะกับยีนเป้าหมายต่างกัน วิธีนี้สามารถใช้สำหรับตรวจวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* พร้อมกับทดสอบความไวต่อยา Rifampin และยา Isoniazid (73) ในการตรวจด้วยวิธี LPA ต้องมีจำนวนปริมาณเชื้ออย่างน้อย 10,000 CFU/ml จากสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการทดสอบย้อมสีทึบกรด หรือปริมาณเชื้อ 1-10 cell/ml จากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (74) จึงจะสามารถถูกตรวจพบ และมีข้อแนะนำคือสิ่งส่งตรวจที่ใช้ควรเป็นเสมหะที่ให้ผลการย้อมสีทึบกรดเป็นบวก หรือโคลนจากการเจริญเติบโตของเชื้อหลังเพาะเชื้อ ระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ คือ 5-7 วัน ในขณะที่ความไวและความจำเพาะของการทดสอบความไวต่อยา Rifampin เท่ากับ 96.7% และ 98.8% ความไวและความจำเพาะของการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid เท่ากับ 90.2% และ 99.2% และความไวของการบ่งชี้การติดเชื้อวัณโรคเท่ากับ 94% (73) ทั้งนี้ข้อจำกัดของวิธี LPA คือ สามารถทำการตรวจได้เฉพาะในสิ่งส่งตรวจที่พบเชื้ออยู่แล้วเท่านั้น นอกจากนี้อุปกรณ์ในการตรวจยังมีราคาค่อนข้างสูง มีขั้นตอนในการตรวจที่ซับซ้อนและต้องอาศัยความชำนาญของผู้ทำการตรวจมากพอควร

เทคนิคการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) เป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมไทป์ การหาลำดับเบสนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษายีนต่างๆ ทั้งในคน สัตว์ และพืช โดยในคน Human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคน เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคได้อีกด้วย วิธี Sanger DNA Sequencing เป็นหนึ่งในเทคนิคการหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม โดยมีหลักการใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยทำงานร่วมกับ Deoxynucleotide triphosphates (dNTP) มาต่อสายดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single stranded DNA) ที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ซึ่งได้จากขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอสายคู่ (Double stranded DNA) กับ Primer และมีเอนไซม์ Dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) เป็นตัวหยุดการสังเคราะห์

สายดีเอ็นเอ ในแต่ละหลอดของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะใส่ ddNTP คนละชนิด (ddATP, ddCTP, ddGTP หรือ ddTTP) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะหยุดเมื่อมี ddNTP เข้ามาจับทำให้แต่ละปฏิกิริยาจะมีซันดีเอ็นเอ หลากหลายขนาดรวมกันอยู่ ผลผลิตของทั้งสี่ปฏิกิริยาจะถูกนำมาวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีการทดสอบ Gel electrophoresis ถึงแม้ว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด (75) แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการเนื่องมาจากมีค่าใช้จ่ายที่สูงและต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญเฉพาะทาง วิธีดังกล่าวจึงไม่เหมาะสำหรับการทดสอบความไวต่อยาในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่มักเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาการทดสอบทางอณูชีววิทยาอื่นๆ เพื่อยืนยันการแสดงผลของผลผลิตที่ยินที่ได้ในการทดสอบทางด้านจีโนมไทป์อื่นๆ เช่น การใช้เทคนิค PCR ร่วมกับการทำ DNA Sequencing ปัจจุบันมีการพัฒนาการทดสอบทางด้านจีโนมไทป์เทคนิคต่างๆ เพื่อลดข้อจำกัดที่ขึ้นให้สามารถพัฒนาเพื่อนำเทคนิคอื่นๆ ไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยเฉพาะพื้นที่ที่ห่างไกลได้ เทคนิค Line probe assay ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบทางจีโนมไทป์ที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อทำการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคที่องค์การอนามัยโลกรับรองสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการได้ เป็นการใช้หลักการ Hybridization โดยการตรึงดีเอ็นเอติดตาม (Probe) ไว้บนพื้นผิวของวัตถุเพื่อตรวจวิเคราะห์ผลผลิตหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยเห็นเป็นแถบสีที่มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมายกับบริเวณใดบริเวณหนึ่ง (65) เป็นต้น

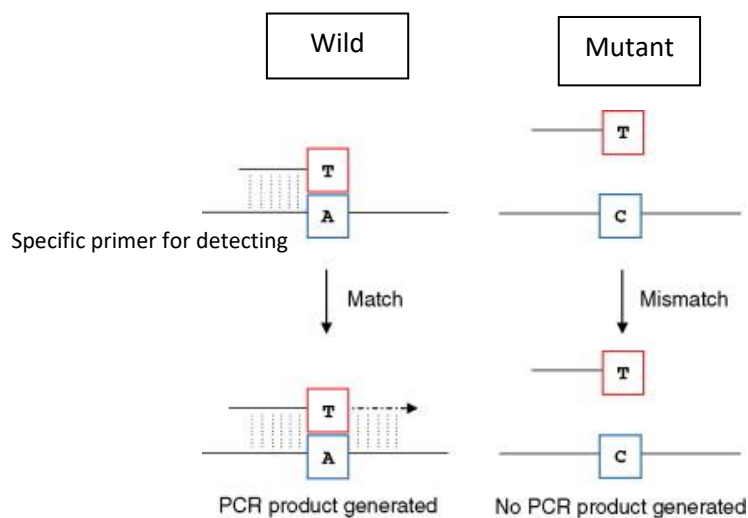
การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคทางจีโนมไทป์หลายเทคนิคเพื่อใช้ทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค จากการศึกษาของ Ckumdee และคณะ พัฒนาการใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการทดสอบหาการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งเป็นการศึกษาหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 โดยการออกแบบ Primer ในการจับกับตำแหน่งที่ต้องการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งปลาย 5' โดยใช้จำนวน primers 4 ชนิดที่จำเพาะต่อกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ 4 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจสูง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะเกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิที่คงที่ ใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 1 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้โลหะทองคำ ติดฉลากกับ DNA probe (Au-nanoprobe) เพื่อเป็นตัวติดตามผลผลิตที่มีความจำเพาะที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา LAMP หากมีผลผลิตเป้าหมายที่มีความจำเพาะกับ Au-nanoprobe เกิดขึ้นจะเกิดการเปลี่ยนสีของอนุภาคทองคำของ Au-nanoprobe เป็นสีแดง แต่หากไม่พบผลผลิตดังกล่าวจะให้สีม่วง ซึ่งผู้ปฏิบัติงานสามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า (76) เนื่องจากปฏิกิริยาของเทคนิค LAMP นั้นเกิดภายใต้อุณหภูมิที่คงที่อุณหภูมิเดียวจึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมืออัตโนมัติทางอณูชีววิทยา ทำให้ต้นทุนการทดสอบไม่สูงมากนัก แต่ยังมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการออกแบบ Primer ที่ต้องมีความจำเพาะสูงและใช้จำนวนมากกว่าปกติ ซึ่งอาจทำให้เกิดการจับกันเอง

ของ Primer หรืออาจทำให้เกิดผลบวกปลอม (False positive) ได้ในกรณีที่อุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไป หรือปริมาณส่วนผสมผิดพลาด (77)

3.6 Allele specific PCR (AS-PCR)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อวัตถุประสงค์ในการทดสอบทางจีโนมไทป์ของงานด้านต่างๆ Allele specific PCR หรือ AS-PCR เป็นหนึ่งในเทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการวินิจฉัยการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว (SNPs) (78) โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR ร่วมกับการใช้ Primer ชนิด Allele specific primer ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ เมื่อปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นโดยเริ่มจากการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลอง 91-96 °C เพื่อคลายเกลียวดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายใหม่ เรียกขั้นตอนนี้ว่า Denature ถัดมาคือ ขั้นตอน Primer Annealing เป็นการลดอุณหภูมิในหลอดทดลองที่ 50-55 °C เพื่อให้ Primer เข้าจับคู่กับสาย ดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบโดยลักษณะเบสที่จับคู่กันของทั้งสองสายดีเอ็นเอจะเป็นลักษณะเบสที่มีคุณสมบัติคู่สมกัน (Complementary base) คือ Adenine(A) จับกับ Thymine(T) และ Guanine จับกับ Cytosine(C) และขั้นตอนสุดท้าย คือ ขั้นตอน Extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า โดยเกิดจากสายดีเอ็นเอต้นแบบหนึ่งสายต่อกับสาย Primer มีส่วนประกอบอื่นๆที่มีส่วนร่วมในการต่อสายใหม่ ดังนี้ เอนไซม์ *Taq* polymerase ที่ทนความร้อนทำหน้าที่เชื่อมดีเอ็นเอสายใหม่ Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP อย่างละเท่าๆกัน ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิ 70-75 °C โดยมีทิศทางการสร้างจากปลายสายดีเอ็นเอที่ 5' ไป 3' และลำดับเบสของสายดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นการเข้าคู่กันของแต่ละลำดับเบสในลักษณะเบสคู่สมกัน (Complementary base pairs) (79)

ผลการทำปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคทาง PCR กับ Allele specific primer ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบสของเชื้อสายพันธุ์ปกติที่ไม่มีการกลายพันธุ์ หากตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบมีการกลายพันธุ์จะไม่ปรากฏผลผลิต ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่จะปรากฏผลผลิตดังแสดงในรูปที่ 3 แสดงหลักการออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา AS-PCR ซึ่งออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว



รูปที่ 3 หลักการออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา AS-PCR ซึ่งออกแบบให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอต้นแบบที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว(80)

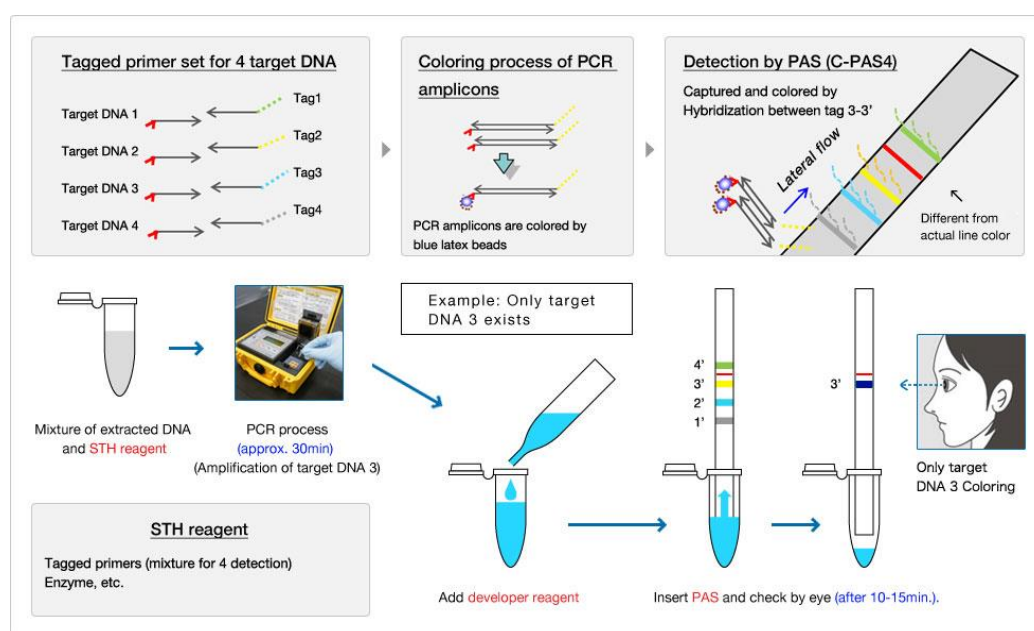
การศึกษาที่ผ่านมาของ Wang และคณะ พัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific PCR ในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวยาหลายขนาน (MDR-TB) โดยหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ร่วมกับการหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอนที่ 516, 526 และ 531 ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin เพื่อบ่งชี้การดื้อยาหลายขนาน พบว่า สำหรับการตรวจหาการดื้อยา Isoniazid ให้ความจำเพาะและความไวเท่ากับ 82.3% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธี DNA Sequencing ในขณะที่การตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ให้ความจำเพาะและความไวเท่ากับ 97.9% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธี DNA Sequencing (81) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chia และคณะ ที่พัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific PCR ในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวยาหลายขนาน (MDR-TB) โดยมีการหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่งเดียวกันกับการศึกษาของ Wang และคณะ และพบว่าการทดสอบครั้งนี้ให้ความจำเพาะและความไวเท่ากับ 82.8% และ 100% เมื่อเทียบกับวิธี DNA Sequencing สำหรับการตรวจหาการดื้อยา Isoniazid และให้ความจำเพาะและความไวเท่ากับ 98.4% และ 100% เมื่อเทียบกับวิธี DNA Sequencing สำหรับการตรวจหาการดื้อยา Rifampicin (82)

3.7 การตรวจสอบสารชีวภาพด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography

ภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR เรียบร้อยแล้ว จำเป็นต้องมีการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้น ปัจจุบันการตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้รับความนิยมมากที่สุด คือ การทดสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกสารพันธุกรรมโดยมีตัวกลางค้ำจุนที่มีลักษณะเจลหรือแผ่นวุ้นความเข้มข้นแตกต่างกันออกไป โดยมีกระแสไฟฟ้าเป็นตัวพาโมเลกุลของดีเอ็นเอในผลผลิต PCR ที่ต้องการทดสอบวิ่งไปตามรูของแผ่นวุ้น อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับขนาด กล่าวคือหากดีเอ็นเอมีขนาดเล็กกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสี Fluorescence เช่น Ethidium bromide และอ่านผลภายใต้แสง Ultraviolet จึงจะมองเห็นแถบของดีเอ็นเอของผลผลิต แม้ว่าการทดสอบ Agarose gel electrophoresis ได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่ยังมีข้อกัอยู่ที่บางประการ เช่น จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์ในการทดสอบหลายชนิด และมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน รวมไปถึงใช้ระยะเวลาในการอ่านผลนานประมาณ 30-40 นาที (83)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีชื่อว่า Dipstick chromatography strip โดยบริษัท Tohoku Bio-array จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น โดยอาศัยหลักการ DNA hybridization probe ประกอบไปด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีเบสคู่สมตรึงอยู่ และใช้ตรวจวัดผลผลิตที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Primer ที่ติดฉลากด้านปลาย 5' ด้วยสารพันธุกรรมซึ่งเป็นเบสคู่สมกับฉลากที่ถูกตรึงไว้บนแผ่นเมมเบรน และ Primer อีกเส้นที่ปลายด้าน 5' มี Biotin (Biotinylated primer) ติดฉลากอยู่ ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะมีการติดฉลากทั้งเบสคู่สมและ Biotin โดยก่อนการนำผลผลิตมาทดสอบจำเป็นต้องมีการผสมสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายเม็ดสี Latex สีฟ้ากับผลผลิตที่เราต้องการทำการทดสอบก่อน หลังจากนั้นผลผลิตที่ต้องการทดสอบจะเข้าจับกับเม็ดสี Latex โดยเป็นการจับกันระหว่าง Streptavidin บนเม็ดสี Latex กับ Biotin ที่ถูกติดฉลากไว้ที่ปลายเส้นหนึ่งของ Primer เกิดเป็น Complex กับผลผลิตด้วยกระบวนการ Streptavidin-biotin interaction เมื่อนำแผ่นเมมเบรนจุ่มลงในสารละลาย ผลผลิตที่มีเม็ดสี Latex สีฟ้า จะติดอยู่บนเมมเบรน เนื่องมาจากการจับกันของเบสคู่สมระหว่างลำดับเบสบนแผ่นเมมเบรนกับลำดับเบสที่ถูกฉลากไว้ที่ปลาย Primer อีกเส้นหนึ่ง ซึ่งสามารถมองเห็นเป็นแถบสีฟ้าได้ด้วยตาเปล่าภายใน 10-15 นาที (84) ดังแสดงในรูปที่ 4 เทคนิค Dipstick chromatography strip ถูกนำมาใช้ในการตรวจหายีนดี ออยา *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, และ *bla*_{OXA-48} ของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยตรงในสิ่งส่งตรวจที่เป็นอุจจาระของคน พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถอ่านผลได้ภายใน 15 นาที (85) ด้วยเหตุผลดังกล่าว เทคนิค Dipstick chromatography strip จึงมีความน่าสนใจและความเป็นไปได้ในการนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิจัย เพื่อพัฒนาเทคนิคการวินิจฉัยสารพันธุกรรมอื่นๆ อีกมากมาย ปัจจุบันการทดสอบด้วยหลักการ

ดังกล่าวได้รับความนิยมในวงกว้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวินิจฉัยหรือการทดสอบนอกห้องปฏิบัติการภาคสนาม หรือ POCT เนื่องจากเป็นเทคนิคการตรวจวัดสารพันธุกรรมที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ใช้อุปกรณ์ในการทดสอบน้อย มีความไวและความแม่นยำ อีกทั้งยังเก็บรักษาและขนส่งได้ง่าย (84)



รูปที่ 4 หลักการตรวจวัดสารพันธุกรรมของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography(84)

องค์ประกอบที่สำคัญของเทคนิคการตรวจสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Dipstick chromatography strip คือ สารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งถูกใช้ผสมกับผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและเม็ดสี Latex เพื่อปรับสภาพให้ผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสามารถจับกับแผ่นเมมเบรนได้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วย เกลือ ที่มีส่วนทำให้ปฏิกิริยาการจับกันของ Primer และดีเอ็นเอเป้าหมายมีความคงที่และจำเพาะมากขึ้นเพื่อลดการเกิด Low stringency ของการจับกันระหว่าง Primer และดีเอ็นเอแบบไม่จำเพาะ ซึ่งจะส่งผลต่อปฏิกิริยาการเกิดแถบสีบนแผ่นเมมเบรน (86) ทั้งนี้สารละลายบัฟเฟอร์ภายหลังที่มีการผสมกับผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และมีความเข้มข้นของ Biotinylated primer มากเกินไปอาจก่อให้เกิดผลลบปลอมและไม่เกิดแถบบนแผ่นทดสอบ ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับผลผลิต PCR จากปฏิกิริยาที่เป็น Singleplex หรือ Multiplex ตามที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำอยู่ในช่วงเท่ากับ 150 mM (87) รวมไปถึงกรณีที่หากมีความเข้มข้นของเม็ดสี Latex ซึ่งจับอยู่กับ

Streptavidin น้อยเกินไปอาจส่งผลให้เกิดผลบลบปลอมเช่นกัน เนื่องจาก Streptavidin มีโอกาสไปแย่งจับกับ Free biotinylated primer ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก จนไม่เหลือให้ทำปฏิกิริยากับผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในงานวิจัย มีรายละเอียดดังนี้ สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction (MAS-PCR) ประกอบด้วยชุดน้ำยาเอนไซม์ *Taq* polymerase สั่งซื้อจากบริษัท New England BioLabs จำกัด สหรัฐอเมริกา, Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา และ Primer สั่งส่งเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ประกอบด้วย Tris base สั่งซื้อจากบริษัท Amresco Inc. สหรัฐอเมริกา Acetic acid สั่งซื้อจากบริษัท Merck จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด สหรัฐอเมริกา Agarose สั่งซื้อจากบริษัท Serva จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. สหรัฐอเมริกา 6X Loading dye สั่งซื้อจากบริษัท Biotechrabbit จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี UltraPower™ DNA/RNA safe dye สั่งซื้อจากบริษัท Gellex International Inc. จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสและไวต่อยา Rifampicin และยา Isoniazid ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา, เครื่อง Thermo cycler จากบริษัท Biometra GmbH จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี, เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry Bath Incubator) จากบริษัท Hangzhou Allsheng Instruments จำกัด สาธารณรัฐประชาชนจีน, เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Spectrafuge™ 16M High Speed Microcentrifuge) เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spectrafuge™ Mini Laboratory Centrifuge) และเครื่อง Electrophoresis จากบริษัท Labnet International จำกัด สหรัฐอเมริกา เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (Power Supply) และ

เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS) จากบริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด สหรัฐอเมริกา

3. วิธีการทดลอง

3.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

การกำหนดระดับความเชื่อมั่นของงานวิจัยและคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ อ้างอิงข้อมูลผลการทดสอบความไวและความจำเพาะของวิธีการหาลำดับเบส ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีนตำแหน่ง *katG* และ *inhA* ที่สัมพันธ์ต่อการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* จากงานวิจัยก่อนหน้า ร่วมกับการคำนวณหาตัวอย่างจากความไวและความจำเพาะของวิธีการทดสอบด้วยสูตรของของ Burderer และคณะ (88) ดังรายละเอียดด้านล่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความไว

$$N_1 = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times [SN(1-SN)]}{W^2 \times P}$$

การคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความจำเพาะ

$$N_2 = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \times [SP(1-SP)]}{W^2 \times (1-P)}$$

เมื่อ N_1 และ N_2 คือ ขนาดตัวอย่าง ที่วิเคราะห์

$Z_{\alpha/2}$ คือ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% หรือระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่าเท่ากับ 1.96 (88)

SN คือ ความไวของวิธีมาตรฐาน (DNA Sequencing) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 84% (89)

SP คือ ความจำเพาะของวิธีมาตรฐาน (DNA Sequencing) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 98% (89)

W คือ ระดับความคลาดเคลื่อนของการสุ่มตัวอย่างที่ยอมรับได้มีค่า 0.05

P คือ ค่าประมาณความชุกของยีน *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ในประเทศไทยเท่ากับ 12.2% (65)

จากการคำนวณตัวอย่างด้วยสูตรข้างต้น ได้จำนวนตัวอย่างของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 1,693 ตัวอย่าง อ้างอิงจากการศึกษาก่อนหน้าของ Boonaiam และคณะ (90) ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนกับการดื้อยา Isoniazid และ Ethionamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในประเทศไทย ที่กำหนดตัวอย่างในการศึกษาจำนวน 170 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมในด้านระยะเวลาในการทำการศึกษาและงบประมาณ จึงพิจารณากำหนดขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 250 ตัวอย่าง

3.2 การขอจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ COA. MURA2021/467

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 250 ตัวอย่าง ซึ่งเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ (Leftover specimen) และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้ม โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ตัวอย่างทั้งหมดได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test (บริษัท Alere จำกัด, สหรัฐอเมริกา) และได้รับการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีทางพีโนไทป์ แบ่งเป็นจำนวน 217 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน ที่ผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขนานแรก ได้แก่ ยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ (Low concentration : MIC = 0.25 µg/ml อ้างอิงจาก CLSI M62) โดยใช้ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.1 µg/ml ยา Rifampicin ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 1 µg/ml ยา Streptomycin ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.1 µg/ml และยา Ethambutol ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 5 µg/ml โดยทุกความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดเป็นไปตามชุดตรวจสำเร็จรูปของเทคนิค BACTEC MGIT 960 (บริษัท Becton, Dickinson and Company จำกัด, สหรัฐอเมริกา) และจำนวน 33 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่สกัดได้จากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำซึ่งมีโอกาสพัฒนาเป็นวัณโรคดื้อยาสูง ได้ถูกนำมาทดสอบยาต้านวัณโรค ได้แก่ ยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง (High concentration : ≥ 0.5 µg/ml อ้างอิงจาก CLSI M62) โดยใช้ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.03-4.0 µg/ml และยาต้านวัณโรคขนานที่สอง ได้แก่ Ethionamide ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.3-40 µg/ml , Amikacin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.12-16 µg/ml, Kanamycin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.6-40 µg/ml, Rifabutin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.12-16 µg/ml, Moxifloxacin

ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.06-8 µg/ml และ Ofloxacin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.25-32 µg/ml โดยทุกความเข้มข้นของยาแต่ละชนิดเป็นไปตามชุดทดสอบสำเร็จรูปของเทคนิค Sensititre MYCOTB Broth microdilution บริษัท Thermo Fischer Scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา และทำการแปลผลตาม Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) M62 ดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมากำหนดรหัสใหม่ก่อนเริ่มทำการทดสอบ และไม่สามารถสืบค้นข้อมูลกลับไปยังผู้ป่วยได้ จากนั้นนำไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 1000 spectrophotometer, บริษัท Thermo scientific จำกัด, สหรัฐอเมริกา) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

3.4 เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv

การศึกษานี้ใช้ดีเอ็นเอเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีน *katG* และยีน *inhA* เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวก ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.5 เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ตัวแทนที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA*

การศึกษานี้ใช้ดีเอ็นเอเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 จำนวน 1 สายพันธุ์ และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) จำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวก โดยได้รับการทดสอบว่าคือยา Isoniazid ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 ซึ่งเป็นเทคนิคทางพีโนไทป์ และได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส เชื้อดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

3.6 การออกแบบ Primer

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่อาศัยหลักการของ PCR สำหรับวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* พร้อมกับวินิจฉัยการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่งตำแหน่งของสารพันธุกรรมของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่ควบคุมเป้าหมายของยา Isoniazid ดังนั้น Primer ที่ใช้ในการศึกษาจึงประกอบไปด้วย Primer สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ได้แก่ *katG* primer และ *inhA* primer ที่ถูกออกแบบโดย Singpanomchai และคณะ (94) ที่จำเพาะต่อยีน *katG* และยีน *inhA* ตามลำดับ และ Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา MAS-PCR ได้แก่ 1. IS1081 primer ที่ถูกออกแบบโดย Collins และคณะ (95) ที่จำเพาะต่อ Insertion sequence

ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะและใช้ในการจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* และ 2. *katG* 315 primer ที่ถูกออกแบบโดย Singpanomchai และคณะ (94) และ 3. *inhA*(-15) primer ที่ถูกออกแบบโดย Singpanomchai (94) ทั้งนี้ *katG* 315 primer และ *inhA*(-15) primer เป็น Allele specific primer (AS primer) ที่จำเพาะกับลำดับเบสตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ตามลำดับ โดย AS primer ทั้งหมดถูกออกแบบตามวิธีของ Yaku-Bonczyk (91, 92) ซึ่งถูกออกแบบให้ตำแหน่งสุดท้ายของปลายด้าน 3' ของ Primer มีลำดับเบสที่จำเพาะกับลำดับเบสที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และตำแหน่งถัดมาจากตำแหน่งรองสุดท้ายเพิ่มลำดับเบสที่ไม่ใช่เบสคู่สม (Mismatch) ที่ไม่จำเพาะกับลำดับเบสของเชื้อ ทั้งที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ เพื่อเพิ่มความจำเพาะให้กับ Primer (รูปที่ 5) ดังนั้นหากเชื้อ *M. tuberculosis* ไม่มี การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใด Primer จะสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาทาง MAS-PCR ได้ และเกิดผลผลิตขึ้น จะสามารถมองเห็นแถบของผลผลิต ในทางตรงกันข้ามหากมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ณ ตำแหน่งใด Primer ไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาทาง PCR จึงไม่มีผลผลิตเกิดขึ้นทำให้ไม่ปรากฏแถบของผลผลิต

การศึกษานี้ได้ดัดแปลง Primer ทั้งหมดที่ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อให้สามารถเพิ่มผลผลิตที่จะนำไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ กล่าวคือ ที่ปลายด้าน 5' ของ Forward primer แต่ละเส้นถูกติดฉลากลำดับเบสที่แตกต่างกันออกไป และเป็นฉลากลำดับเบสที่จำเพาะกับฉลากลำดับเบสคู่สมที่ถูกตรึงอยู่เป็นแถบตำแหน่งต่างๆ บนพื้นเมมเบรนของแผ่นทดสอบ ในขณะที่ปลายด้าน 5' ของ Reverse primer แต่ละเส้นมี Biotin ติดอยู่ ดังนั้นผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นจะมีทั้งฉลากลำดับเบสและ Biotin ติดอยู่ ซึ่งสามารถจับกับแถบฉลากลำดับเบสบนแผ่นทดสอบ

Primer ที่ถูกออกแบบในการศึกษารั้งนี้ใช้โปรแกรม Primer3 ในการออกแบบ และถูกตรวจสอบคุณสมบัติด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้ลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (GenBank Accession no. NC_000962) เป็นต้นแบบในการออกแบบ Primer โดยมีรายละเอียดของ Primer ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 2

Allele specific primer 5' ————— XYZ 3'

X: เป็นลำดับเบสที่ **ไม่** จำเพาะต่อทั้งดีเอ็นเอที่ไม่มีและมีการกลายพันธุ์

Y: เป็นลำดับเบสที่จำเพาะต่อทั้งดีเอ็นเอที่ไม่มีและมีการกลายพันธุ์

Z: เป็นลำดับเบสที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (site specific)

รูปที่ 5 หลักการออกแบบ Allele specific primer ตามวิธีของ Yaku-Bonczyk(91)

ตารางที่ 2 รายละเอียด Primer ที่ใช้ในการศึกษารังนี้

ยีน	Primer	ปฏิกิริยา	ลำดับเบส	ขนาดของผลผลิต (bp)	ที่มา
<i>IS1081</i>	<i>IS1081 F</i> <i>IS1081 R</i>	MAS-PCR	Forward TCGCGTGATCCTTCGAAACG Reverse GCCGTTGCGCTGATTGGACC	238	(93)
<i>katG</i>	<i>katG F</i> <i>katG R</i>	PCR และ Sequencing	Forward AGCGGTAAGCGGGATCTGGAGAA Reverse CATGTCTCGGTGGATCAGCTTGTA	630	(94)
<i>katG315</i>	<i>katG315 F</i> <i>katG315 R</i>	MAS-PCR	Forward AACCGGTAAGGACGCGATCACAAG Reverse CATGTCTCGGTGGATCAGCTTGTA	340	(94)
<i>inhA</i>	<i>inhA F</i> <i>inhA R</i>	PCR และ Sequencing	Forward GTCACACCGACAAACGTCAC Reverse GTTGGCGTTGATGACCTTCT	460	(94)
<i>inhA (-15)</i>	<i>inhA (-15) F</i> <i>inhA (-15) R</i>	MAS-PCR	Forward GTCACACCGACAAACGTCAC Reverse TCACCCGACAACTATCGG	128	(94)

3.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *katG* และยีน *inhA* ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing

3.7.1 การเพิ่มปริมาณยีน *katG* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* และยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมดจำนวน 250 ตัวอย่าง โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *katG* และยีน *inhA* ตามลำดับ ในตารางที่ 2 โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 2 ng โดยมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC

H37RV เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวก ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นโดยมีอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 63 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต PCR ปริมาตร 5 µl ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 µl และนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า (บริษัท Gellex International จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต วัดความเข้มข้นของผลผลิต PCR ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

3.7.2 การเพิ่มปริมาณยีน *inhA* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมดจำนวน 250 ตัวอย่าง โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *inhA* ในตารางที่ 2 โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 µl ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 µM dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 µM Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride (MgCl₂) ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 2 ng โดยมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวก ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นโดยมีอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต PCR ปริมาตร 5 µl ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 µl และนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า (บริษัท Gellex International จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต วัดความเข้มข้นของผลผลิต PCR ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

3.7.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *katG* และยีน *inhA* ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing

ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน *katG* และ *inhA* ของตัวอย่างทั้งหมด โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่าหรือเท่ากับ 50 ng/ μ l ที่ปริมาตรขั้นต่ำไม่ควรน้อยกว่า 20 μ l พร้อมทั้ง Forward primer ของแต่ละยีน ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้

3.8 การทดสอบเบื้องต้นของ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ด้วยเทคนิค PCR

นำ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) (ตารางที่ 2) มาทดสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเบื้องต้น ในสภาวะปฏิกิริยาแบบ Singleplex PCR โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) สายพันธุ์ตัวแทนจำนวนสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งได้ถูกยืนยันลำดับเบสด้วย Sanger DNA Sequencing และมีรายละเอียดของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ Primer แต่ละคู่ดังนี้

3.8.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย IS1081 primer ด้วยเทคนิค PCR

ใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 นำมาทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวข้างต้น ใน 1 หลอดปฏิกิริยา ประกอบด้วย Forward และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 2 ng ที่ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยนำไปทดสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ที่ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา

45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาด กับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

3.8.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย *katG* 315 primer ด้วยเทคนิค PCR

ใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 315 นำมาทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวข้างต้น ใน 1 หลอดปฏิกิริยา ประกอบด้วย Forward allele specific primer ที่จำเพาะต่อยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และ Reverse primer ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 2 ng โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ ที่ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ปฏิกริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 96 °C เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 50 วินาที ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 40 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยนำไปทดสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

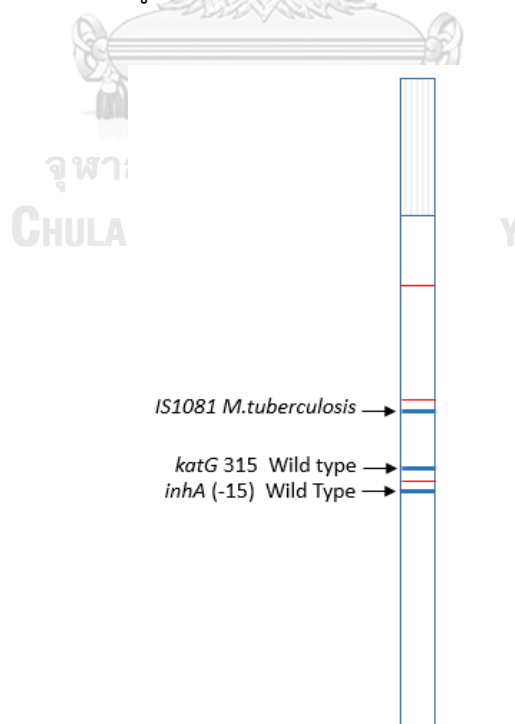
3.8.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย *inhA*(-15) primer ด้วยเทคนิค PCR

ใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนือยีน (-15) นำมาทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวข้างต้น ใน 1 หลอดปฏิกิริยา ประกอบด้วย Forward allele specific primer ที่จำเพาะต่อยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และ Reverse primer ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 2 ng โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นตัวควบคุมบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ที่ปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ปฏิกริยา PCR เกิดขึ้นภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้

ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 64 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 33 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นโดยนำไปทดสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

3.9 การเตรียมแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography

ออกแบบและสังเคราะห์แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยบริษัท Tohoku Bio-array จำกัด ประเทศญี่ปุ่น แผ่นทดสอบมีขนาด 2.5 x 45 mm และเป็นแผ่นเมมเบรนที่มีลำดับเบสคู่สมที่จำเพาะกับผลผลิต MAS-PCR ติดอยู่บนพื้นผิว โดยแผ่นทดสอบการดื้อยา Isoniazid ประกอบไปด้วยแถบที่จำเพาะต่อผลผลิต MAS-PCR ดังนี้ 1. แถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น และ 2. แถบ *katG* 315 และ *inhA* (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ และใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวของยีนทั้งสอง (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 รูปจำลองแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แสดงตำแหน่งแถบ IS1081 แถบ *katG* 315 และแถบ *inhA*(-15) สำหรับวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* และการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ด้วยปฏิกิริยา MAS-PCR

3.10 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับทดสอบความไวต่อยา Isoniazid

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR ใช้ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ IS1081 primer และวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid โดยใช้ *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ตามลำดับ Primer ทุกชนิดถูกติดฉลากด้านปลาย 5' ด้วยลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับฉลากที่ถูกตรึงไว้บนแผ่นเมมเบรนและ Primer อีกเส้นที่ปลายด้าน 5' มี Biotin (Biotinylated primer) ติดฉลากอยู่ นำ Primer ดังกล่าวทั้งหมดมาใช้ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ในการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อต่อไปนี้เป็นตัวแทนของการพัฒนา ได้แก่ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวกและเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยา มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ IS1081, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M ตามลำดับ dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 20 ng โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 64 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที แบ่งผลผลิต MAS-PCR ออกเป็น 2 ส่วน เพื่อนำไปตรวจสอบผลผลิตดังนี้

ส่วนที่หนึ่ง ตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ส่วนที่สอง ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่ได้จากข้อ 4.9 เริ่มการทดสอบโดยใช้อัตราส่วนของส่วนผสมแต่ละชนิดในการทำการทดสอบอ้างอิงจากเอกสารคำแนะนำของชุดทดสอบจากบริษัท Tohoku Bio-array จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น โดยดูผลผลิต MAS-PCR

ปริมาตร 10 µl ผสมกับ Dipstick developing buffer (บริษัท Tohoku Bio-array จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 µl (บริษัท Tohoku Bio-array จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ

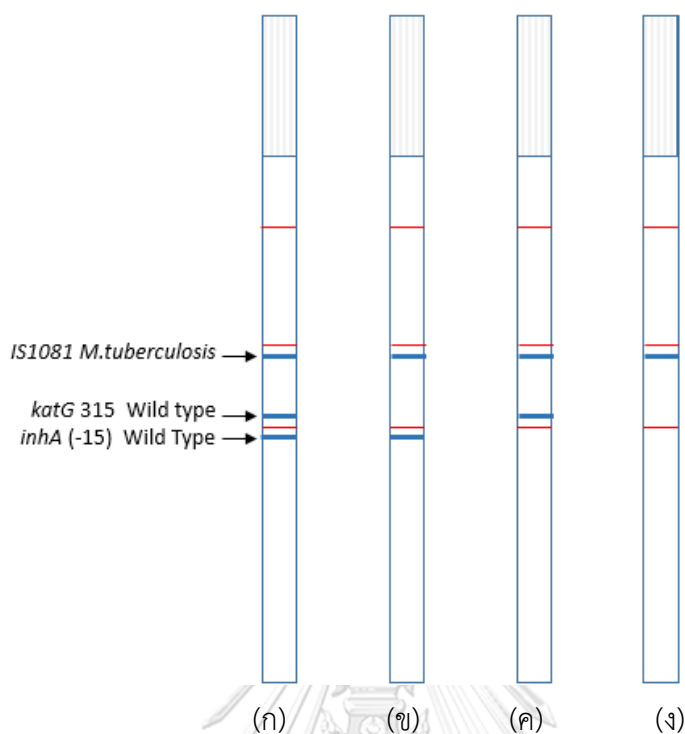
แปลผลการทดสอบดังนี้

- แถบ IS1081 หากปรากฏเป็นสีฟ้า เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 หมายถึง ตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* หากไม่ปรากฏเป็นแถบสีฟ้า เนื่องจากการไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 หมายถึง ตรวจไม่พบเชื้อ *M. tuberculosis*

- แถบ *katG* หากปรากฏเป็นสีฟ้า เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* หมายถึง เชื้อ *M. tuberculosis* ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 หากไม่ปรากฏเป็นแถบสีฟ้า เนื่องจากการไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* หมายถึง เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315

- แถบ *inhA*(-15) หากปรากฏเป็นสีฟ้า เนื่องจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) หมายถึง เชื้อ *M. tuberculosis* ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) หากไม่ปรากฏเป็นแถบสีฟ้า เนื่องจากการไม่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *inhA* หมายถึง เชื้อ *M. tuberculosis* มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน(-15)

ตัวอย่างของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อตรวจสอบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และ/หรือ ยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ดังแสดงตามรูปที่ 7



รูปที่ 7 ตัวอย่างของผลการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography

- (ก) ตัวอย่างของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และ/หรือ ยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15)
- (ข) ตัวอย่างของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15)
- (ค) ตัวอย่างของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แต่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15)
- (ง) ตัวอย่างของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบด้วยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15)

ทำการเปรียบเทียบการทดสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา MAS-PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis กับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่ได้จากข้อ 4.9 เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ร่วมกับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NaCl ใน Dipstick

developing buffer, สัดส่วนการเจือจางผลผลิตและระยะเวลาการอ่านผลบนแผ่นทดสอบ เพื่อให้ผลการทดสอบทั้งสองวิธีให้ผลเป็นทิศทางเดียวกัน

รายละเอียดการหาสถานะที่เหมาะสมในการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR และการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ดังแสดงด้านล่าง

3.10.1 การทดสอบหาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ *IS1081*, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 20 ng โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ Annealing 60, 62, 64, 66 และ 68 °C เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต MAS-PCR แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก ปริมาตร 5 μ l ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μ l และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนที่สองปริมาตร 10 μ l และนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Dipstick chromatography โดยผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกอุณหภูมิ Annealing ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกตัดชัดเจนที่สุดจากการตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer แต่ละชนิดที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ *IS1081*, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังสรุปในตารางที่ 3

dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 20 ng โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้

อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ Annealing ซึ่งได้จากข้อ 3.10.1 เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต MAS-PCR แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 5 μ l ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μ l และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนที่สองปริมาตร 10 μ l นำมาตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกความเข้มข้นของ Primer ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกตัดชัดเจนที่สุดจากการตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ที่ใช้ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

Primer ชุดที่	ความเข้มข้นของ Primer (μM)		
	IS1081	<i>katG</i> 315	<i>inhA</i> (-15)
1.	0.10	0.20	0.40
2.	0.08	0.20	0.60
3.	0.06	0.15	0.80
4.	0.04	0.10	0.80
5.	0.03	0.10	1.00
6.	0.02	0.08	1.20
7.	0.01	0.06	1.40
8.	0.02	0.04	1.60
9.	0.02	0.04	1.80
10.	0.02	0.04	2.00

3.10.3 การทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือนีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μl ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ IS1081, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ที่ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.10.2 dNTPs ที่ความเข้มข้น 200 μM Standard buffer *Taq* ที่ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl_2 ความเข้มข้น 1.5 mmol เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ความเข้มข้น 1 U และดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 20 ng โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ Annealing ซึ่งได้จากข้อ 3.10.1 เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 24, 26, 28, 30 และ 32 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต MAS-PCR แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 5 μl ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μl และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

ขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนที่สองปริมาตร 10 μ l นำมาตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกจำนวนรอบที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดจากการตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ในความเข้มข้นต่างๆ

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 1, 5, 10, 15 และ 20 ng ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ IS1081, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ที่ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.10.2 ใช้ dNTPs ความเข้มข้น 200 μ M Standard buffer *Taq* ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mmol และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ Annealing ซึ่งได้จากข้อ 3.10.1 เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้จำนวนรอบตามที่ได้จากข้อ 3.10.3 ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต MAS-PCR แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 5 μ l ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μ l และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนที่สองปริมาตร 10 μ l นำมาตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดจาก

การตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.5 การทดสอบหาความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ในความเข้มข้นต่างๆ

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.10.4 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา โดยแต่ละหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 μ l ซึ่งประกอบด้วย Forward primer และ Reverse primer ของ IS1081, *katG* 315 และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกันที่ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.10.2 ใช้ dNTPs ที่ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 μ M Standard buffer *Taq* ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.5 mmol และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ดำเนินปฏิกิริยาตามอุณหภูมิและเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ Annealing ซึ่งได้จากข้อ 3.10.1 เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้จำนวนรอบตามที่ได้จากข้อ 3.10.3 ตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต MAS-PCR แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 5 μ l ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μ l และตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ส่วนที่สอง ปริมาตร 10 μ l นำมาตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปนในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกความเข้มข้นของ dNTP ที่สามารถสังเกตเห็นตำแหน่งแถบของดีเอ็นเอที่ถูกตัดชัดเจนที่สุด จากการตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.6 การทดสอบหาความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่เหมาะสม ในการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากการพัฒนาหาสภาวะการทดสอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.10.1 ถึง 3.10.5 ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ปริมาตร 10 μ l ผสมกับ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 50, 100, 150, 200 , 250 และ 300 mM ปริมาตร 10 μ l เติม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l และผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่สามารถสังเกตเห็นแถบของผลยีน IS1081, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.7 การทดสอบปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสม ในการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากการพัฒนาหาสภาวะการทดสอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.10.1 ถึง 3.10.5 ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ปริมาตร 10 μ l ผสมกับ Dipstick developing buffer ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 4.10.6 ปริมาตร 10 μ l เติม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 0.5, 1, 1.5 และ 2 μ l และผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่สามารถสังเกตเห็นแถบของผลยีน IS1081, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.8 การทดสอบหาสัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากการพัฒนาหาสภาวะการทดสอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.10.1 ถึง 3.10.5 ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เจือจางเป็นสัดส่วนต่างๆ ดังนี้ Undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ปริมาตร 10 μ l นำสารละลายที่เจือจางผสมกับ Dipstick developing buffer ตามความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 3.10.6 ปริมาตร 10 μ l เติม Streptavidin-coated blue latex beads ตามปริมาตรที่ได้จากข้อ 3.10.7 และผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที อ่านผลด้วยตาเปล่า และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏ

ขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกสัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม ที่สามารถสังเกตเห็นแถบของผลยีน IS1081, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.10.9 การทดสอบหาระยะเวลาในการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่เหมาะสม

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากการพัฒนาหาสภาวะการทดสอบที่เหมาะสมจากข้อ 3.10.1 ถึง 3.10.5 ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในสัดส่วนการเจือจางที่ได้ในข้อ 3.10.8 ปริมาตร 10 μ l ผสมกับ Dipstick developing buffer ที่ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 3.10.6 ปริมาตร 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ตามปริมาณที่ได้ในข้อ 3.10.7 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที และสังเกตแถบสีฟ้าที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography สามารถสังเกตเห็นแถบของผลยีน IS1081, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

3.11 การทดสอบหาค่า Limit of detection ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

Limit of detection คือ ความเข้มข้นน้อยสุดของดีเอ็นเอตั้งต้นที่ปฏิกิริยาสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้และสามารถสังเกตเห็นผลผลิตของปฏิกิริยาเมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography นำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV (ตัวควบคุมบวก) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) (ตัวควบคุมลบ) มาปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อและเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า จนได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเท่ากับ 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 ng จากนั้นนำดีเอ็นเอในแต่ละระดับความเจือจางไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 3.10 และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % โดยทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

3.12 การทดสอบหาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

ทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา MAS-PCR กับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, และ *Moraxella catarrhalis* และเชื้อกลุ่ม Non-tuberculous Mycobacteria ได้แก่ *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae* และ *Mycobacterium intracellulare* โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 3.10 และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาบวกและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาลบ ตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % โดยทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้งในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

3.13 การวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography ที่ทดสอบได้จากข้อ 3.10-3.12 สภาวะดังกล่าวถูกนำมาใช้วินิจฉัยเชื้อและทดสอบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) กับดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ร่วมกับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกยีนยับยั้งด้วยวิธีหาลำดับเบสของยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นตัวควบคุมคุณภาพบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา MAS-PCR ทำการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %

3.14 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

นำผลการวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ

Dipstick Chromatography ที่ทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ และผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมไทป์ เพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ โดยวิธีการคำนวณดังที่แสดงในตารางที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เปรียบเทียบกับเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test เมื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน	ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน
พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	a	b
ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	c	d

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis(AGE) เปรียบเทียบกับเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test เมื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน	ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน
พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/AGE	a	b
ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/AGE	c	d

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์
พบการกลายพันธุ์ของ <i>katG</i> 315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15) เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	a	b
ไม่พบการกลายพันธุ์ของ <i>katG</i> 315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15) เมื่อทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	c	d

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์
พบการกลายพันธุ์ของ <i>katG</i> 315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)	a	b
ไม่พบการกลายพันธุ์ของ <i>katG</i> 315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)	c	d

ตารางที่ 8 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing	ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing
พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR/DC	a	b
ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR/DC	c	d

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

	พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing	ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing
พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR/AGE	a	b
ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR/AGE	c	d

มีสูตรคำนวณดังนี้

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

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

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

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

3.15 การคำนวณค่าความสอดคล้องของผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa

ค่าสถิติ Kappa (Cochan's Kappa Coefficient : K) เป็นการวัดสัมพันธภาพระหว่าง 2 ตัวแปร กำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% ที่นัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ วิเคราะห์ความสอดคล้องกันระหว่าง 2 เทคนิค ได้แก่ การตรวจตรวจหายีน IS1081 ในการวินิจฉัยพบเชื้อ *M. tuberculosis* จากเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเทคนิคชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test การตรวจวินิจฉัยยีน IS1081 ในการวินิจฉัยพบเชื้อ *M. tuberculosis* ผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และ/หรือยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยาด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และ/หรือยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing

แทนค่าตัวอย่างที่ได้จากการทดสอบในตารางที่ 10 และคำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>)

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง 2 การทดสอบ จากเทคนิคต่างๆ ด้วยค่าสถิติ Kappa

	พบการกลายพันธุ์เมื่อ ทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing	ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อ ทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing	รวม
ผลบวกจากเทคนิค MAS-PCR/DC	a	b	a + b
ผลลบจากเทคนิค MAS-PCR/DC	c	d	c + d
รวม	a + c	b + d	a+b+c+d

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทางสถิติ Kappa เปรียบเทียบกับตารางที่ 8 เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องกันตามตารางที่ 11
 ตารางที่ 11 เกณฑ์การพิจารณาความสอดคล้องกันของสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Landis และ Koch (95)

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้องกัน
0.81-1.00	สอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (Almost perfect)
0.61-0.80	สอดคล้องกันในเกณฑ์ดี (Substantial)
0.41-0.60	สอดคล้องกันในเกณฑ์ปานกลาง (Moderate)
0.21-0.40	สอดคล้องกันในเกณฑ์พอใช้ (Fair)
0.00-0.20	สอดคล้องกันเล็กน้อย (Slight)
น้อยกว่า 0.00	ไม่มีความสอดคล้องกัน (Poor)

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย

1. ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวอย่างถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 250 ตัวอย่าง ซึ่งเพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ (Leftover specimen) โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย และถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยเชื้อจำนวน 217 ตัวอย่างถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขนานแรกได้แก่ ยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC = 0.25 µg/ml อ้างอิงจาก CLSI M62) โดยทดสอบกับความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.25 µg/ml ยา Rifampicin ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 1 µg/ml ยา Streptomycin ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.1 µg/ml และยา Ethambutol ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 5 µg/ml ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 เนื่องจากราคาถูกและยังไม่มีควมจำเป็นต้องทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขนานที่สองด้วยวิธี Sensititre MYCOTB Broth microdilution ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 ในขณะที่เชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวน 33 ตัวอย่าง ถูกนำมาทดสอบยาต้านวัณโรค ได้แก่ ยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง (MIC ≥ 0.5 µg/ml อ้างอิงจาก CLSI M62) ทดสอบที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.03-4 µg/ml โดยทดสอบร่วมกับยาต้านวัณโรคขนานที่สอง ได้แก่ Ethionamide ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.3-40 µg/ml , Amikacin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.12-16 µg/ml, Kanamycin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.6-40 µg/ml, Rifabutin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.12-16 µg/ml, Moxifloxacin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.06-8 µg/ml และ Ofloxacin ที่ความเข้มข้นของยาเท่ากับ 0.25-32 µg/ml ด้วยเทคนิค Sensititre MYCOTB Broth microdilution ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC = 0.25 µg/ml) ยา Rifampicin ยา Streptomycin และยา Ethambutol ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 217 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960

การทดสอบความไวต่อยาชนิด	ผลการทดสอบ		
	ไวต่อยา (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยาระดับปาน กลาง (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยา (ตัวอย่าง)
Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ	82	0	135
Rifampin	192	0	58
Streptomycin	195	0	55
Ethambutol	211	33	6

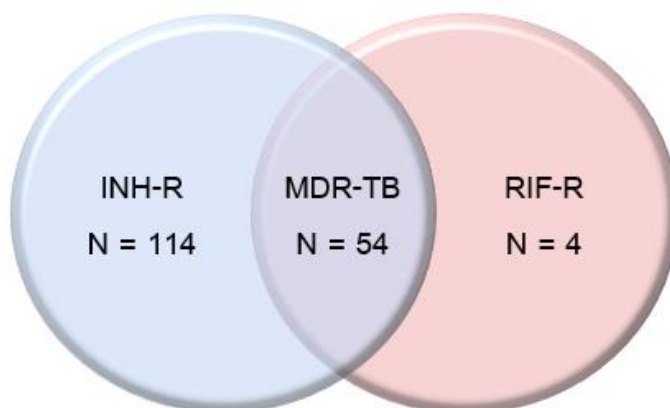
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง (MIC ≥ 0.5 µg/ml) ยา Ethionamide ยา Amikacin ยา Kanamycin ยา Rifabutin ยา Moxifloxacin และยา Ofloxacin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำ จำนวนทั้งสิ้น 33 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Sensititre MYCOTB Broth microdilution

การทดสอบความไวต่อยาชนิด	ผลการทดสอบ		
	ไวต่อยา (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยาระดับปาน กลาง (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยา (ตัวอย่าง)
Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง	0	0	33
Ethionamide	29	0	4
Amikacin	33	0	0
Kanamycin	33	0	0
Rifabutin	19	0	14
Moxifloxacin	32	0	1
Ofloxacin	28	0	5

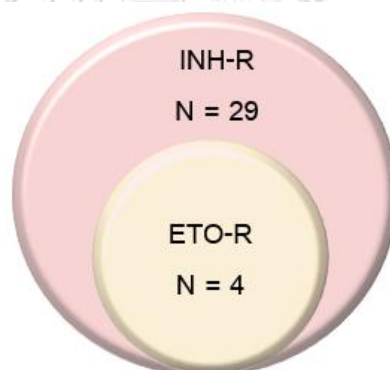
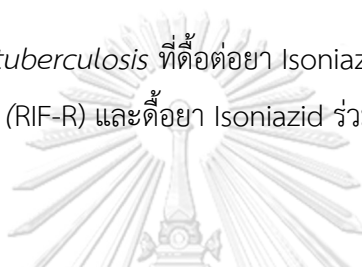
ตารางที่ 14 สรุปผลความไวต่อยา Isoniazid ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและสูง ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรค จำนวนทั้งหมด 250 ตัวอย่าง

จำนวนที่ทดสอบ ทั้งหมด	ยา Isoniazid ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (MIC = 0.25 µg/ml)		ยา Isoniazid ที่ระดับความเข้มข้นสูง (MIC ≥ 0.5 µg/ml)	
	ไวต่อยา (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยา (ตัวอย่าง)	ไวต่อยา (ตัวอย่าง)	ดื้อต่อยา (ตัวอย่าง)
จำนวน (ตัวอย่าง)	82	135	0	33

จากการวิเคราะห์รูปแบบความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* รวมทั้งหมด 250 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อที่ไวต่อยา Isoniazid จำนวน 82 ตัวอย่าง และดื้อต่อยา Isoniazid จำนวน 168 ตัวอย่าง (ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ จำนวน 135 ตัวอย่าง และดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 33 ตัวอย่าง) โดยเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid เพียงชนิดเดียว จำนวน 114 ตัวอย่าง (เป็นเชื้อดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ จำนวน 110 ตัวอย่างและระดับความเข้มข้นสูง จำนวน 4 ตัวอย่าง) และเป็นเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin ซึ่งเรียกว่า MDR-TB จำนวน 54 ตัวอย่าง (เป็นเชื้อดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ จำนวน 25 ตัวอย่างและระดับความเข้มข้นสูง จำนวน 29 ตัวอย่าง) (รูปที่ 8) นอกจากนี้ จากตัวอย่างที่ทำการทดสอบความไวต่อยา Ethionamide จำนวน 33 ตัวอย่าง ยังพบเชื้อดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูงร่วมกับยา Ethionamide ซึ่งเป็นยาที่มีตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับยา Isoniazid จำนวน 4 ตัวอย่าง (รูปที่ 9) ทั้งนี้ไม่พบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีคุณสมบัติเป็น XDR-TB ในการศึกษาครั้งนี้



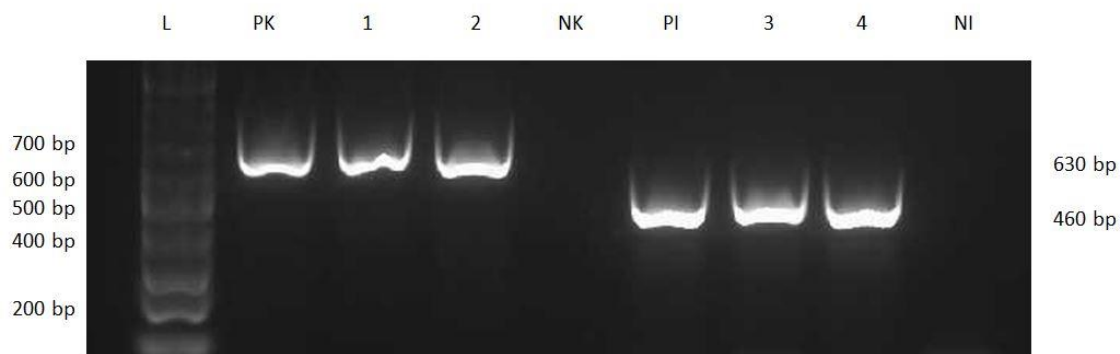
รูปที่ 8 จำนวนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid เพียงชนิดเดียว (INH-R) ดื้อต่อยา Rifampicin ชนิดเดียว (RIF-R) และดื้อยา Isoniazid ร่วมกับยา Rifampicin (MDR-TB)



รูปที่ 9 จำนวนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid (INH-R) และดื้อร่วมกับยา Ethionamide (ETO)

2. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* และยีน *inhA* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิกจำนวนทั้งหมด 250 ตัวอย่าง และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งถูกสกัดโดยวิธีการต้ม โดยห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ ยีน *katG* และยีน *inhA* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นของยีน *katG* มีขนาดเท่ากับ 630 คู่เบส และยีน *inhA* มีขนาดเท่ากับ 460 คู่เบส (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* และยีน *inhA* เชื้อ *M. tuberculosis* บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % แถว L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว PK และ PI แสดงผลของตัวควบคุมบวก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ของยีน *katG* และ *inhA* ตามลำดับ แถว NK และ NI แสดงผลของตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถวที่ 1 และ 2 แสดงผลการของดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก พบแถบของผลผลิตของยีน *katG* มีขนาด 630 คู่เบส และ แถวที่ 3 และ 4 แสดงผลของดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก พบแถบของผลผลิตของยีน *inhA* มีขนาด 460 คู่เบส

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *katG* และยีน *inhA*

ยีน *katG* และยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งหมด 250 ตัวอย่าง ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ ผลจากการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (GenBank Accession no. NC_000962) ด้วยโปรแกรม MEKA 10 รายละเอียดของผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแต่ละยีนสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้

3.1 ยีน *katG*

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *katG* ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่ามีการกลายพันธุ์จำนวน 111 ตัวอย่าง และไม่มีการกลายพันธุ์จำนวน 139 ตัวอย่าง โดยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ทั้งหมด เกิดจากการกลายพันธุ์ของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งที่โคดอน 315 และส่งผลให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง รายละเอียดของการกลายพันธุ์ที่ยีน *katG* ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

โคดอนที่พบ	เบสที่เปลี่ยนแปลงไป	กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป	เชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid	เชื้อที่ไวต่อยา Isoniazid	รวม (ตัวอย่าง)
การกลายพันธุ์ยีน <i>katG</i>					
ไม่พบการกลายพันธุ์	-	-	57	82	139
315	AGC → ACC	Serine (S) → Threonine (T)	110	0	110
315	AGC → AAC	Serine (S) → Asparagine (N)	1	0	1
รวม (ตัวอย่าง)			168	82	250

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Isoniazid จำนวน 82 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ในขณะที่เชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ทั้งหมด 168 ตัวอย่าง พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* จำนวน 111 ตัวอย่าง (66.1 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) และไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* จำนวน 57 ตัวอย่าง (33.9 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) ทั้งนี้ในกลุ่มของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid นี้ มีเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 33 ตัวอย่าง ซึ่งพบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 (Serine – Threonine) จำนวน 28 ตัวอย่าง (84.85% ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง)

เชื้อทุกสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 (100 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) และการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Serine เป็น Threonine (*katG* S315T) จำนวน 110 ตัวอย่าง (99.1 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) และเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Serine เป็น Asparagine (*katG* S315N) จำนวน 1 ตัวอย่าง (1.9 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์)

3.2 ยีน *inhA*

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่ามีการกลายพันธุ์จำนวน 45 ตัวอย่าง และไม่มีการกลายพันธุ์จำนวน 205 ตัวอย่าง โดยการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* เกิดจากการกลายพันธุ์ของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-13) และ (-15) และส่งผลให้

กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง รายละเอียดของการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* และความไวต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

โคดอนที่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i>	เบสที่เปลี่ยนแปลงไป	เชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid	เชื้อที่ไวต่อยา Isoniazid	รวม (ตัวอย่าง)
ไม่พบการกลายพันธุ์	-	123	82	205
(-13)	Guanine (G) → Thymine (T)	1	0	1
(-15)	Cytosine (C) → Thymine (T)	44	0	44
รวม (ตัวอย่าง)		168	82	250

จากตารางที่ 13 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Isoniazid จำนวน 82 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ในขณะที่เชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ทั้งหมด 168 ตัวอย่าง พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* จำนวน 45 ตัวอย่าง (26.8 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) และไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* 123 ตัวอย่าง (73.2 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) ทั้งนี้ในกลุ่มของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid นี้ มีเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 33 ตัวอย่าง ซึ่งพบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) จำนวน 5 ตัวอย่าง (15.15% ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง)

การกลายพันธุ์ของยีน *inhA* พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ทั้งนี้ตำแหน่งที่พบว่าการกลายพันธุ์มากที่สุด คือ ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Cytosine ไปเป็น Thymine (*inhA* C(-15)T) ซึ่งพบในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งหมด 44 ตัวอย่าง (97.8 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA*) รองลงมาเป็นการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-13) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Guanine ไปเป็น Thymine (*inhA* G(-13)T) ซึ่งพบเพียง 1 ตัวอย่าง (2.2 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA*)

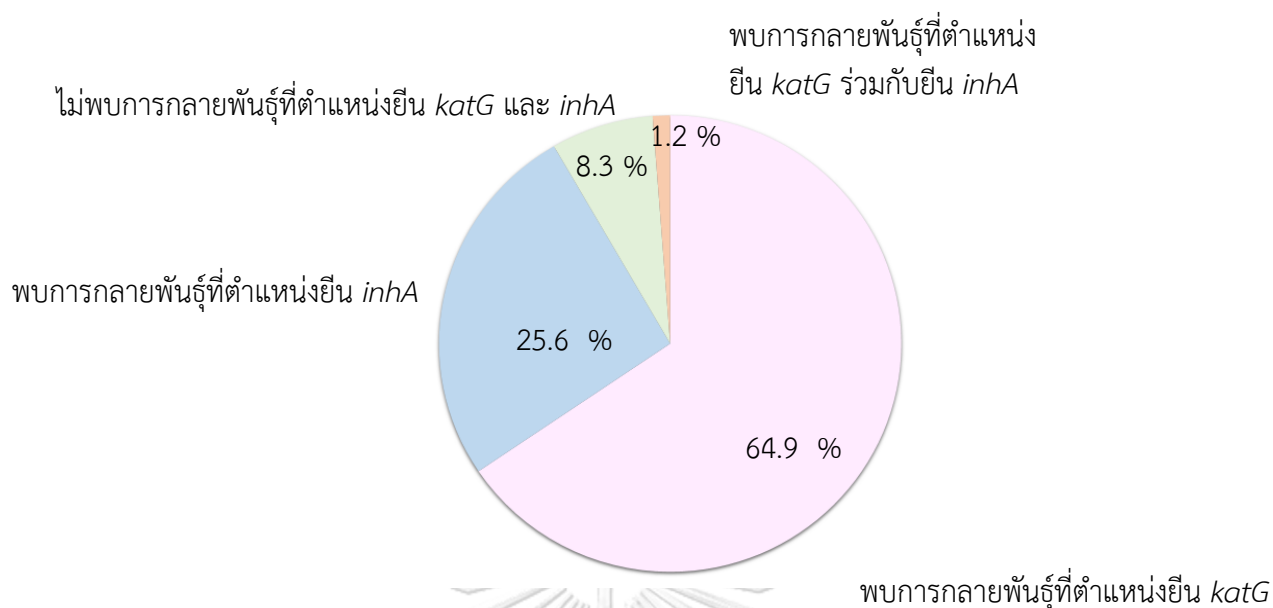
ทั้งนี้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ทั้งหมดจำนวน 168 ตัวอย่าง สามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ยีนใดยีนหนึ่ง หรือพบการกลายพันธุ์ร่วมกันของทั้งสองยีน ดังที่สรุปในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 รูปแบบและการกระจายตัวของตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ/หรือยีน *inhA* ที่พบได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid จำนวน 168 ตัวอย่าง

ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> และ/หรือยีน <i>inhA</i>	จำนวน (ตัวอย่าง)
<i>katG</i> S315T	108
<i>katG</i> S315N	1
<i>inhA</i> G(-13)T	1
<i>inhA</i> C(-15)T	42
<i>katG</i> S315T และ <i>inhA</i> G(-13)T	0
<i>katG</i> S315T และ <i>inhA</i> C(-15)T	2
<i>katG</i> S315N และ <i>inhA</i> G(-13)T	0
<i>katG</i> S315N และ <i>inhA</i> C(-15)T	0
ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> และ/หรือยีน <i>inhA</i>	14

จากตารางที่ 17 พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ทั้งหมด 168 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* เพียงยีนเดียวจำนวน 109 ตัวอย่าง (64.9 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) และพบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* เพียงยีนเดียวจำนวน 43 ตัวอย่าง (25.6 % ของเชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid) นอกจากนี้พบว่ามี 2 ตัวอย่าง (1.2 % ของเชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid) ที่ตรวจพบการกลายพันธุ์ของทั้งสองยีน อย่างไรก็ตามพบว่ามีเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 14 ตัวอย่าง (8.3 % ของเชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid) ที่ดื้อต่อยา Isoniazid แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของทั้งยีน *katG* และ/หรือยีน *inhA* (รูปที่ 11)

โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ส่งผลให้ดื้อยา Isoniazid คือ *katG* S315T ซึ่งพบได้มากถึง 108 ตัวอย่าง (64.3 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) และตำแหน่งถัดมาที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสอง คือ *inhA* C(-15)T จำนวน 42 ตัวอย่าง (25.0 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid)

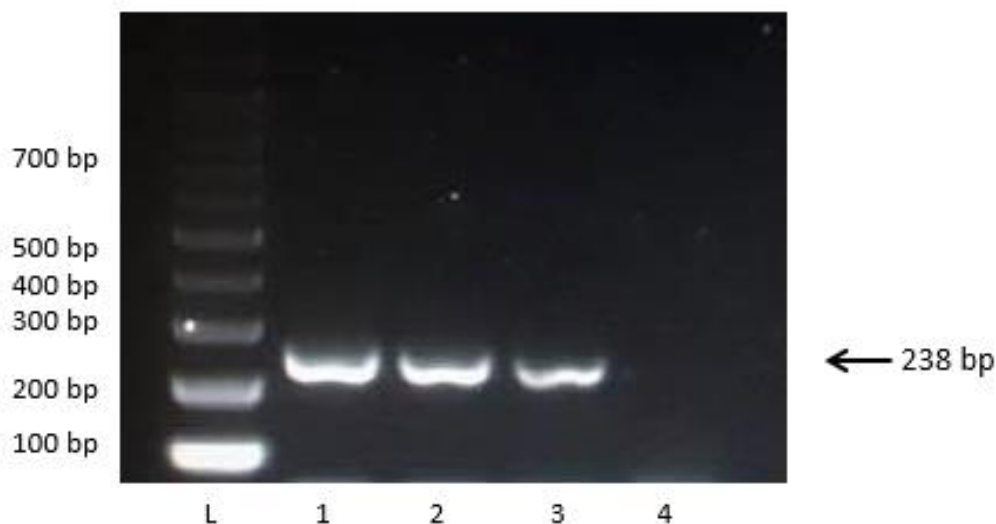


รูปที่ 11 สัดส่วนการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ/หรือยีน *inhA* ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง ซึ่งส่งผลให้เชื้อดื้อยา Isoniazid

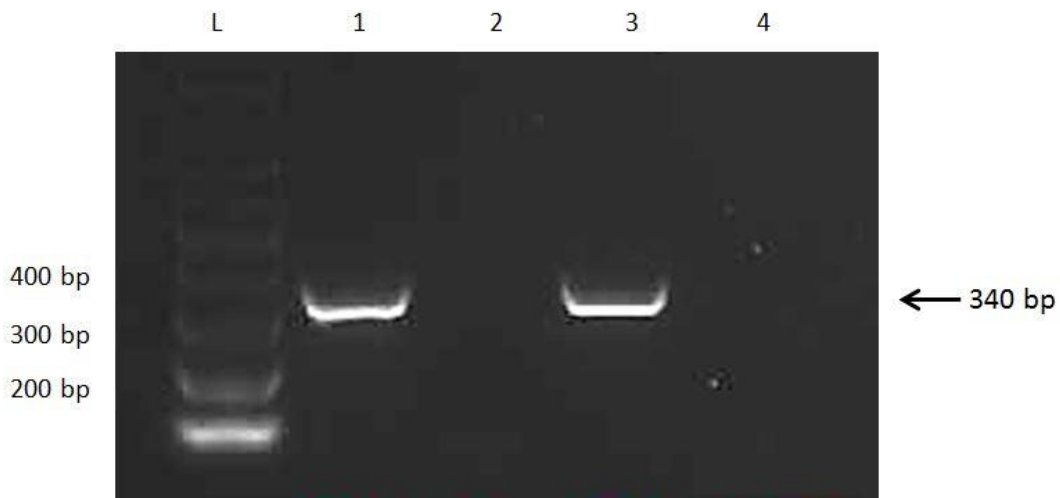
4. ผลการทดสอบ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ด้วยเทคนิค PCR

ภายหลังจากนำ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 ยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนือยีน (-15) มาทดสอบเบื้องต้นในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อสายพันธุ์ตัวแทน ซึ่งประกอบไปด้วยดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) สายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง พบว่าสามารถพบแถบผลผลิต PCR ของยีน IS1081 ขนาด 238 bp ได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 3 ตัวอย่าง (รูปที่ 12) ในขณะที่พบผลผลิต PCR ของยีน *katG* 315 ขนาด 340 bp เฉพาะในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ซึ่งเชื่อดังกล่าวทั้งสองไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 (รูปที่ 13) ในทางกลับกันพบผลผลิต PCR ของยีน *inhA* (-15) ขนาด 128 bp เฉพาะในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 ซึ่งเชื่อดังกล่าวทั้งสองไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15)

(รูปที่ 14) ดังนั้น Primer ที่ถูกออกแบบข้างต้นสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและจำแนกการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตรงตำแหน่งลำดับเบสที่จำเพาะได้ ซึ่ง Primer ทั้งหมดได้ถูกนำไปใช้ต่อไปในปฏิกิริยา MAS-PCR ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 12 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 ด้วย IS1081 primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % แถว L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ 1 แสดงผลของตัวควบคุมบวก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ พบแถบของผลผลิตขนาด 238 คู่เบส แถวที่ 2 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถวที่ 3 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ซึ่งทั้งแถวที่ 2 และ 3 พบแถบของผลผลิตขนาด 238 คู่เบส และแถวที่ 4 แสดงผลของตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 13 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *katG* ด้วย *katG* 315 primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % แฉว L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แฉวที่ 1 แสดงผลของตัวควบคุมบวก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* พบแถบของผลผลิตขนาด 340 คู่เบส แฉวที่ 2 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 ไม่พบแถบของผลผลิต แฉวที่ 3 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบของผลผลิตขนาด 340 คู่เบส และแฉวที่ 4 แสดงผลของตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 14 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *inhA* ด้วย *inhA* (-15) primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % แฉว L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แฉวที่ 1

แสดงผลของตัวควบคุมบวก ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* พบแถบของผลผลิตขนาด 128 คู่เบส แถวที่ 2 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบของผลผลิตขนาด 128 คู่เบส แถวที่ 3 แสดงผลของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ไม่พบแถบของผลผลิต และแถวที่ 4 แสดงผลของตัวควบคุมลบ ซึ่งเป็นน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

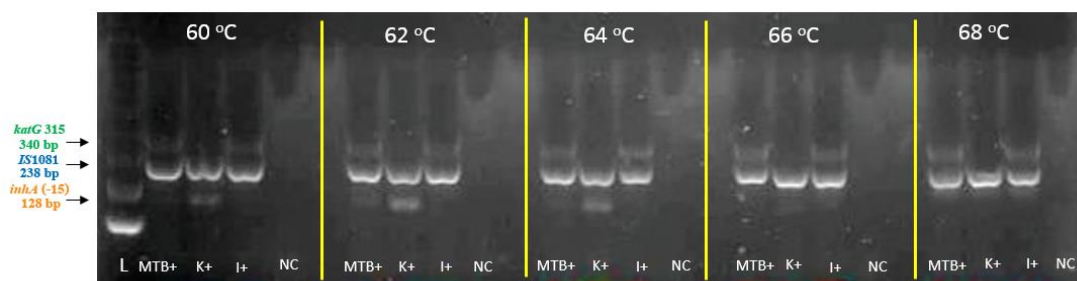
5. ผลการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ภายหลังการหาสถานะของปฏิกิริยา MAS-PCR และสถานะการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่เหมาะสม สำหรับวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยยีน IS1081 ควบคู่ไปกับตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และ ยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 ยีน *katG* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และให้ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปตรวจสอบบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % และพบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นแถบสีฟ้าบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งประกอบไปด้วย อุณหภูมิ Annealing ความเข้มข้นของ Primer จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของ dNTP ความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads สัดส่วนการเจือจางผลผลิต และเวลาอ่านผลการทดสอบของแถบ Dipstick chromatography ดังรายละเอียดที่แสดงด้านล่าง

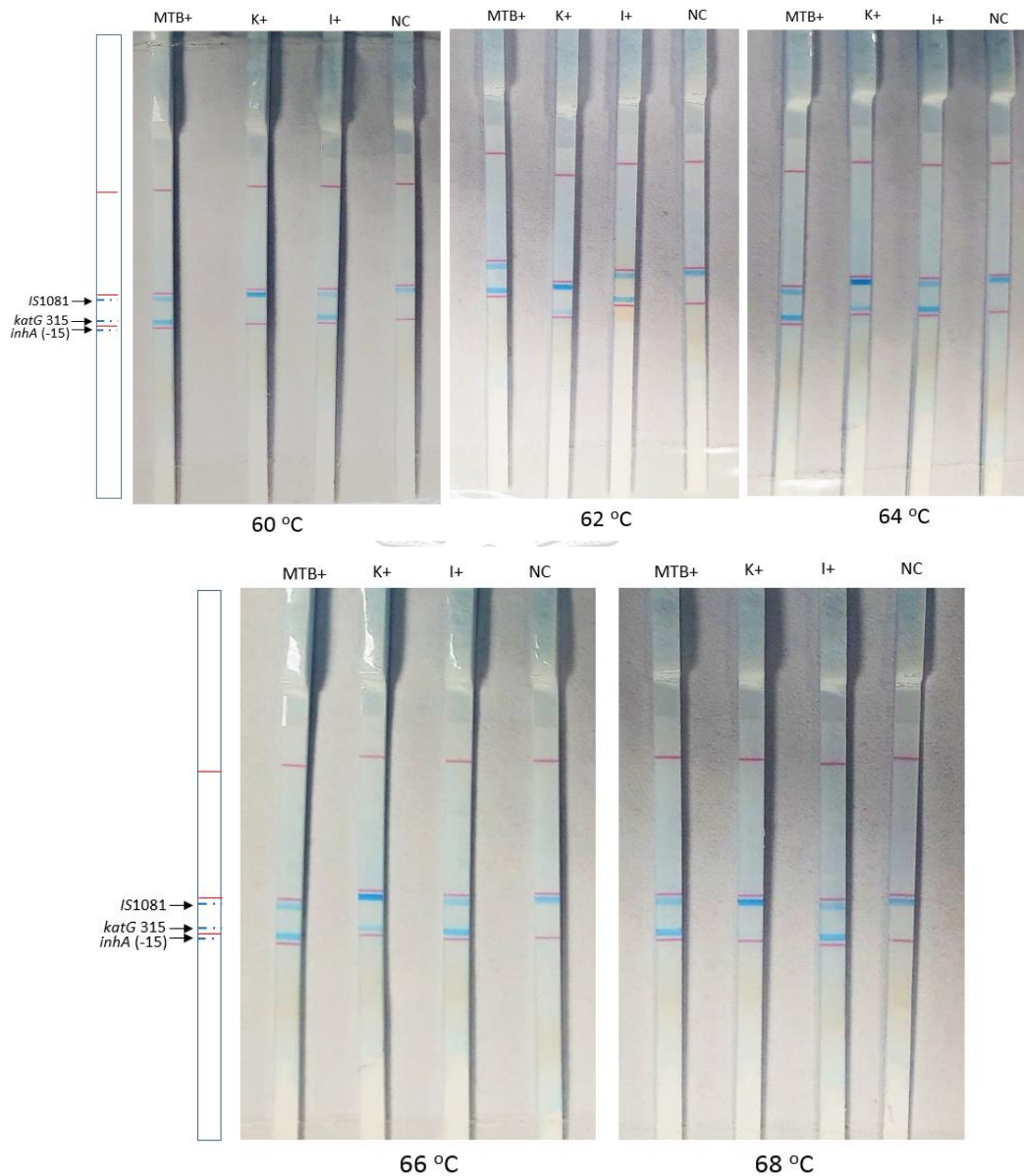
5.1 อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ภายหลังกนำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 μ M ดำเนินปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้อุณหภูมิ Annealing ต่างๆ ได้แก่ 60, 62, 64, 66 และ 68 °C เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel

electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน(-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 15) โดยอุณหภูมิที่เห็นแถบผลผลิตที่ถูกต้องชัดเจนที่สุดไม่ปรากฏผลบวกปลอมที่ตัวควบคุมลบ คือ 62 °C เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่าในแต่ละอุณหภูมิให้แถบบนแผ่นทดสอบไม่ตรงตามเป้าหมาย โดยพบแถบผลบวกปลอมของยีน *katG* 315 ในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และในตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบของยีน *inhA* (-15) ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 ในขณะที่พบแถบยีน IS1081 ถูกต้องในทุกตัวอย่าง แต่พบผลบวกปลอมที่ตัวควบคุมลบ (รูปที่ 16) ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกอุณหภูมิ 62 °C โดยอ้างอิงจากผลการตรวจสอบที่เห็นชัดที่สุดบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ไปใช้พัฒนาสถานะของปฏิกิริยา MAS-PCR ในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 15 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR จากการหาอุณหภูมิ Annealing ที่ 60, 62, 64, 66 และ 68 °C บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % โดยผลผลิตที่พบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีขนาดเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR จากการหาอุณหภูมิ Annealing ที่ 60, 62, 64, 66 และ 68 °C บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ katG 315 และ inhA (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน inhA ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน

315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.2 ความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

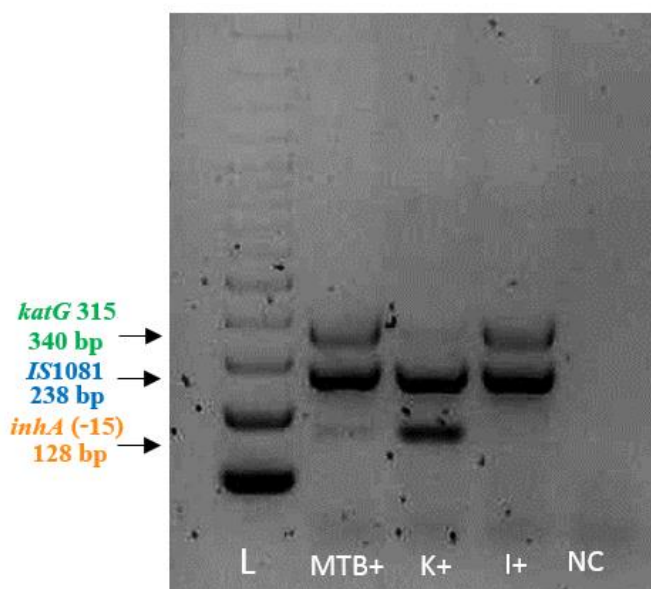
ภายหลังได้อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสมแล้ว นำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ Primer ความเข้มข้นต่างๆ ดังสรุปในตารางที่ 3 ของบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ดำเนินปฏิกิริยา MAS-PCR และใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 62 °C เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % และแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลการทดสอบของ Primer แต่ละชุดตามรายละเอียดด้านล่าง

5.2.1 Primer ชุดที่ 1

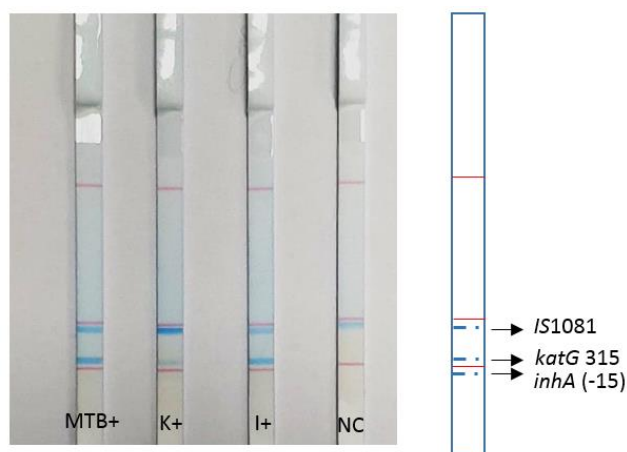
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 1 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.1, 0.2 และ 0.4 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG*315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และแถบผลผลิตของยีน *inhA* ที่มีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และพบผลบวกปลอมของแถบผลผลิตของยีน *katG* 315 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 17)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และแถบผลบวกปลอมของยีน *katG* 315 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบพบแถบผลบวกปลอมของยีน IS1081 (รูปที่ 18) ดังนั้นพิจารณาลดความเข้มข้นของ IS1081 primer และ *katG* 315 primer ลงเพื่อลด

การแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.1, 0.2 และ 0.4 μM ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว คือ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



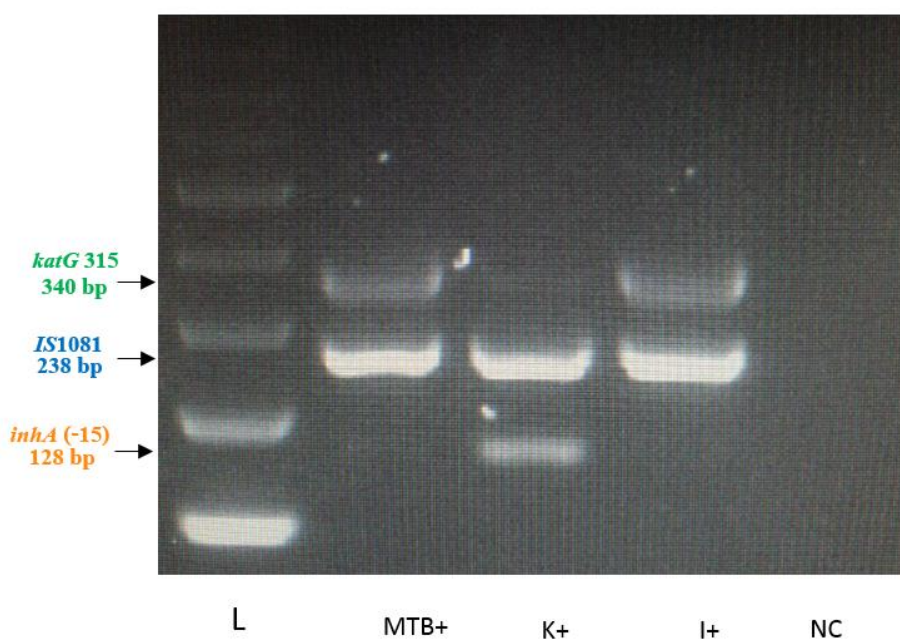
รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.1, 0.2 และ 0.4 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.2.2 Primer ชุดที่ 2

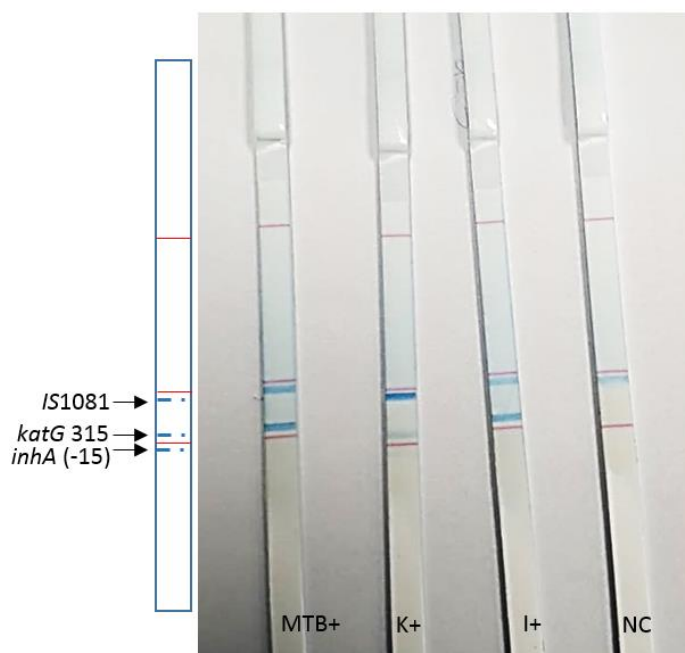
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 2 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.08, 0.2 และ 0.6 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และแถบผลผลิตของยีน *inhA* (-15) ยังคงมีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และยังคงพบผลบวกปลอมของแถบผลผลิตของยีน *katG* 315 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 19)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน

katG ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 3 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* และยีน *inhA* (-15) ซึ่งมีลักษณะไม่ชัดเจน และแถบผลบวกปลอมของยีน *katG* 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบพบแถบผลบวกปลอมของยีน *IS1081* (รูปที่ 20) ดังนั้นพิจารณาลดความเข้มข้นของ *IS1081* primer ลงเพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ *IS1081* primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.08, 0.2 และ 0.6 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถวนับ NC คือตัวควบคุมลบ



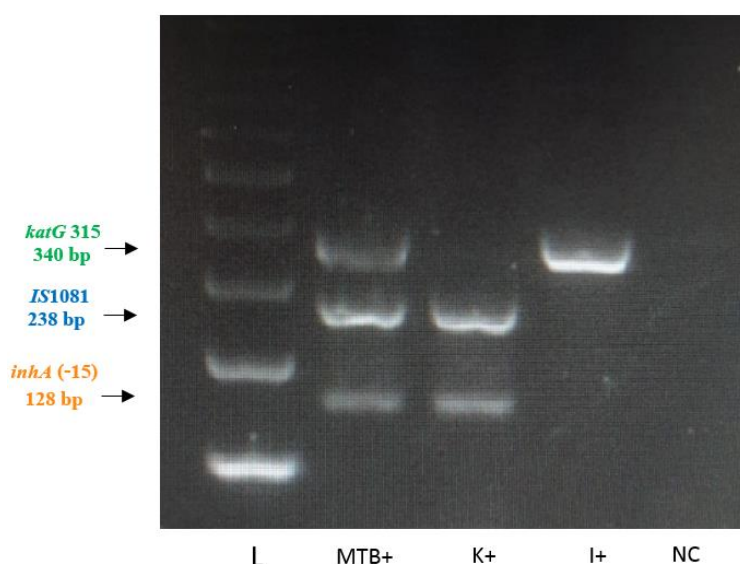
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.08, 0.2 และ 0.6 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.2.3 Primer ชุดที่ 3

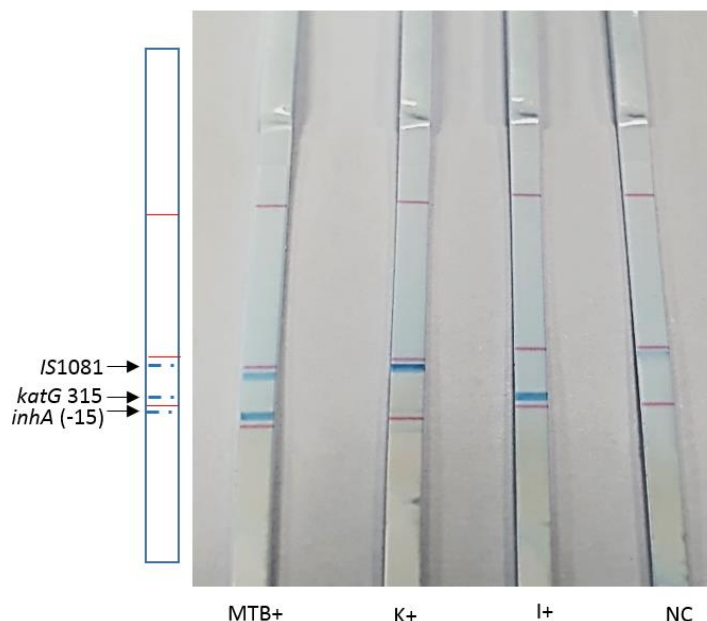
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 3 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.06, 0.15 และ 0.8 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และแถบผลผลิตของยีน *inhA* (-15) มีลักษณะเข้มข้น เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ และไม่พบผลบวกปลอมของแถบผลผลิตของยีน *katG* 315 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต

เพียง 1 แถบของยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 340 คู่เบส และพบผลลบปลอมของผลผลิตของยีน IS1081 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 21)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ซึ่งมีลักษณะจางมาก และแถบผลบวกปลอมของยีน *katG* 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบเพียง 1 แถบ คือ แถบยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบของยีน IS1081 และตัวควบคุมลบพบแถบผลบวกปลอมของยีน IS1081 (รูปที่ 22) ดังนั้นพิจารณาความเข้มข้นของ IS1081 primer และ *katG* 315 primer ลงเพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ในขั้นต่อไป



รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.06, 0.15 และ 0.8 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

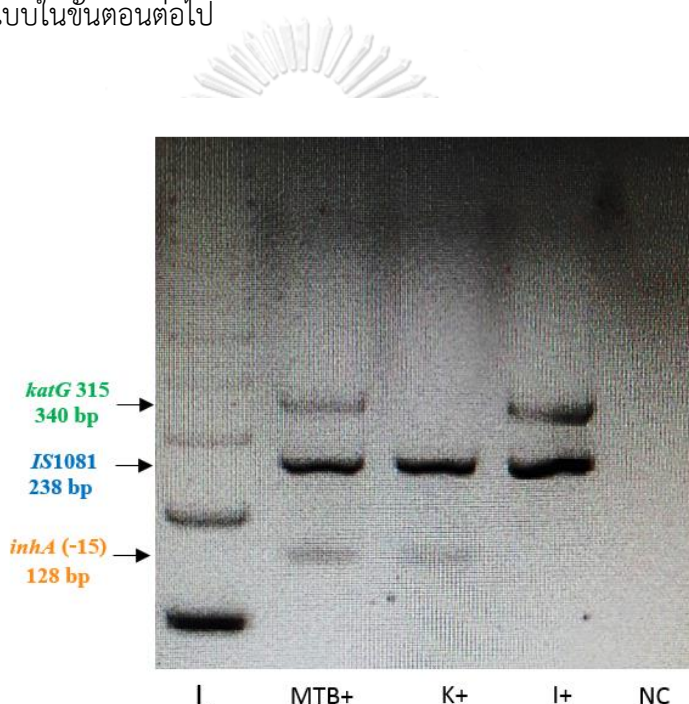


รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.06, 0.15 และ 0.8 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

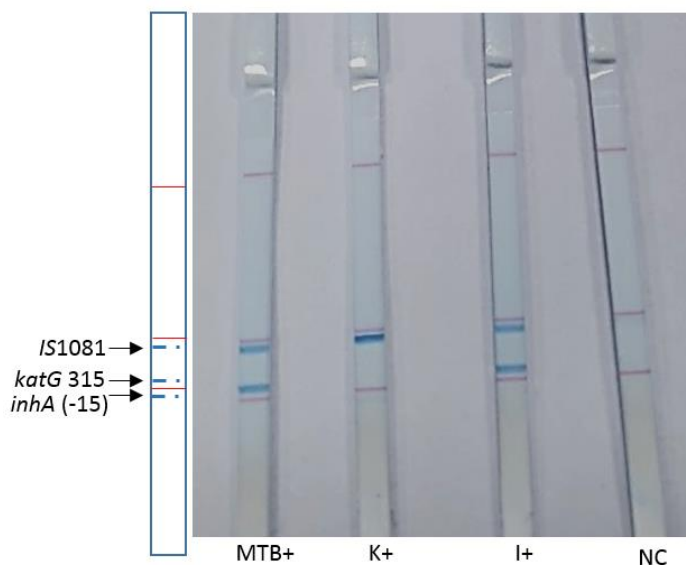
5.2.4 Primer ชุดที่ 4

ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 4 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.04, 0.10 และ 0.8 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าแถบผลผลิตของยีน IS1081 ค่อนข้างเข้มมาก ในขณะที่แถบผลผลิตของยีน *inhA* (-15) ไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับแถบอื่น เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 23)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ซึ่งมีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 24) ดังนั้นพิจารณาลดความเข้มข้นของ IS1081 primer ลงเพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.04, 0.10 และ 0.8 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

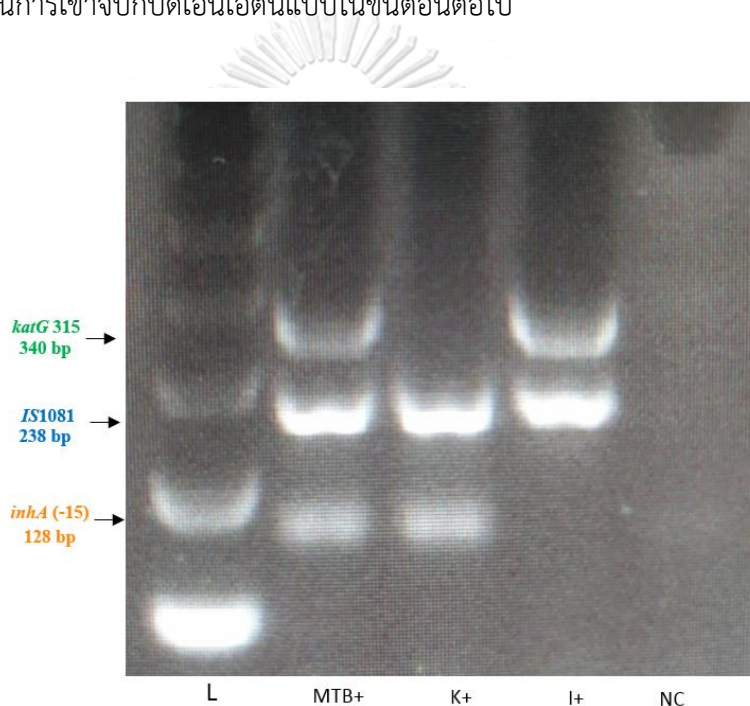


รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.04, 0.10 และ 0.8 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

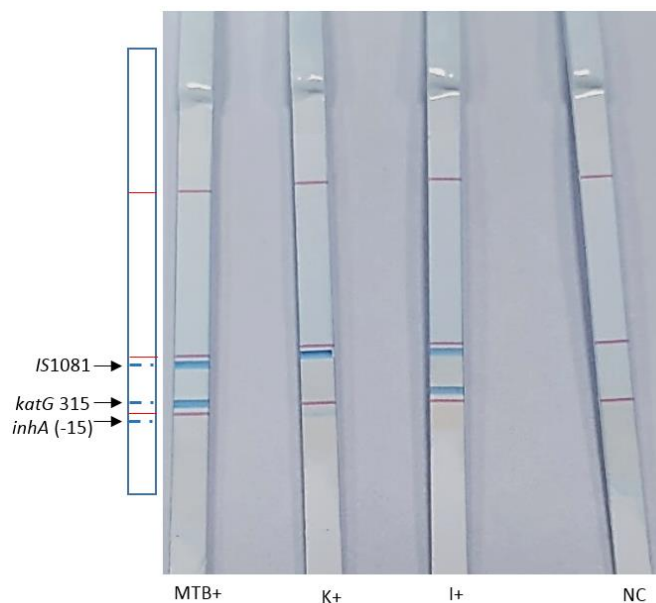
5.2.5 Primer ชุดที่ 5

ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 5 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.03, 0.10 และ 1.0 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน katG 315 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน katG 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 25)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ซึ่งมีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 26) ดังนั้นพิจารณาลดความเข้มข้นของ IS1081 primer และ *katG* 315 primer ลง เพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.03, 0.10 และ 1.0 μM ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

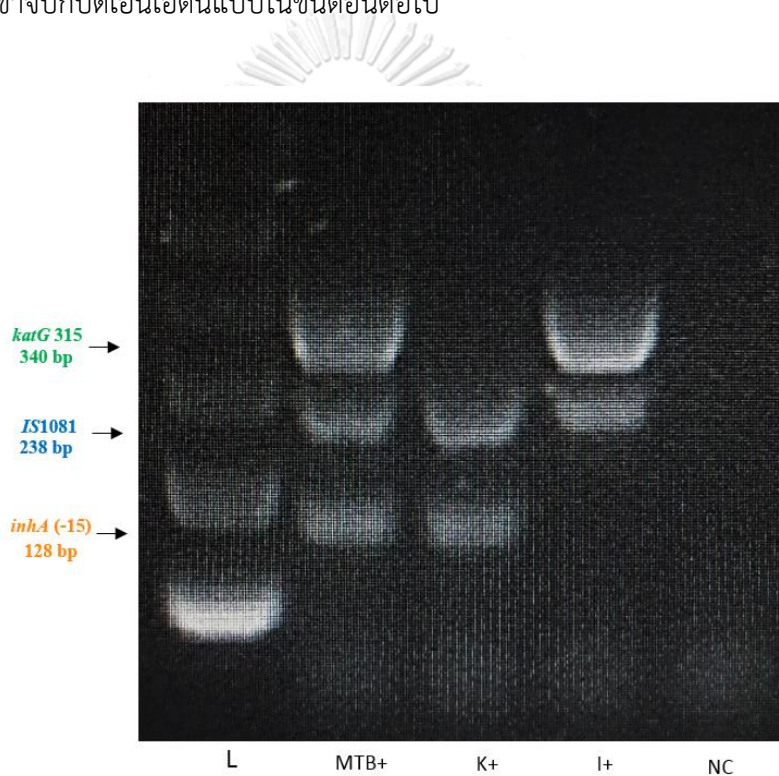


รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.03, 0.10 และ 1.0 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

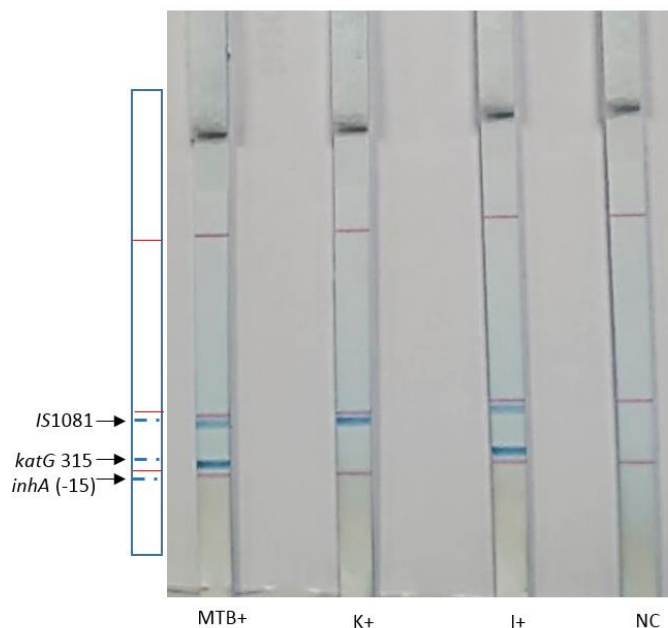
5.2.6 Primer ชุดที่ 6

ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 6 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.08 และ 1.2 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน katG 315 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน katG 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 27)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบเพียง 1 แถบ คือ แถบยีน IS1081 แต่ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 28) ดังนั้นพิจารณาผลความเข้มข้นของ IS1081 primer และ *katG* 315 primer ลง เพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.08 และ 1.2 μM ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



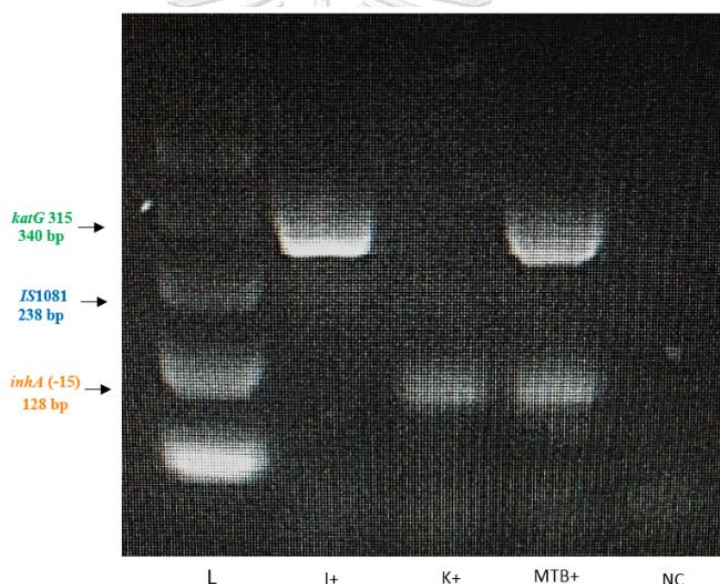
รูปที่ 28 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.08 และ 1.2 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

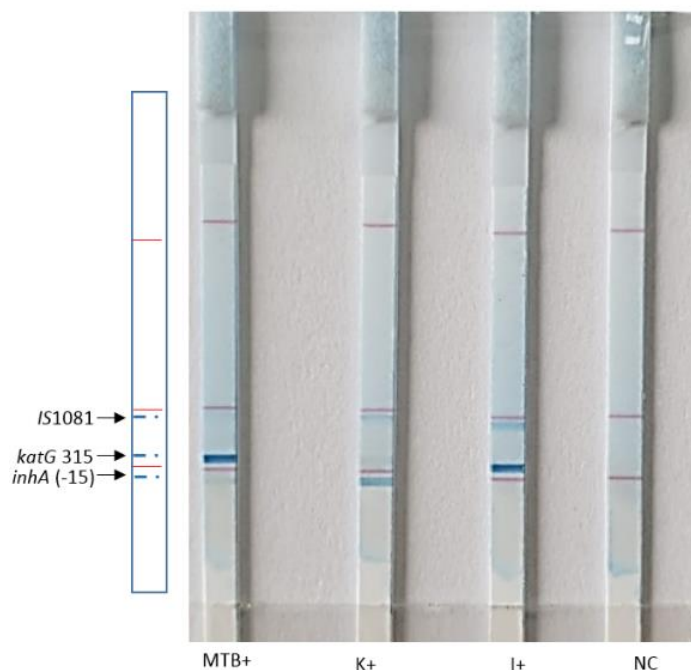
5.2.7 Primer ชุดที่ 7

ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 7 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.01, 0.06 และ 1.4 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตเพียง 2 แถบของยีน katG 315 และยีนและ inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 1 แถบของยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 128 คู่เบส เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 1 แถบของยีน katG 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 340 คู่เบส ทั้งนี้ในแต่ ละตัวอย่างไม่สามารถพบแถบผลผลิตของยีน IS1081 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 29

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวกเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) แต่ไม่พบแถบยีน IS1081 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) และแถบผลบวกปลอมของยีน *katG* 315 เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 30) ดังนั้นพิจารณาจากความเข้มข้นของ IS1081 primer ขึ้นไปให้เท่ากับการทดลองขั้นก่อนหน้า ร่วมกับลดความเข้มข้นของ *katG* 315 primer ลง เพื่อลดการแย่งจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ และเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 29 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.01, 0.06 และ 1.4 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



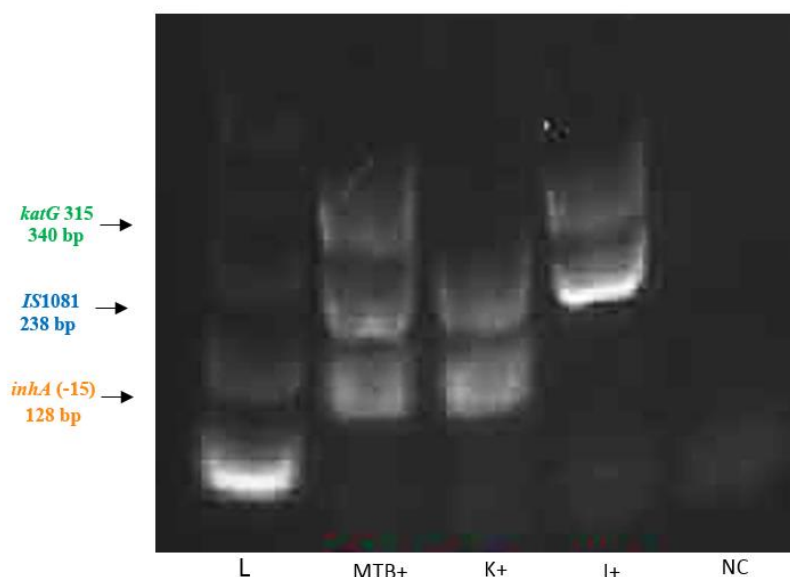
รูปที่ 30 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.01, 0.06 และ 1.4 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.2.8 Primer ชุดที่ 8

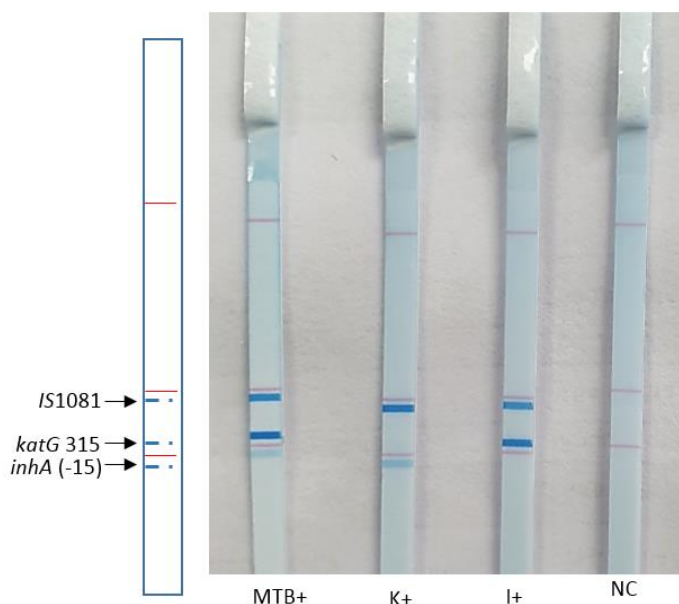
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 8 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.6 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน katG 315 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน inhA (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของ

ยีน *IS1081* และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 31)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวก 3 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ซึ่งมีลักษณะไม่ชัดเจน เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 32) ดังนั้นพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 31 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 81 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ *IS1081* primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.6 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



รูปที่ 32 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 8 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 8 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.6 μM ตามลำดับ บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

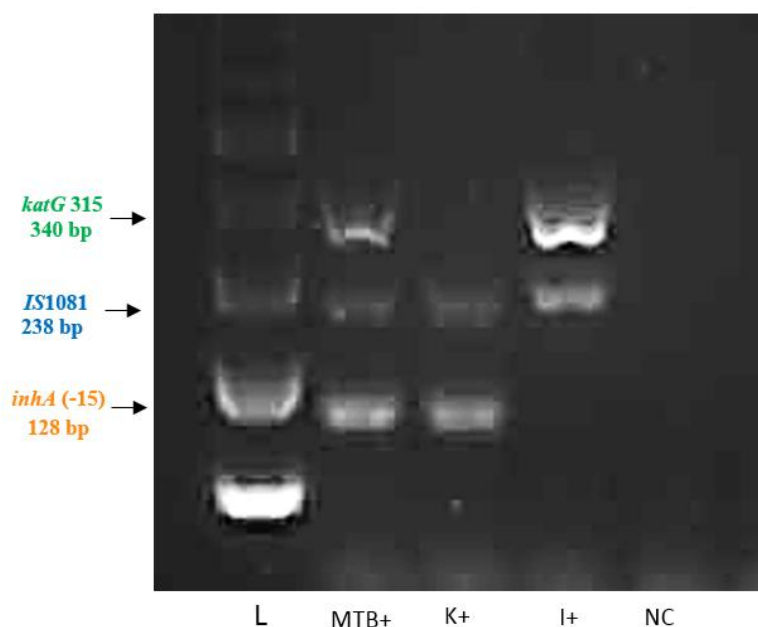
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.2.9 Primer ชุดที่ 9

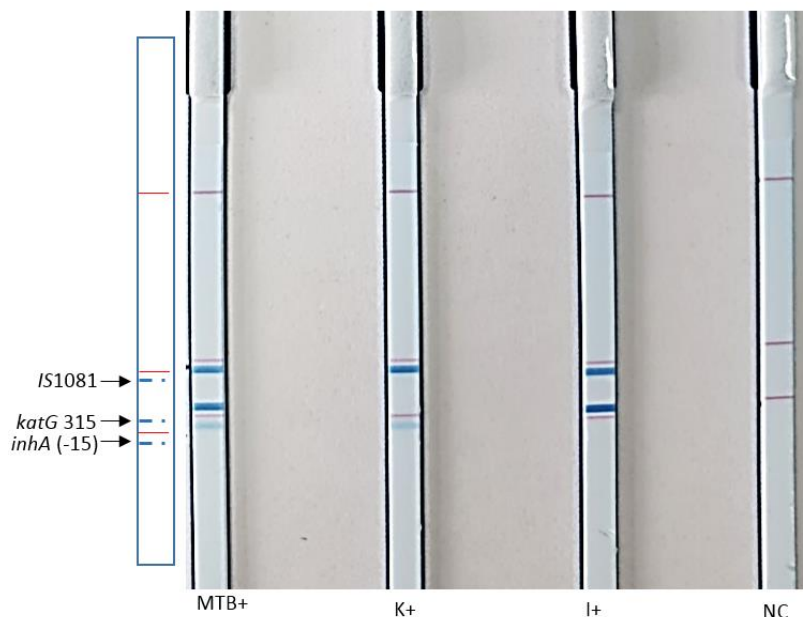
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 9 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของ

ยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 33)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวก 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ (รูปที่ 34)



รูปที่ 33 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



รูปที่ 34 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และ แถบ NC คือตัวควบคุมลบ

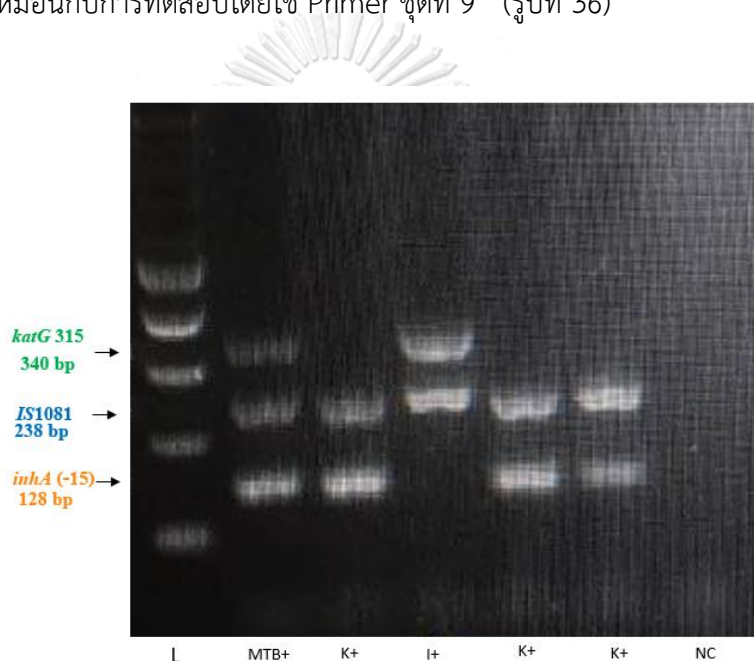
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.2.10 Primer ชุดที่ 10

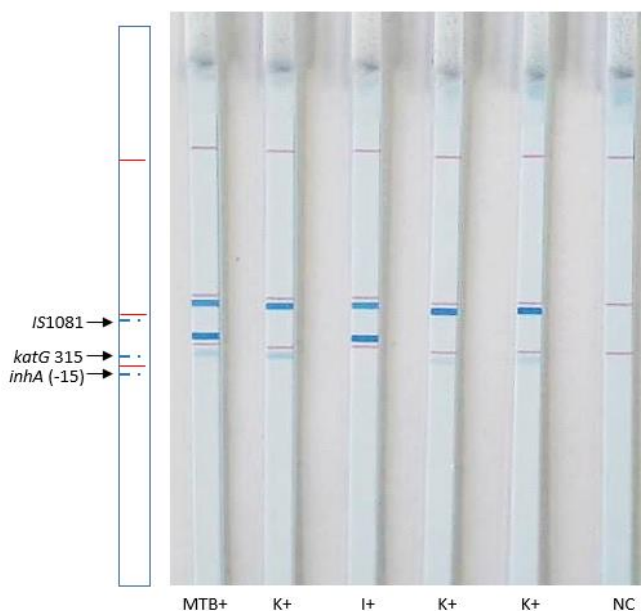
ผลของปฏิกิริยา MAS-PCR จากการใช้ Primer ชุดที่ 10 ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 2.0 μM ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ และตัวควบคุม

ลบไม่พบแถบผลผลิต (รูปที่ 35) โดยผลของปฏิกิริยาให้ผลเหมือนกับการทดสอบโดยใช้ Primer ชุดที่ 9

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวก 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏซึ่งตรงตามเป้าหมายที่กำหนดไว้ โดยผลของปฏิกิริยาให้ผลเหมือนกับการทดสอบโดยใช้ Primer ชุดที่ 9 (รูปที่ 36)



รูปที่ 35 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10 บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 2.0 μ M ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



รูปที่ 36 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่มีความเข้มข้นของ IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 2.0 μM ตามลำดับ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

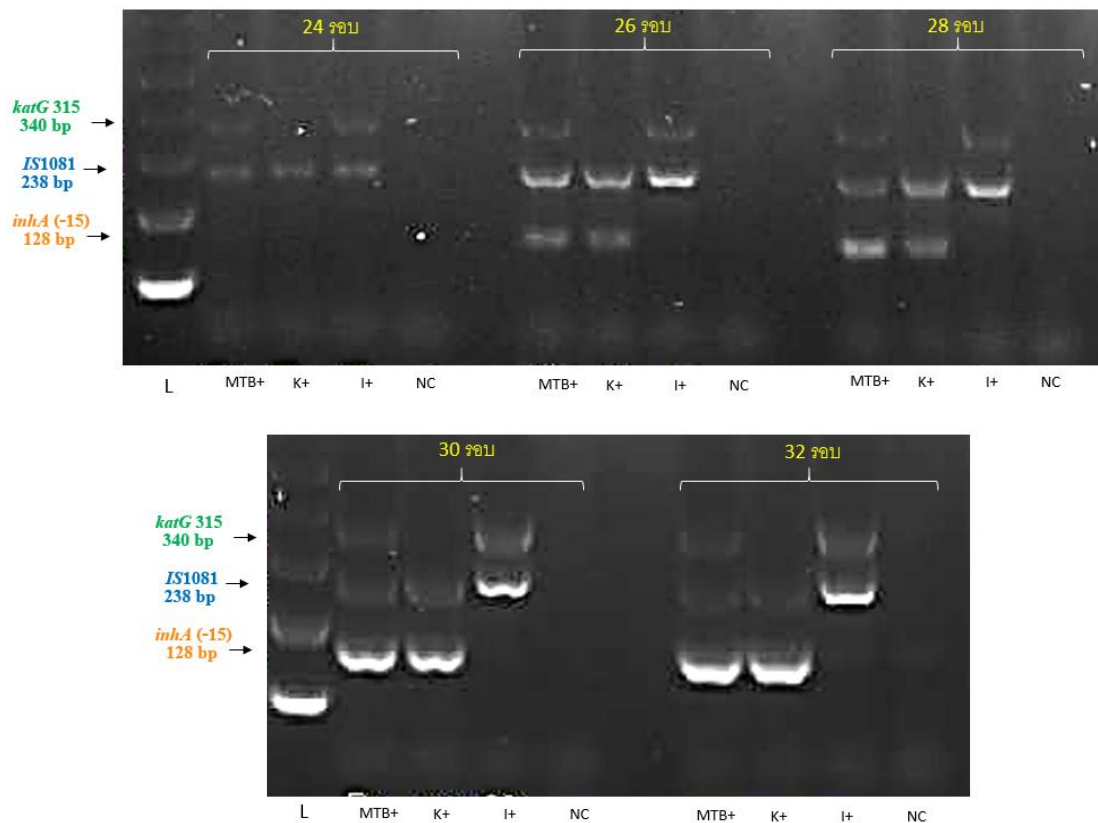
จากการทดสอบความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ด้วย Primer ทั้ง 10 ชุด พบว่าความเข้มข้น IS1081 primer, katG 315 primer และ inhA (-15) primer เท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μM ตามลำดับ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ทำปฏิกิริยา MAS-PCR เมื่อตรวจสอบบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความเข้มข้นน้อยที่สุด แต่ยังคงให้ผลปฏิกิริยาชัดเจนบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2%

5.3 จำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

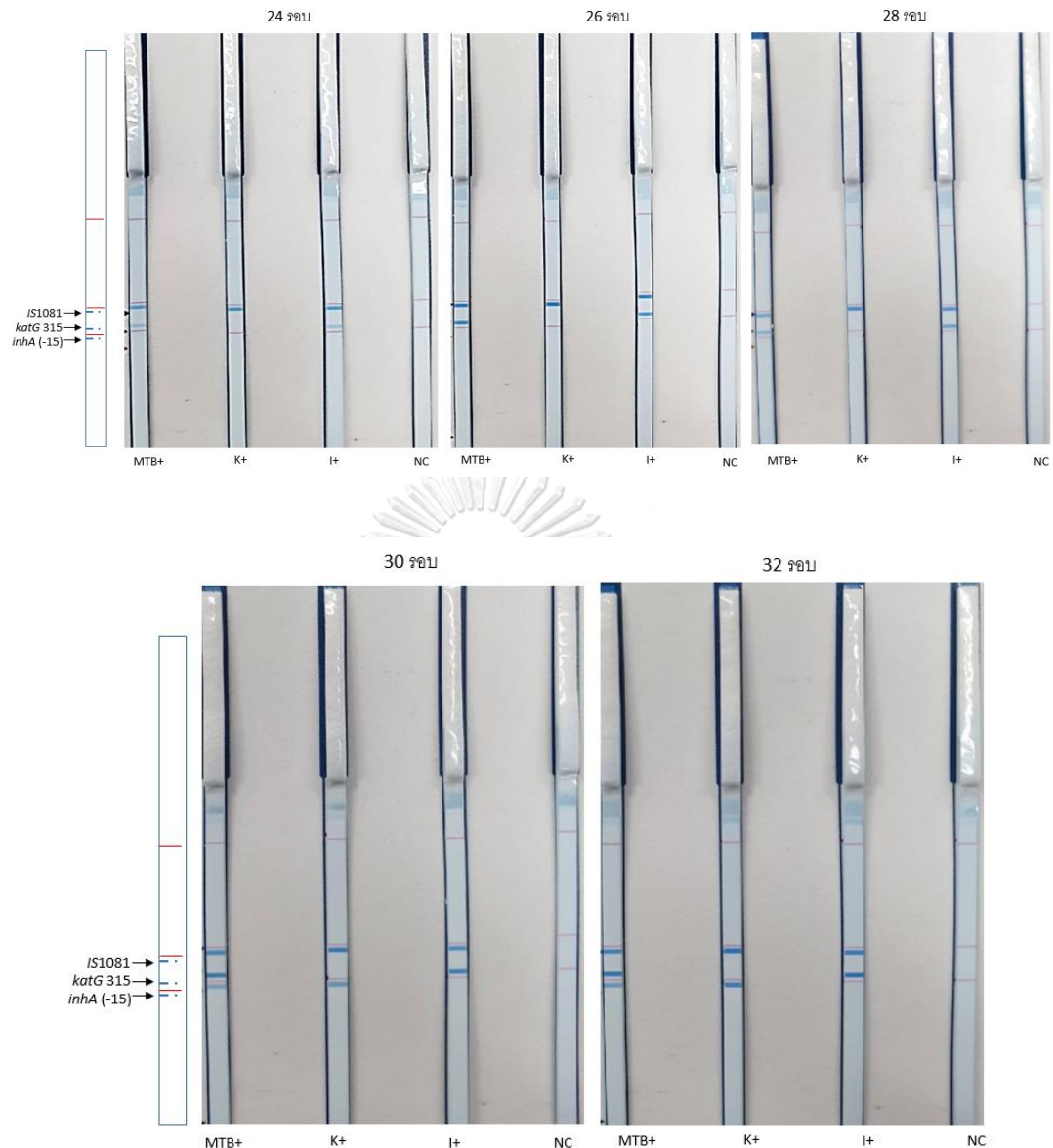
ภายหลังได้อุณหภูมิ Annealing และความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมแล้ว นำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของ

ยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μM ตามลำดับ ดำเนินปฏิกิริยา MAS-PCR และใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 62 °C เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % พบว่าที่จำนวนรอบ 24 รอบ พบแถบผลผลิตของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ มีลักษณะเป็นแถบไม่ชัดเจน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *inhA* (-15) ในขณะที่จำนวนรอบ 26, 28, 30 และ 32 รอบสามารถพบแถบผลผลิตที่ชัดเจน โดยเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 37)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่าที่จำนวนรอบ 24, 26 และ 28 รอบ ไม่พบแถบของผลยีน *inhA* (-15) ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 ในขณะที่จำนวนรอบ 30 และ 32 รอบ สามารถพบแถบของผลยีนครบถูกต้องตามเป้าหมายที่กำหนด ได้แก่ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวก 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบเพียง 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 38) จำนวนรอบการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ให้ผลปฏิกิริยา MAS-PCR ชัดเจน มีความถูกต้อง และใช้ระยะเวลาในการทดสอบน้อยที่สุด เมื่อตรวจสอบบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% คือ จำนวน 30 รอบ ถึงแม้ว่าที่ 32 รอบปฏิกิริยาจะให้ผลการทดสอบเหมือนกันแต่จำนวนรอบปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เวลาที่ใช้ในการทำ การทดสอบเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน



รูปที่ 37 การตรวจสอบผลผลิตแต่ละจำนวนรอบของปฏิกิริยา MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % ที่จำนวนรอบ 24, 26, 28, 30 และ 32 รอบ โดยผลผลิตที่พบของยีน *IS1081* ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีขนาดเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบสตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ



รูปที่ 38 การตรวจสอบผลผลิตแต่ละจำนวนรอบของปฏิกิริยา MAS-PC บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่ 24, 26, 28, 30 และ 32 รอบ โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของ เชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ katG 315 และ inhA (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน inhA ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG

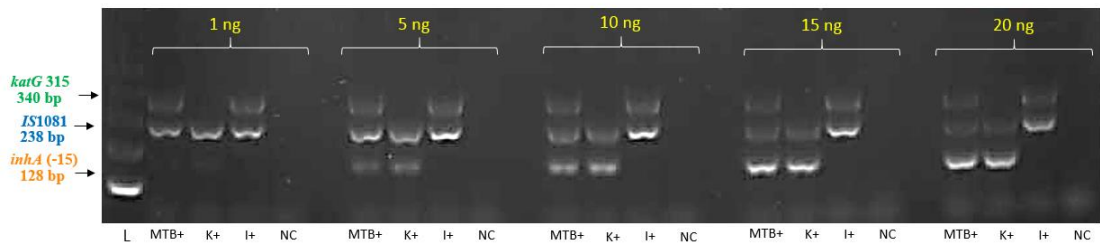
ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของ ยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.4 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

ภายหลังได้อุณหภูมิ Annealing ความเข้มข้นของ Primer และจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมแล้ว นำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ความเข้มข้น 1,5,10,15 และ 20 ng เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μ M ตามลำดับ ดำเนินปฏิกิริยา MAS-PCR จำนวน 30 รอบ และใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 62 °C เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % พบว่าดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 ng พบแถบผลผลิตของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *inhA* (-15) ในขณะที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 ng สามารถพบแถบผลผลิตของยีนทั้งสามยีน โดยเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 39)

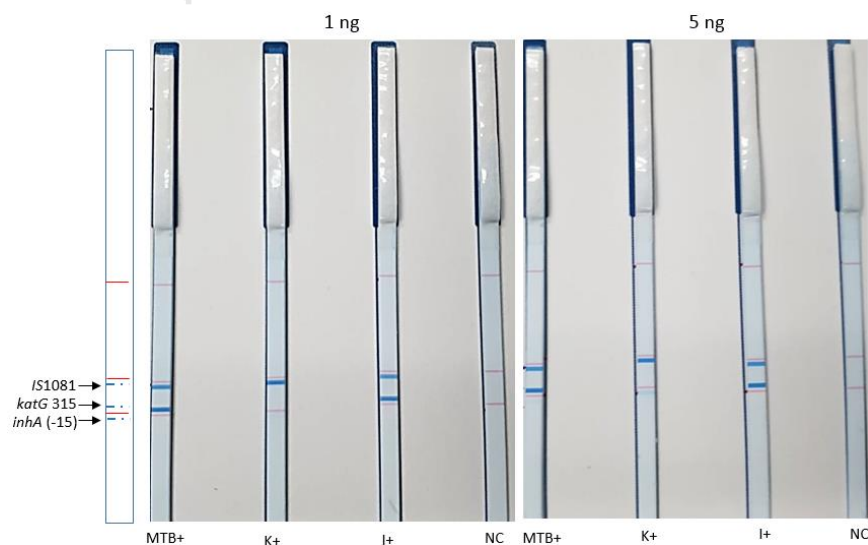
เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่าดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 และ 5 ng ไม่พบแถบของผลยีน *inhA* (-15) ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และพบแถบของยีน *inhA* (-15) ในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน ในขณะที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 และ 15 ng พบแถบของผลยีน *inhA* (-15) ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 20 ng สามารถพบแถบของผลยีนครบถูกต้องตามเป้าหมายที่กำหนด ได้แก่ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลบวก 3 แถบ คือ แถบยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA*

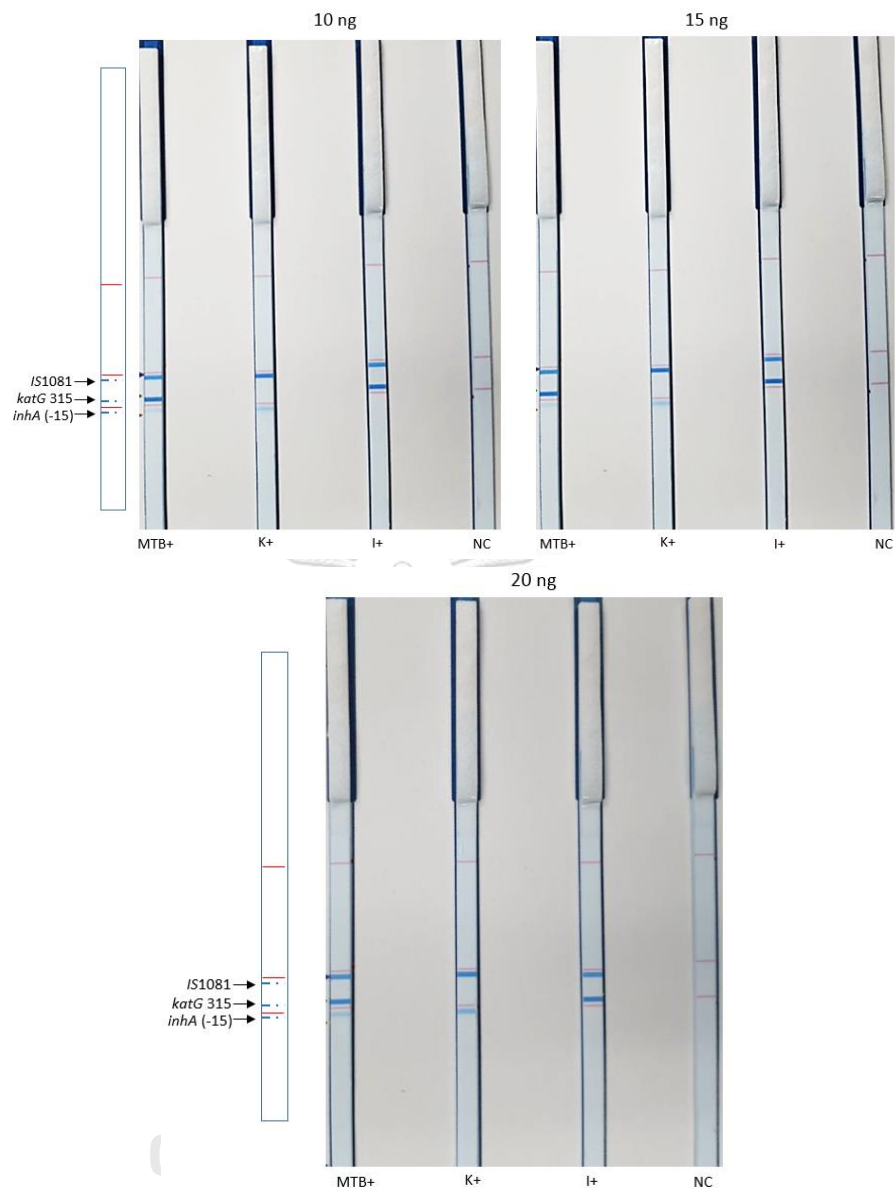
ตำแหน่งเหนี่ยวยีน (-15) พบแถบ 2 แถบ คือ แถบยีน *IS1081* และยีน *katG* 315 และตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 40) ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ให้ผลปฏิกิริยา MAS-PCR ชัดเจน เมื่อตรวจสอบบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และสอดคล้องกับผลการตรวจสอบบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% คือ ดีเอ็นเอ 20 ng



รูปที่ 39 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR กับดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณต่างๆ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2% ดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 1,5,10,15 และ 20 ng โดยผลผลิตที่พบของยีน *IS1081* ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีขนาดเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนี่ยวยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



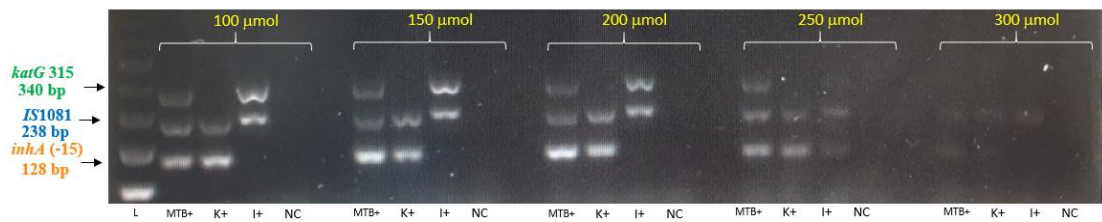


รูปที่ 40 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR กับดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณต่างๆ บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ดีเอ็นเอต้นแบบที่ปริมาณ 1,5,10,15 และ 20 ng โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ katG 315 และ inhA (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน katG ตำแหน่ง โคดอน 315 และยีน inhA ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

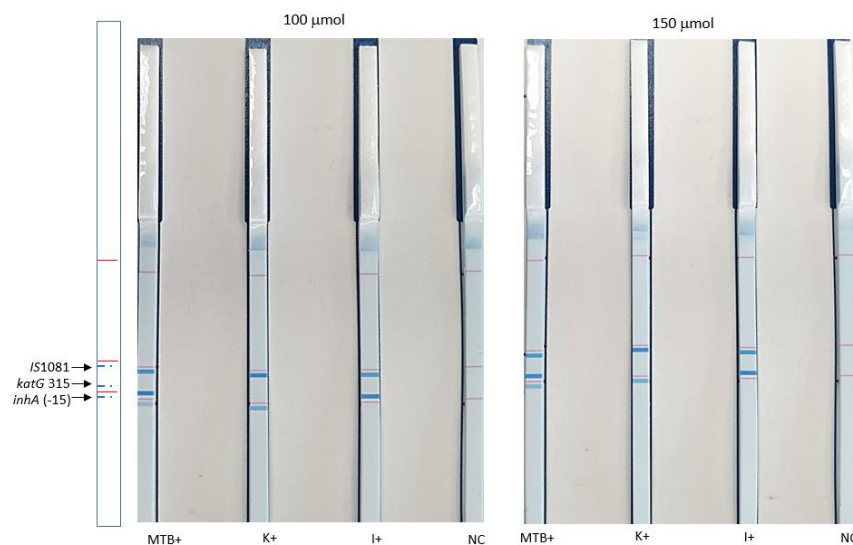
5.5 ความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR

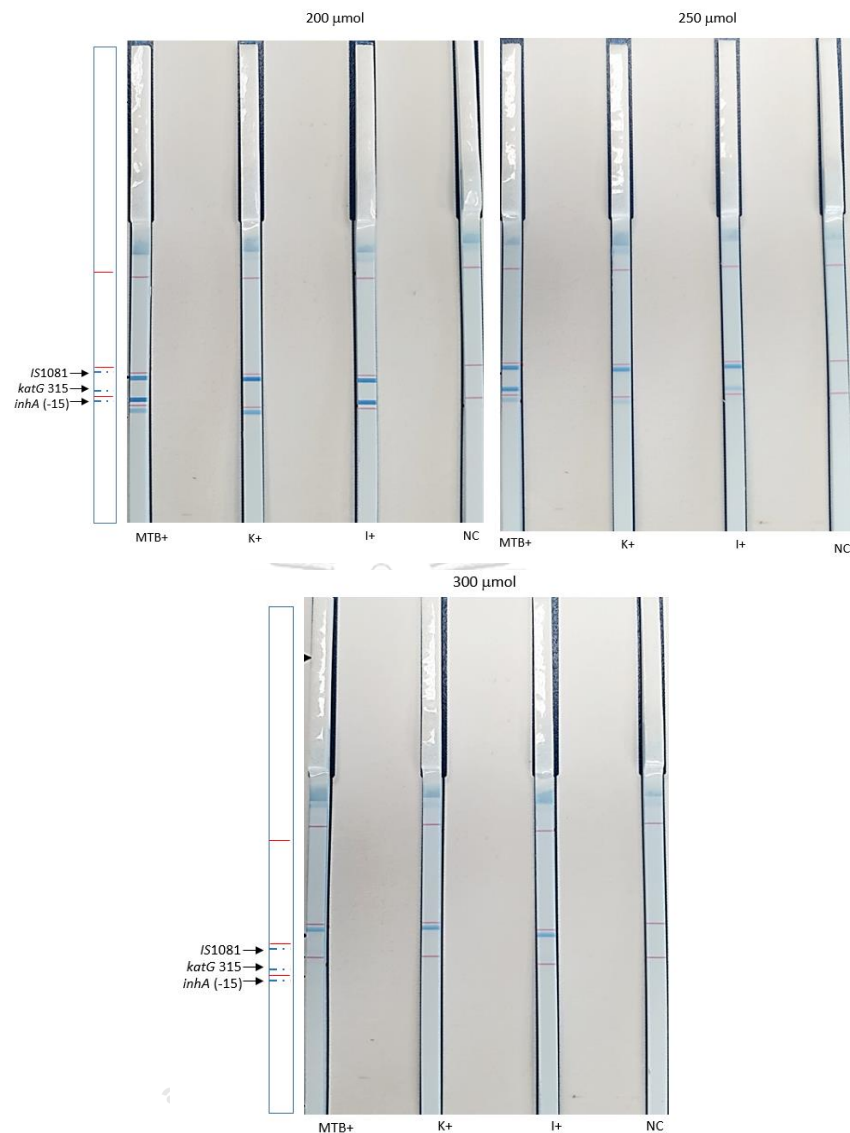
ภายหลังได้อุณหภูมิ Annealing ความเข้มข้นของ Primer จำนวนรอบการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมแล้ว นำดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ความเข้มข้น 20 ng เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ IS1081 primer, *katG* 315 primer และ *inhA* (-15) primer ทั้ง 3 คู่พร้อมกัน ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.04 และ 1.8 μM ตามลำดับ และใช้ dNTP ความเข้มข้น 100, 150, 200, 250 และ 300 μM ดำเนินปฏิกิริยา MAS-PCR จำนวน 30 รอบ และใช้อุณหภูมิ Annealing ที่ 62 °C เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % พบว่า dNTP ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 μM พบแถบผลผลิตที่ถูกต้องชัดเจน โดยเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิตทั้ง 3 แถบของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *inhA* (-15) ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) พบแถบผลผลิต 2 แถบของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 ขนาดผลผลิตเท่ากับ 238 และ 340 คู่เบส ตามลำดับ ในขณะที่ dNTP ความเข้มข้น 250 μM พบแถบผลผลิตไม่ชัดเจน และความเข้มข้น 300 μM พบแถบผลผลิตไม่ชัดเจน และแถบผลผลิตของยีน *katG* 315 ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ (รูปที่ 41)

เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่า dNTP ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 μM พบแถบของผลยีน IS1081 ,ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ชัดเจนในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ อย่างไรก็ตาม dNTP ความเข้มข้น 250 μM พบแถบของผลยีน *inhA* (-15) มีลักษณะไม่ชัดเจนในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และแถบผลยีน *katG* 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ในขณะที่ dNTP ความเข้มข้น 300 μM ไม่พบแถบของผลยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ในเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ (รูปที่ 42) ดังนั้นความเข้มข้น dNTP ที่ 100 μM เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดแต่ยังคงให้ผลปฏิกิริยา MAS-PCR ถูกต้องและชัดเจนเมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และเทคนิค Agarose gel electrophoresis



รูปที่ 41 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อทดสอบกับ dNTPs ความเข้มข้นต่างๆ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % โดยมีความเข้มข้นของ dNTPs ความเข้มข้น 300, 250, 200, 150 และ 100 μM โดยผลผลิตที่พบของยีน *IS1081* ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีขนาดเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

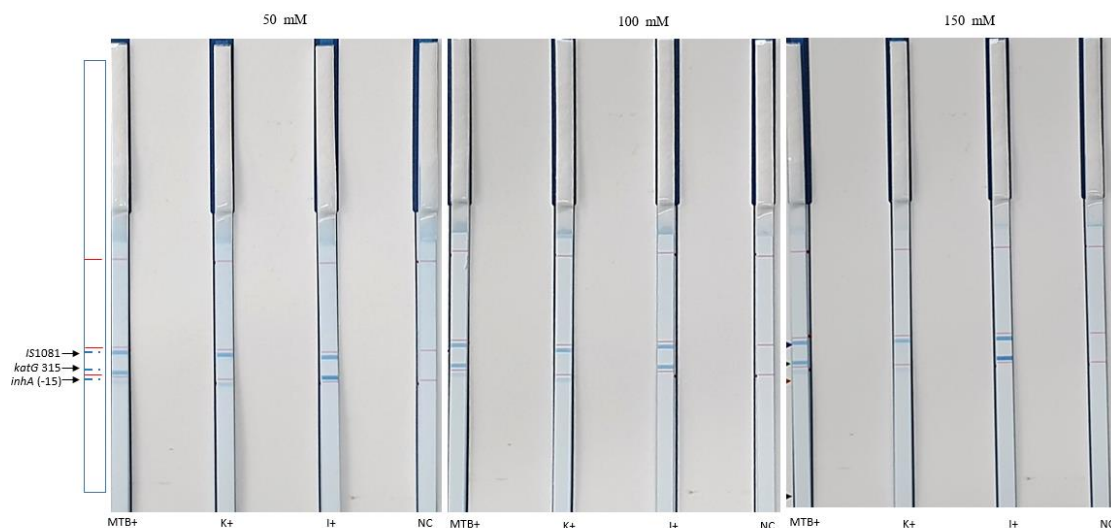


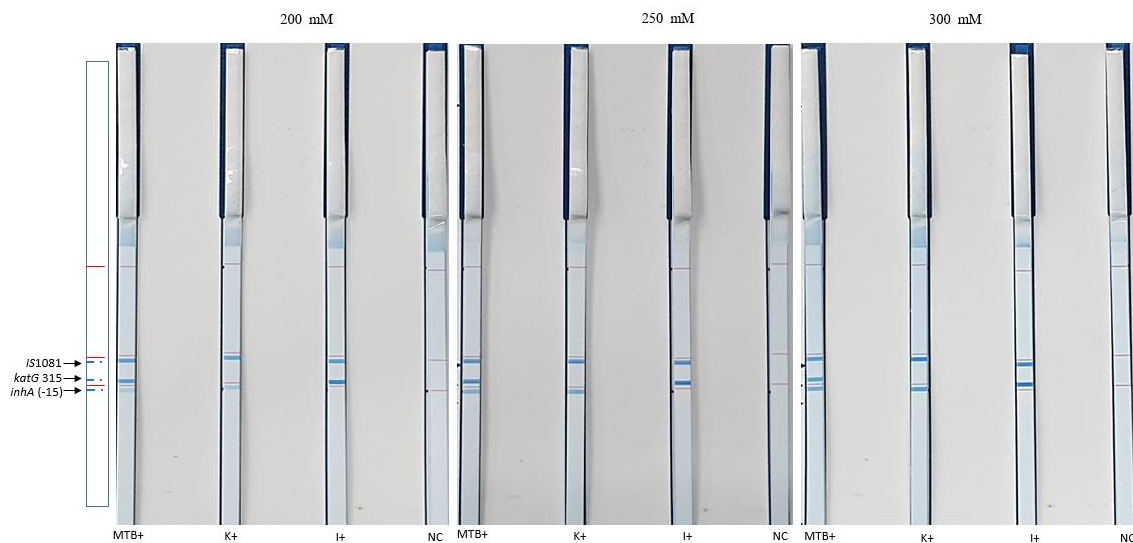


รูปที่ 42 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR เมื่อทดสอบกับ dNTPs ความเข้มข้นต่างๆ บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยมีความเข้มข้นของ dNTPs 300,250,200,150 และ 100 μM โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ *katG* 315 และ *inhA* (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.6 ความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่เหมาะสม

ผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ถึง 5.5 ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยใช้ Dipstick developing buffer ที่ความเข้มข้นของ NaCl 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 mM ปริมาตร 10 μ l ผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l และนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่ออ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 50, 100 และ 150 mM พบแถบผลของยีน *inhA* (-15) ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน ในขณะที่พบแถบผลของยีน *IS1081* และยีน *katG* 315 มีลักษณะชัดเจนในเชื้อทุกสายพันธุ์ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 200 mM สามารถพบแถบผลของยีน *inhA* (-15) ที่มีความเข้มมากขึ้น ในขณะที่ Dipstick developing buffer ที่ความเข้มข้นของ NaCl 250 และ 300 mM สามารถพบแถบผลของยีน *IS1081*, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ที่มีความเข้มชัดเจนในเชื้อทุกสายพันธุ์ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 43) ดังนั้นความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer ที่เหมาะสมเท่ากับ 250 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยสุดที่ให้ผลการตรวจสอบปฏิกิริยา MAS-PCR ชัดเจน เมื่อตรวจสอบบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography



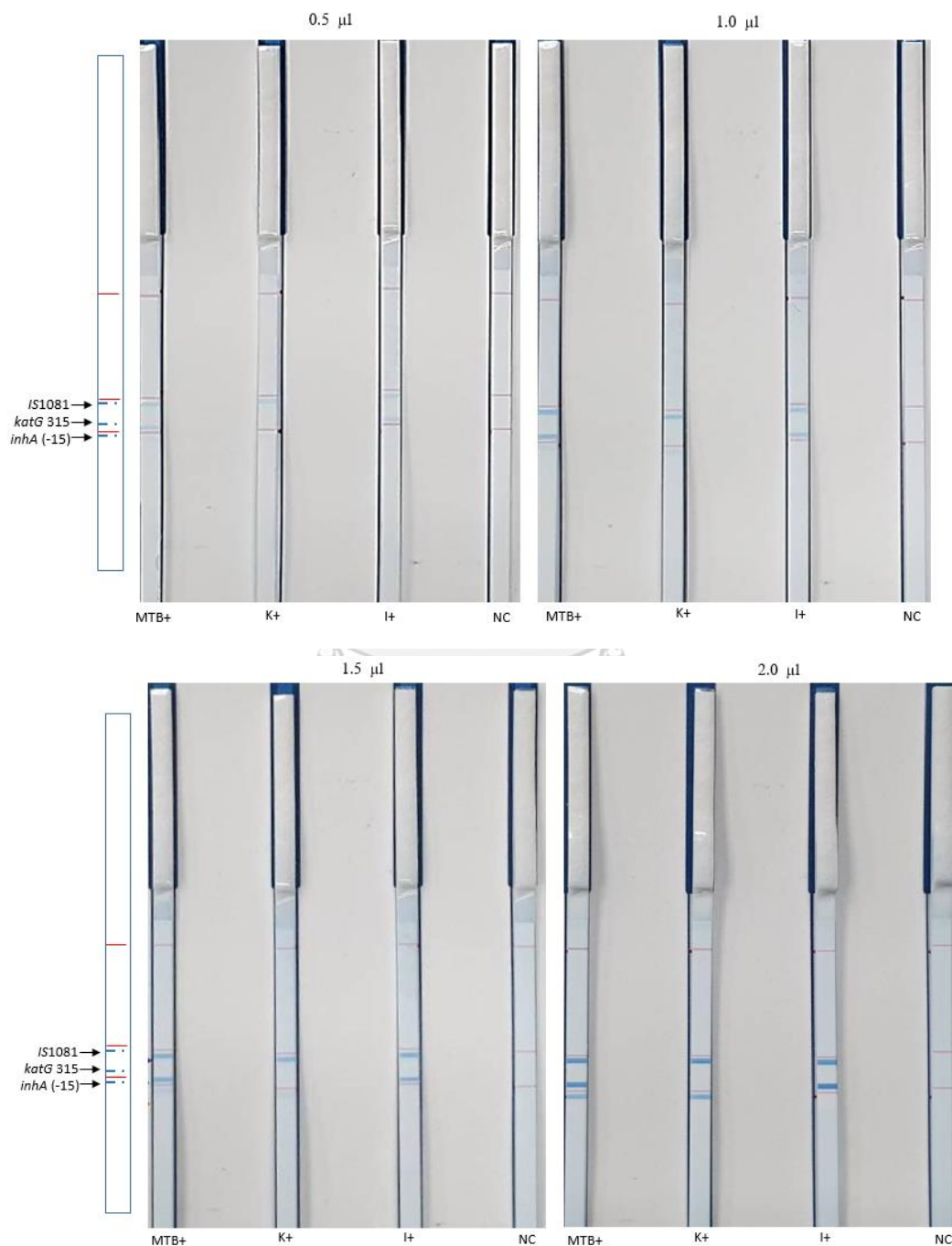


รูปที่ 43 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับ Dipstick developing buffer ที่ NaCl ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 mM โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ *katG* 315 และ *inhA* (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.7 ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสม

ผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ถึง 5.5 ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยใช้ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 250 mM ปริมาตร 10 μ l และผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 0.5, 1, 1.5 และ 2 μ l เมื่อนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 0.5, 1 และ 1.5 μ l พบแถบผลของยีน IS1081 และยีน *katG* 315 มีลักษณะไม่ชัดเจน ในเชื้อทุกสายพันธุ์ และแถบผลยีน *inhA* (-15) มีลักษณะไม่ชัดเจน ในขณะที่

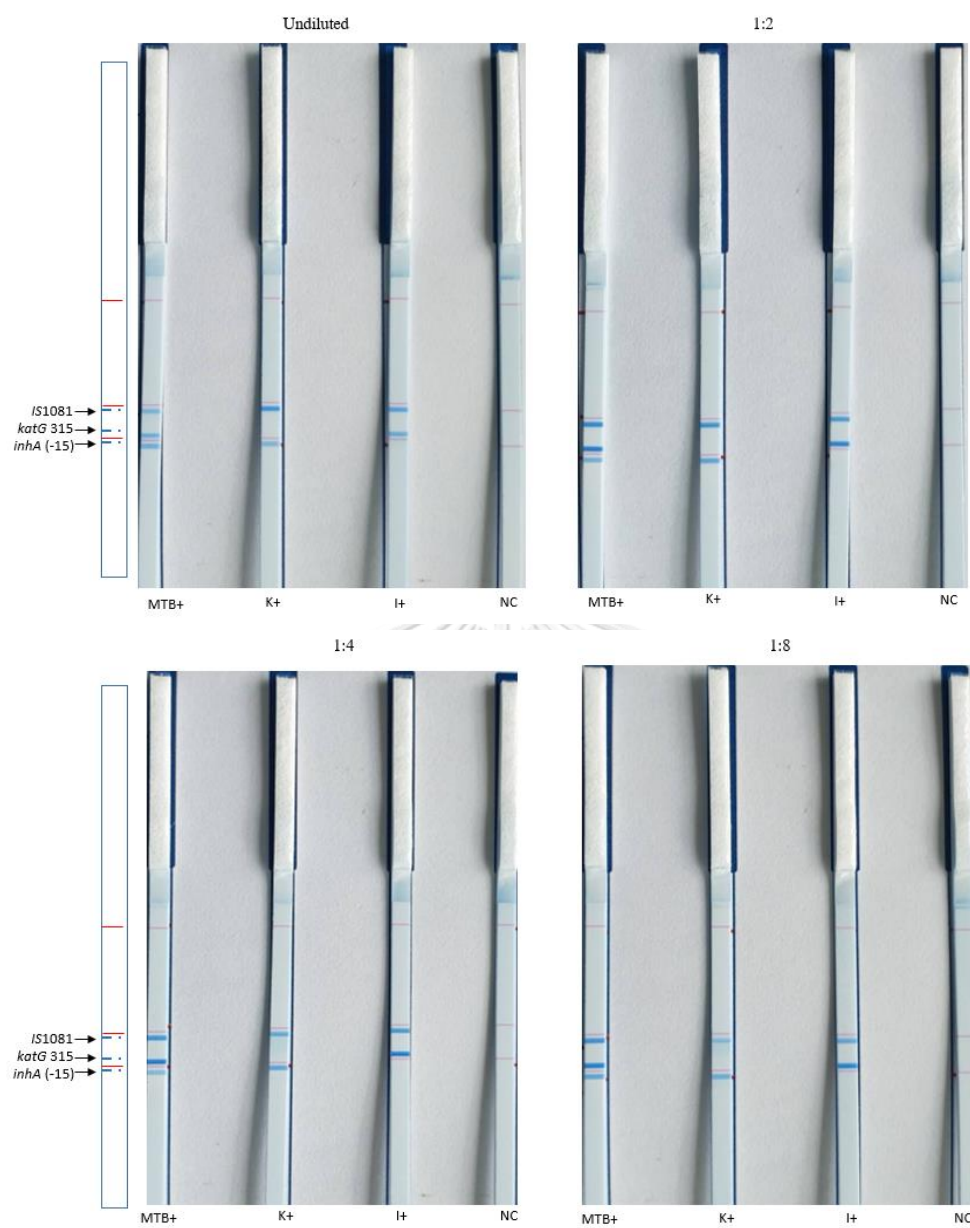
Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μl สามารถพบแถบผลของยีน *IS1081*, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีความเข้มชัดเจนในเชื้อทุกสายพันธุ์ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 44) ดังนั้นปริมาตร Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสมเท่ากับ 2 μl ซึ่งให้ผลการตรวจสอบปฏิกิริยา MAS-PCR ชัดเจน เมื่อตรวจสอบบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography

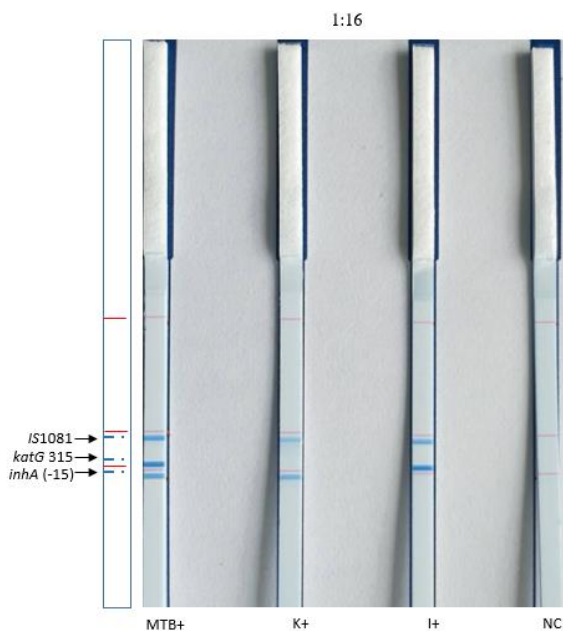


รูปที่ 44 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตรต่างๆ โดย Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตร 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 μl โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ *katG*315 และ *inhA*(-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.8 สัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม

ผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ถึง 5.5 ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เจือจางเป็นสัดส่วนเท่ากับ Undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 ผสมกับ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 250 mM ปริมาตร 10 μl และ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μl เมื่อนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่าสัดส่วนการเจือจางทุกความเข้มข้นสามารถพบแถบผลของยีน IS1081, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ชัดเจนในเชื้อทุกสายพันธุ์ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 45) ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้การเจือจางเท่ากับ Undiluted ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเจือจางเพิ่มเติมในการตรวจวัดผลผลิต



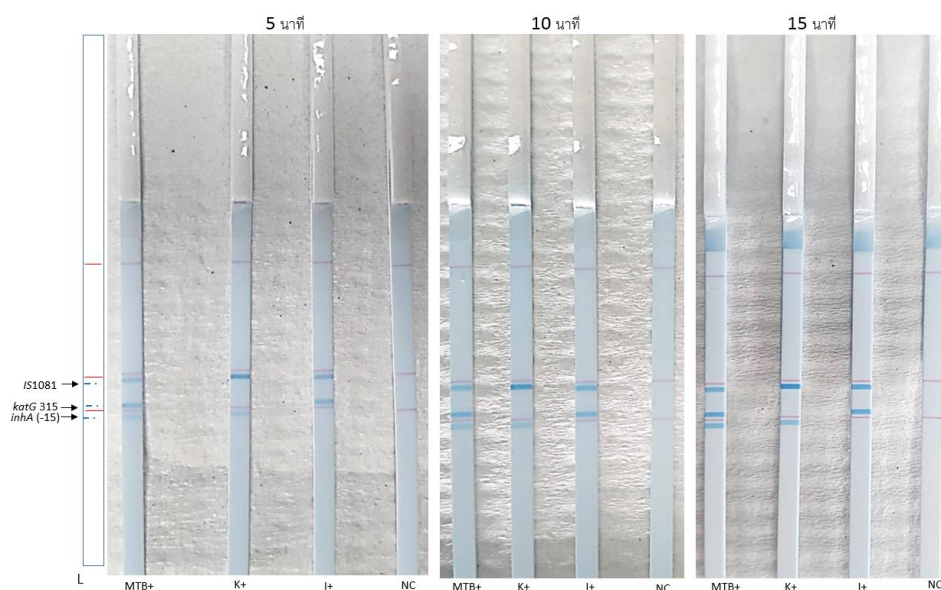


รูปที่ 45 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography กับการเจือจางผลผลิตที่สัดส่วนต่างๆ มีสัดส่วนการเจือจางผลผลิตที่ Undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ *katG* 315 และ *inhA* (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.9 ระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่เหมาะสม

ผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ถึง 5.5 ถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยดูผลผลิต MAS-PCR ปริมาตร 10 μ l ผสมกับ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 250 mM ปริมาตร 10 μ l และ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l เมื่อนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาอ่านผลด้วยตาเปล่าทันที พบว่าระยะเวลาการจุ่มที่ 5 และ 10 นาที สามารถพบ

แถบผลของยีน *IS1081*, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ในเชื้อทุกสายพันธุ์ แต่มีลักษณะจางและมีสีที่ไม่สม่ำเสมอ ในขณะที่ระยะเวลาการจุ่มที่ 15 นาที พบแถบผลของยีน *IS1081*, ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีลักษณะเข้มชัดในเชื้อทุกสายพันธุ์ และตัวควบคุมลบไม่พบแถบใดปรากฏ (รูปที่ 46) ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาการระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography เท่ากับ 15 นาที



รูปที่ 46 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่ออ่านผลที่เวลาต่างกัน โดยอ่านผลการทดสอบหลังจุ่มแผ่นทดสอบลงหลอดตัวอย่างที่ 5, 10 และ 15 นาที โดยแถบ *IS1081* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *IS1081* ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ *katG* 315 และ *inhA* (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ

5.10 สรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG315* และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ภายหลังทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การหาอุณหภูมิ Annealing ความเข้มข้นของ Primer จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และความเข้มข้นของ dNTP ที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา MAS-PCR ร่วมกับสภาวะการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้แก่ ที่ ความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads สัดส่วนการเจือจางผลผลิต และเวลาอ่านผลการทดสอบ ได้ผลสรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 สรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis*

สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ร่วมกับการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	ยีน		
	<i>IS1081</i>	<i>katG</i> 315	<i>inhA</i> (-15)
อุณหภูมิ Annealing	62 °C		
เข้มข้นของ Primer	0.02 µM	0.04 µM	1.8 µM
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	20 ng		
จำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR	30 รอบ		
ความเข้มข้นของ dNTP ในปฏิกิริยา MAS-PCR	100 µM		
ความเข้มข้นของ NaCl ใน Dipstick developing buffer	250 mM		
ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads	2 µl		
สัดส่วนการเจือจางผลผลิต	1:1		
ระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ	15 นาที		

5.11 ค่า Limit of detection (LOD) ของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

นำเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG315* และยีน *inhA* (-15) ของ

เชื้อ *M. tuberculosis* มาทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV (ตัวควบคุมบวก) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ที่ความเข้มข้น 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 ng พบว่าเทคนิค MAS-PCR เมื่อใช้ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Dipstick Chromatography มีค่า LOD เท่ากับการตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % โดยมีค่า LOD เมื่อวินิจฉัยยีน IS1081 และยีน *katG*315 เท่ากับ 2 ng และยีน *inhA* (-15) เท่ากับ 20 ng (รูปที่ 47 และ 48) รายละเอียดของค่า LOD ดังสรุปในตารางที่ 19

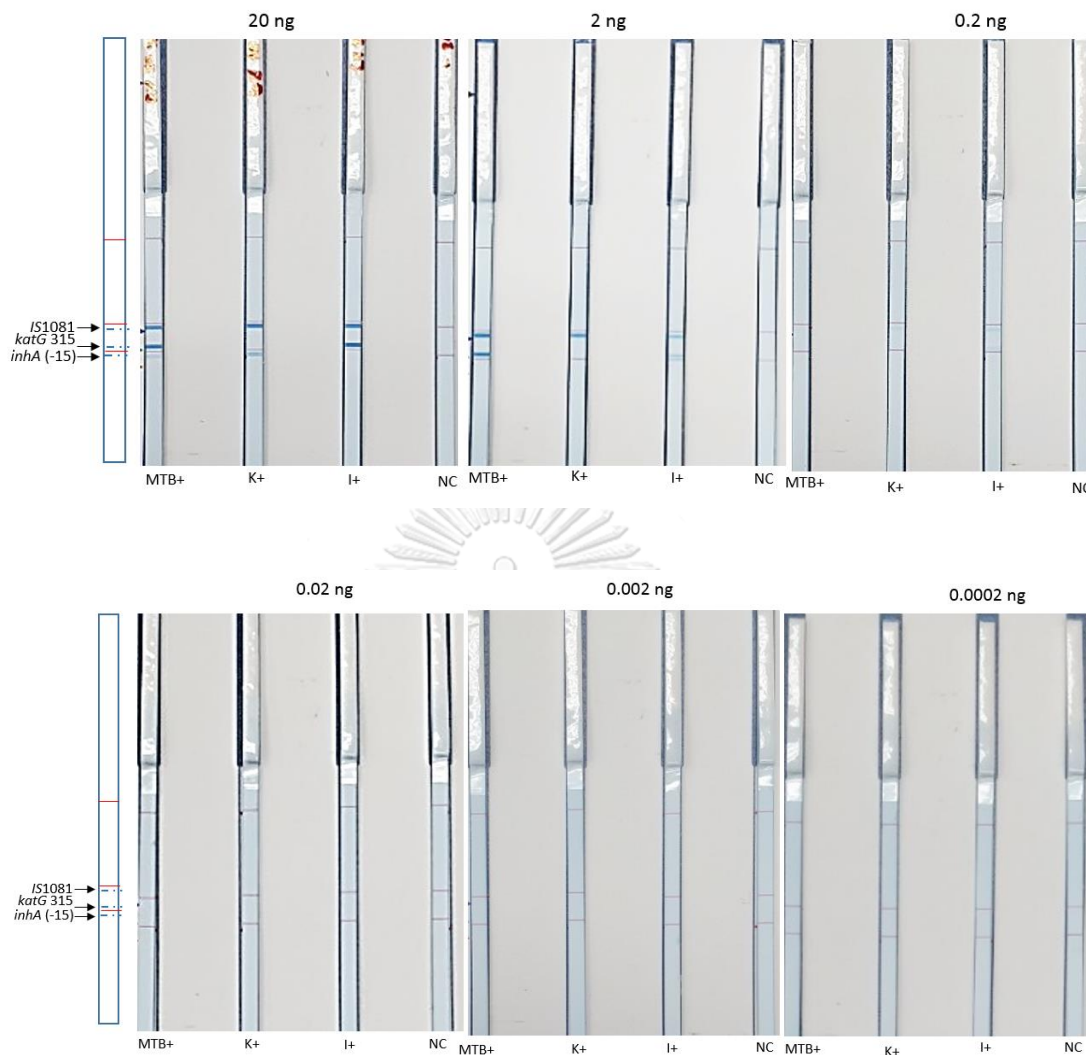
ตารางที่ 19 สรุปความเข้มข้นน้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ปฏิกิริยา MAS-PCR สามารถวินิจฉัยของยีน IS1081 ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ภายหลังจากการตรวจสอบผลผลิตบนแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และ Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %

LOD	ยีน		
	IS1081	<i>katG</i> 315	<i>inhA</i> (-15)
MAS-PCR-DC ¹	2 ng	2 ng	20 ng
AS-RPA-AGE ²	2 ng	2 ng	20 ng

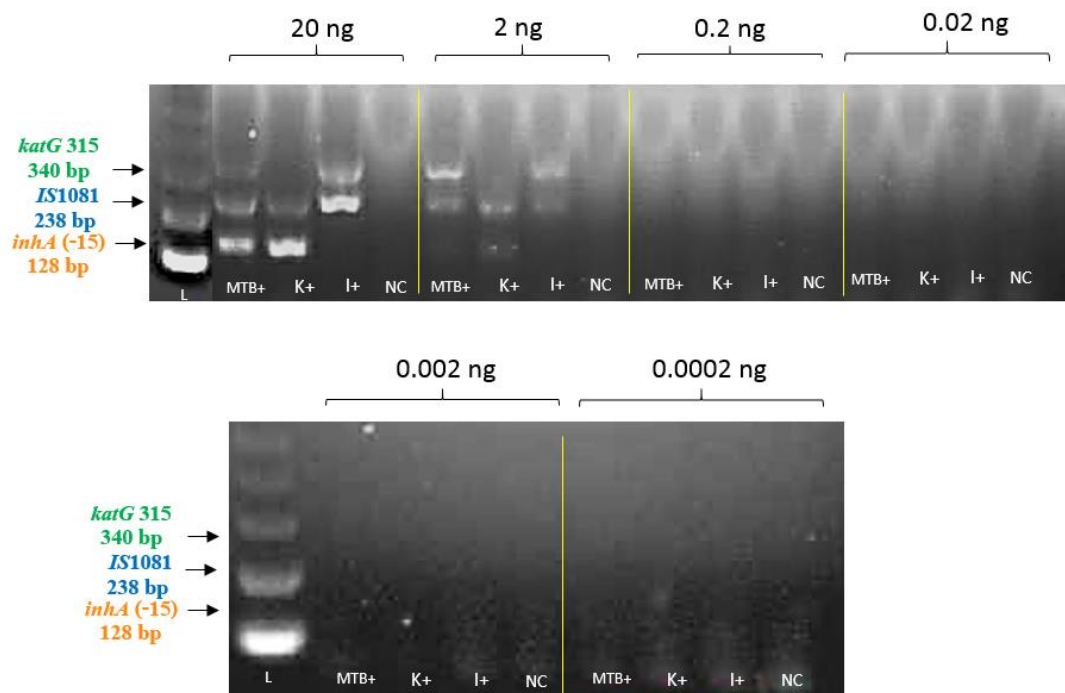
หมายเหตุ :

¹ปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

²ปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ตรวจสอบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %



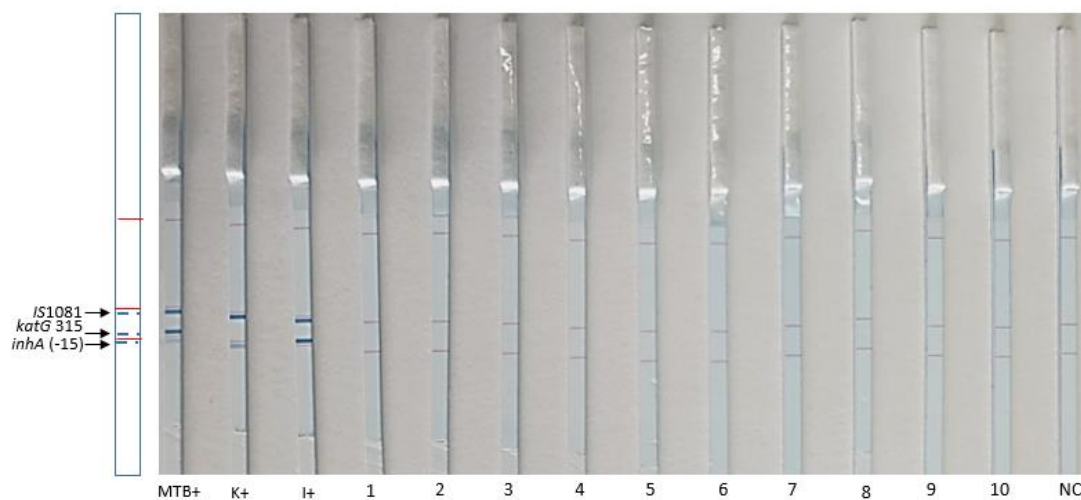
รูปที่ 47 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นต่างๆ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 ng โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น แถบ katG 315 และ inhA (-15) เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน inhA ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ แถบ MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่งโคดอน 315 แถบ I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถบ NC คือตัวควบคุมลบ



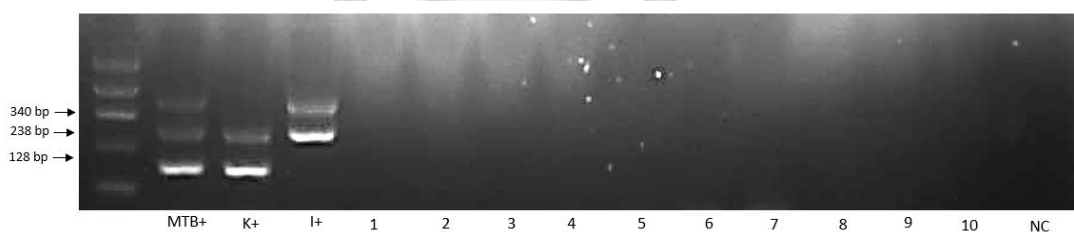
รูปที่ 48 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้นต่างๆ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 และ 0.0002 ng โดยผลผลิตที่พบของยีน *IS1081* ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) มีขนาดเท่ากับ 238, 340 และ 128 คู่เบส ตามลำดับ แถวที่ L แสดงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว MTB+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถว K+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) และแถว NC คือตัวควบคุมลบ

5.12 การทำปฏิกิริยาข้ามของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

เมื่อนำเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบของเชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. kansasii*, *M. goodii* และ *M. intracellulare* ให้ผลการตรวจสอบผลผลิตที่สอดคล้องกับเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % (รูปที่ 49 และ 50)



รูปที่ 49 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แถวที่ MTB+ คือเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และ *inhA* (-15) แถวที่ K+ คือเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) แถวที่ 1 ถึง 10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. kansasii*, *M. gordonae* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ และสุดท้ายแถว NC คือ ตัวควบคุมลบของปฏิกิริยา



รูปที่ 50 การตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % เมื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ แถวที่ L คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถวที่ MTB+ คือเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และ *inhA* (-15) แถวที่ K+ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 แถว I+ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) แถวที่ 1 ถึง 10 คือ เชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*,

A. baumannii, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. kansasii*, *M. gordonae* และ *M. intracellulare* ตามลำดับ และสุดท้ายแถว NC คือ ตัวควบคุมลบของปฏิกิริยา

5.13 ผลการวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG315* และยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 250 ตัวอย่าง มาวินิจฉัยจำแนกเชื้อและการกลายพันธุ์ยีน *katG315* และยีน *inhA* (-15) ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV ร่วมกับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกยีนย่นด้วยวิธีหาลำดับเบสของยีน *katG* ที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นตัวควบคุมคุณภาพบวก และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ เปรียบเทียบการอ่านผลด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %

จากตารางที่ 20 พบว่าการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography สามารถตรวจพบแถบยีน IS1081 ทั้งหมด 248 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ตรวจพบแถบยีน IS1081 จำนวน 245 ตัวอย่าง ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 ทั้งเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 (ไม่พบแถบยีน *katG315* บนแถบตรวจ) จำนวน 112 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ จำนวน 138 ตัวอย่าง ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) (ไม่พบแถบยีน *inhA* (-15) บนแถบตรวจ) ทั้งหมด 45 และ 47 ตัวอย่าง ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ จำนวน 205 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ จำนวน 203 ตัวอย่าง

ตารางที่ 20 สรุปการตรวจพบแถบยีนบนแผ่นตรวจและแถบผลผลิตบน Agarose gel electrophoresis ภายหลังเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ตามลำดับ เพื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยยีน IS1081 และวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง

ตำแหน่งบนแถบตรวจ ภายหลังวินิจฉัยด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่น ทดสอบ Dipstick Chromatography	วินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>		วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ตำแหน่งโคดอน 315		วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15)	
	พบเชื้อ (พบแถบยีน IS1081)	ไม่พบเชื้อ (ไม่พบแถบ ยีน / IS1081)	กลายพันธุ์ (ไม่พบแถบยีน <i>katG</i> 315)	ไม่กลายพันธุ์ (พบแถบยีน <i>katG</i> 315)	กลายพันธุ์ (ไม่พบแถบ ยีน <i>inhA</i> (-15))	ไม่กลายพันธุ์ (ไม่พบแถบยีน <i>inhA</i> (-15))
MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography	248	2	112	138	45	205
MAS-PCR ร่วมกับ Agarose Gel Electrophoresis	245	5	112	138	47	203
รวม	250		250		250	

เมื่อแปลผลจากแถบตรวจแต่ละแถบของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างในการวินิจฉัยเชื้อจากยีน IS1081 และการกลายพันธุ์ของยีน *katG*315 และยีน *inhA* (-15) ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography พบว่ามีตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 153 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid แบ่งเป็นเชื้อมียีน *katG*315 กลายพันธุ์ จำนวน 108 ตัวอย่าง ยีน *inhA* (-15) กลายพันธุ์ จำนวน 43 ตัวอย่าง และทั้งสองยีนกลายพันธุ์ร่วมกัน จำนวน 2 ตัวอย่าง ในขณะที่มีดีเอ็นเอจำนวน 95 ตัวอย่างที่แปลผลเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) อย่างไรก็ตามมีดีเอ็นเอจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่พบแถบยีน IS1081 ปรากฏบนแถบตรวจ (ตารางที่ 21)

เมื่อแปลผลจากแถบตรวจแต่ละแถบของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างในการวินิจฉัยเชื้อจากยีน IS1081 และการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose electrophoresis พบว่ามีตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 149 ตัวอย่าง ที่สามารถแปลผลเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid แบ่งเป็นเชื้อที่ยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 กลายพันธุ์ จำนวน 104 ตัวอย่าง ยีน *inhA* ตำแหน่งเหนือยีน(-15) กลายพันธุ์ จำนวน 42 ตัวอย่าง และทั้งสองยีนกลายพันธุ์ร่วมกัน จำนวน 3

ตัวอย่าง ในขณะที่มีดีเอ็นเอจำนวน 96 ตัวอย่างที่แปลผลเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) อย่างไรก็ตามมีดีเอ็นเอจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถแปลผลได้เนื่องจากไม่พบแถบผลผลิตของยีน IS1081 ปรากฏบน Agarose gel electrophoresis (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 21 การแปลผลวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography และเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis

เทคนิคที่ใช้ในการทดสอบ	การแปลผลการทดสอบ					รวม
	เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่มีการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid			ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG315</i> และ <i>inhA</i> (-15)	ไม่สามารถแปลผลได้	
	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>katG315</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>inhA</i> (-15)	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>katG315</i> ร่วมกับ <i>inhA</i> (-15)			
MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography	108	43	2	95	2	250
MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis	104	42	3	96	5	250

5.14 ผลการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของเทคนิค MAS-PCR

ภายหลังวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test พบว่ามีความไว และค่าทำนายผลบวก เท่ากับ 99.20% และ 85.46% ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบและค่าสถิติ Kappa ได้ ดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยพบเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test จำนวน 250 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	ผลการทดสอบด้วยชุด ทดสอบแอนติเจน		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่า ทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ					
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>					
พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	248	0	99.20% (97.14-	-	100% (98.54-	-	-
ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	2	0	99.90)		100)		

การวิเคราะห์ผลทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test พบว่ามีความไว และค่าทำนายผลบวก เท่ากับ 98% และ 100% ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลลบและค่าสถิติ Kappa ได้ ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยพบเชื้อ *M. tuberculosis* ในตัวอย่างจำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test

ผลการทดสอบ ด้วย MAS- PCR/AGE	ผลการทดสอบด้วยชุด ทดสอบแอนติเจน		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่า	ค่า	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>			ทำนาย	ทำนาย	
			ผลบวก (95% CI)	ผลลบ (95% CI)			
พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	245	0	98% (95.39-	-	100%	-	-
ไม่พบเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	5	0	99.45)		(-)		

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick Chromatography ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่างที่สามารถแปลผลได้ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนโทป์ พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 91.67%, 100%, 100% และ 85.42% ตามลำดับ และให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.878) (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ จำนวน 250 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	ผลการทดสอบด้วย เทคนิคทางพีโนไทป์		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	ดีต่อยา	ไวต่อยา					
	Isoniazid	Isoniazid					
พบการกลายพันธุ์							
ของ <i>katG</i> 315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)	154	0	91.67% (86.41- 95.37)	100% (95.60-100)	100% (-)	85.42% (78.01- 90.63)	0.878 (0.816 – 0.939)
ไม่พบการกลาย พันธุ์ของ <i>katG</i>315 และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)							

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่างที่สามารถแปลผลได้ เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ เท่ากับ 91.67%, 100%, 100% และ 85.42% ตามลำดับ และให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.878) (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อ ยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์จำนวน 250 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบ ด้วย MAS- PCR/AGE	ผลการทดสอบด้วย เทคนิคทางพีโนไทป์		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่า ทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่า ทำนาย ผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	ดีต่อยา	ไวต่อยา					
	Isoniazid	Isoniazid					
พบการกลายพันธุ์ ของ <i>katG315</i> และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)	154	0	91.67%	100%	100%	85.42%	0.878
ไม่พบการกลาย พันธุ์ของ <i>katG315</i> และ/หรือยีน <i>inhA</i> (-15)	14	82	(86.41- 95.37)	(95.60-100)	(-)	(78.01- 90.63)	(0.816 – 0.939)

อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลการทดสอบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่างที่สามารถแปลผลได้ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing พบว่าการวินิจฉัย การกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และ ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100%, 99.28%, 99.11% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีให้ผล สอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.992) ในขณะที่การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 100%, 99.51%, 97.78% และ 100% ตามลำดับ และให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก เช่นกัน (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.986) ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของ ยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing

ผลการทดสอบด้วย MAS-PCR/DC	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	พบการกลายพันธุ์	ไม่พบการกลายพันธุ์			ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	
	พบการกลายพันธุ์	ไม่พบการกลายพันธุ์			ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	
พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315	111	1	100%	99.28%	99.11%	100%	0.992
ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315	0	138	96.73-100	96.06-99.98	94.03-99.87	(-)	(0.976-1.000)
พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> (-15)	44	1	100%	99.51	97.78%	100%	0.986
ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> (-15)	0	205	91.96-100	97.31-99.99	86.16-99.68	(-)	(0.960-1.000)

เมื่อนำผลการทดสอบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis (AGE) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่างที่สามารถแปลผลได้ เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing พบว่าการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100%, 99.28%, 99.11% และ 100% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.992) ในขณะที่การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* (-15) มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100%, 98.54%, 93.62% และ 100% ตามลำดับ ให้ผลสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก (สถิติ Kappa เท่ากับ 0.960) เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 250 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing

ผลการทดสอบด้วย MAS-PCR/AGE	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ kappa (95% CI)
	พบการกลายพันธุ์	ไม่พบการกลายพันธุ์					
พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315	111	1	100% (96.73-100)	99.28% (96.06-99.98)	99.11% (94.03-99.87)	100% (-)	0.992 (0.976-1.000)
ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> 315	0	138					
พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> (-15)	44	3	100% (91.96-100)	98.54 (95.80-99.70)	93.62% (86.67-97.83)	100% (-)	0.960 (0.914-1.000)
ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> (-15)	0	203					

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

วัณโรคมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ยังเป็นปัญหาที่สำคัญของระบบสาธารณสุขโลกรวมถึงประเทศไทยในปัจจุบัน และเป็น 1 ใน 10 โรคที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุด ประเทศไทยถูกจัดให้เป็น 1 ใน 30 ประเทศของโลกที่ประสบปัญหาการติดเชื้อวัณโรคอย่างรุนแรงมีอัตราการติดเชื้อสูงทั้งในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HIV และกลุ่มที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยา ที่ผ่านมาองค์การอนามัยโลกได้มีแผนที่จะลดอัตราการติดเชื้อวัณโรคลง 20% รวมถึงลดอัตราการเสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรคลง 35% ภายในปี พ.ศ. 2563 แต่พบว่าสามารถลดลงได้เพียง 9% สำหรับอัตราการติดเชื้อ และลดลง 14% สำหรับอัตราการเสียชีวิต ดังนั้นการดำเนินแผนดังกล่าวยังคงต่ำกว่าเป้าหมายที่คาดการณ์ไว้มากกว่า 50% ซึ่งปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการลดอัตราการติดเชื้อและการรักษาวัณโรคมาจากการเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยา ทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนสูตรยาในการรักษาและเพิ่มระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น รวมถึงใช้งบประมาณในการรักษาที่สูงขึ้น ผู้ป่วยได้รับผลข้างเคียงจากยาเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเพิ่มโอกาสการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาสู่คนรอบข้างมากขึ้นเช่นกัน

ยา Isoniazid เป็นหนึ่งในยาต้านวัณโรคขนานแรกที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคตามสูตรมาตรฐาน 2HRZE/4HR จากข้อมูลของสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย พ.ศ. 2555-2556 พบอัตราผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid ทั้งแบบดื้อยาชนิดเดียวและดื้อร่วมกับยาชนิดอื่น มีจำนวนเท่ากับ 12.2% ในผู้ป่วยใหม่ และ 29.6% ในผู้ป่วยรักษาซ้ำ ซึ่งสูงกว่าอัตราการพบวัณโรคดื้อยา Rifampicin ที่พบประมาณ 6% ของจำนวนผู้ป่วยวัณโรค (7, 10) สอดคล้องกับข้อมูลจากองค์การอนามัยโลกที่พบอัตราส่วนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Isoniazid มีจำนวนเท่ากับ 13.2% และเป็นอัตราที่สูงกว่าวัณโรคดื้อยา Rifampicin ซึ่งมีจำนวนเท่ากับ 10.8% ของจำนวนผู้ป่วยวัณโรค (3, 4) โดยผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มดื้อต่อยา Isoniazid จะมีโอกาสพัฒนาเป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ในภายหลัง (Acquired MDR-TB) สูงถึง 12% ซึ่งสูงกว่าผู้ป่วยวัณโรคที่ไวต่อยา Isoniazid ที่พบโอกาสเพียง 0.8% รวมถึงผลการรักษาจะประสบความสำเร็จในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid ยังมีอัตราที่ต่ำ โดยมีอัตราการรักษาล้มเหลว 11% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 10% ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่ไวต่อยา Isoniazid พบอัตราการรักษาล้มเหลวเพียง 1% และอัตราการกลับเป็นซ้ำ 5% (11) ดังนั้นปัญหาวัณโรคดื้อยา Isoniazid จึงมีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะในการเลือกสูตรยาให้เหมาะสมตั้งแต่การรักษาในครั้งแรก เพื่อลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำและพัฒนาสู่วัณโรคดื้อยาหลายขนานในภายหลัง การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อที่ดื้อยาหรือมีโอกาสพัฒนาสู่เชื้อดื้อยาหลายขนานจึงมีประโยชน์มากต่อทั้งการรักษาและป้องกันการแพร่กระจายโรค

กลไกหลักที่ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อต่อยา Isoniazid คือ การกลายพันธุ์ของยีนที่มีความสัมพันธ์ต่อการออกฤทธิ์ของยา (96) จากข้อมูลงานวิจัยหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid มีสาเหตุหลักมาจากการกลายพันธุ์ของยีนสองชนิด ได้แก่ ยีน *katG* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Catalase/peroxidase ของตัวเชื้อ ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นให้ยา Isoniazid อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ได้ ฉะนั้นเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน *katG* จึงทำให้ยา Isoniazid ไม่สามารถอยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงาน ส่งผลต่อการดื้อยา Isoniazid ระดับปานกลางถึงระดับสูงของเชื้อ *M. tuberculosis* และรองลงมาคือ ยีน *inhA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Enoyl-acyl carrier protein (ACP)-reductase เพื่อใช้ในการสร้าง Mycolic acid ผนังเซลล์ของเชื้อ เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ เอนไซม์ดังกล่าวจึงถูกผลิตมากขึ้นจนเพียงพอต่อการสร้างผนังเซลล์และดำรงชีพต่อไปได้ และเป็นสาเหตุทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยา Isoniazid ในระดับต่ำ การกลายพันธุ์ที่พบทั้งของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว (Single-nucleotide polymorphisms: SNPs) โดยตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุดของยีน *katG* คือ ตำแหน่งโคดอน 315 ซึ่งพบประมาณ 36-98% และของยีน *inhA* คือ ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ซึ่งพบประมาณ 10-23% ของอัตราความชุกจากตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่พบในประเทศต่างๆ (52, 96-104) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยและนำมาสกัดดีเอ็นเอสำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนรวมทั้ง 250 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเชื้อทั้งหมดได้รับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เนื่องจากหากเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยรายใหม่และยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค จะถูกทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขนานแรก ประกอบไปด้วยยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Streptomycin และยา Ethambutol ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 อย่างไรก็ตามหากเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มที่กลับมาเป็นซ้ำและเคยมีประวัติได้รับการรักษามาก่อน หรือมีโอกาสพัฒนาเป็นวัณโรคดื้อยาสูง จะถูกการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคยาต้านวัณโรคขนานที่สอง ได้แก่ Etionamide, Amikacin, Kanamycin, Rifabutin, Moxifloxacin และ Ofloxacin และยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง ด้วยเทคนิค Sensititre MYCOTB Broth microdilution ทั้งนี้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ หรือที่ความเข้มข้นระดับสูง จะไม่สามารถใช้ยา Isoniazid ในการรักษาได้ (105) การกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นต่ำ และเป็นสาเหตุหลักให้เกิดการดื้อยา Ethionamide เนื่องมาจากยาทั้งสองชนิดนี้มีโครงสร้างที่คล้ายกันและยังมีตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ตำแหน่งเดียวกัน (106) การศึกษาก่อนหน้าพบว่า

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ร่วมกับยา Ethionamide มีอัตราเท่ากับ 22.9 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid และเป็นเชื้อชนิด MDR-TB ทั้งหมด (107) ร่วมกับอีกหนึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้พบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* มากกว่า 55% จากเชื้อที่ดื้อต่อยา Ethionamide รวมถึงไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวจากเชื้อที่ไวต่อ Ethionamide (106) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ส่วนใหญ่ที่ดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง ยังคงไวต่อยา Ethionamide ทั้งนี้อาจเกิดจากสาเหตุการดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูงนั้นมีสาเหตุมาจากกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ควบคุมเฉพาะเอนไซม์ที่ใช้ในการกระตุ้นยา Isoniazid ให้อยู่ในรูปแบบที่พร้อมทำงาน ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา Ethionamide แต่อย่างใด (106) ในขณะที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับต่ำและถูกนำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้า ไม่ได้ถูกทำการทดสอบความไวต่อยา Ethionamide จึงไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อกลุ่มดังกล่าวเกิดการดื้อต่อยา Ethionamide ร่วมด้วยหรือไม่ เนื่องจากยา Ethionamide เป็นยาขนานที่สองที่ใช้ในการรักษากลุ่มผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงจะทำการทดสอบความไวต่อยา Ethionamide ในกรณีที่ผู้ป่วยมีโอกาสดื้อยาหรือเคยได้รับการรักษามาก่อนเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 1 ใน 3 (54 จาก 168 ตัวอย่าง) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ทั้งหมดเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยาร่วมกับ Rifampicin โดยเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูงถึง 29 ตัวอย่าง เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ระดับความเข้มข้นสูง และเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน จำนวนเกือบครึ่งหนึ่งดื้อต่อยา Rifabutin ร่วมด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากยา Rifabutin และยา Rifampicin มีตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ต่อตัวเชื้อที่ตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นเมื่อเชื้อดื้อต่อยา Rifampicin ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จึงส่งผลให้ยา Rifabutin ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Click และคณะ ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 531 เท่ากับ 82.9% ของเชื้อที่ดื้อยา Rifabutin ร่วมด้วย (108) และเนื่องจากวัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์หลักของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid การเก็บตัวอย่างจึงมุ่งเน้นไปที่เชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid เพื่อใช้เป็นตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้นสัดส่วนของตัวอย่างเชื้อดื้อยาที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จึงไม่สามารถสะท้อนอัตราความชุกและอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นจริงของหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอได้

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *katG* และ *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 250 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ทุกตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 หรือยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-13) หรือ (-15) จะดื้อต่อยา Isoniazid โดยพบการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียว และตัวอย่างส่วนใหญ่พบการ

กลายพันธุ์ของยีนใดยีนหนึ่ง ซึ่งมีเพียง 2 จาก 168 ตัวอย่าง ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* พร้อมกับยีน *inhA* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ทั้งหมดเกิดขึ้นที่ตำแหน่งโคดอนที่ 315 เท่านั้น โดยส่วนใหญ่รูปแบบการกลายพันธุ์หลัก คือ Serine315-Threonine และมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่พบรูปแบบการกลายพันธุ์แบบ Serine315-Asparagine ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เกิดขึ้นได้ในสองตำแหน่ง โดยมีตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เป็นตำแหน่งที่พบในตัวอย่างส่วนใหญ่ และมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-13) ของยีน *inhA* จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เป็นเป้าหมายที่มีความจำเพาะสูงในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* รองลงมาคือการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) กล่าวคือ เชื้อที่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวทุกตัวอย่างจะดื้อต่อยา Isoniazid ในขณะที่เชื้อที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองจะเป็นเชื้อที่ไวต่อยา

ในทางกลับกัน หากพิจารณาจากพื้นฐานของการดื้อยา Isoniazid ทางพีโนไทป์พบว่า 66.1 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ในขณะที่ 33.9 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ไม่พบการกลายพันธุ์ และ 26.8 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid มีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ในขณะที่ 73.2 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ไม่พบการกลายพันธุ์ สัดส่วนการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ในการศึกษานี้ แตกต่างจากผลงานวิจัยของ Boonaiam และคณะที่ผ่านมา ซึ่งได้ศึกษาการรูปแบบกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ในประเทศไทย (90) และพบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาด้านวัณโรคหลายขนานจำนวน 54 ตัวอย่าง มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เท่ากับ 90.74% ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เท่ากับ 7.40% ของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Zaw และคณะ ยังพบว่าเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน มีอัตราส่วนของการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* เกิดขึ้นมากกว่าการกลายพันธุ์ของยีนชนิดอื่น เช่น ยีน *kasA* ยีน *ndh* และบริเวณระหว่างยีน *oxyR-ahpC*(109)

ทั้งนี้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ในการศึกษาครั้งนี้ อาจมีเหตุผลเนื่องมาจาก 1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นอยู่นอกเหนือลำดับเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากลำดับเบสเป้าหมายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ถูกออกแบบให้ครอบคลุมเฉพาะตำแหน่งการกลายพันธุ์หลักที่พบบ่อยเท่านั้น ได้แก่ ลำดับเบสของยีน *katG* ที่ครอบคลุมเพียงตำแหน่งโคดอนที่ 211 ถึง 420 และลำดับเบสของยีน *inhA* ที่ครอบคลุมเฉพาะตำแหน่งโปรโมเตอร์ งานวิจัยของ Ando และคณะ พบว่าตำแหน่งการกลายพันธุ์อื่นของยีน *katG* ที่สามารถส่งผลให้เชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อต่อยา Isoniazid เช่น ตำแหน่งโคดอน 97 ที่เปลี่ยนแปลง

กรดอะมิโนจาก Histidine เป็น Arginine ตำแหน่งโคดอน 127 ที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Glutamine เป็น Glutamate ตำแหน่งโคดอน 463 ที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Arginine เป็น Leucine (103) ในขณะทำงานวิจัยของ Roberto Zenteno-Cuevas และคณะ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งโคดอน 21 หรือโคดอน 98 ส่งผลให้เชื้อ *M. tuberculosis* เกิดการดื้อต่อยา Isoniazid ได้ (104) Valafar และคณะ ทำการศึกษาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งต่างๆ ของยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และพบการกลายพันธุ์ที่นอกเหนือจากตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน 9 โคดอน 11 โคดอน 71 โคดอน 94 และโคดอน 113 ของยีน *inhA* (110)

การตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และยีน *inhA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ยังอาจเกิดจากการที่เชื้อมีการกลายพันธุ์ของยีนชนิดอื่นนอกเหนือจากยีน *katG* และยีน *inhA* เช่น ยีน *ahpC* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Alkyl hydroperoxidase reductase ของเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อมีการแสดงออกที่สูงขึ้น ปริมาณเอนไซม์ที่สร้างสูงขึ้นจะทำให้เชื้อทนต่อ Oxidative stress มากขึ้นทำให้เชื้อดื้อต่อยาได้ โดยมักพบการกลายพันธุ์บริเวณตำแหน่งเหนื่อยีนดังกล่าว (*oxyR-ahpC* intergenic region) จากงานวิจัยของ Liu และคณะ ที่ศึกษาผลกระทบจากการกลายพันธุ์ของยีน *ahpC* ในประเทศจีน พบการกลายพันธุ์ของยีน *ahpC* ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูงที่ ให้ค่า MIC > 6.4 mg/L และยังมีความสัมพันธ์กับเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานอย่างมีนัยสำคัญ (111) ในขณะทำงานวิจัยของ Boonaiam และคณะพบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว ในเชื้อ *M. tuberculosis* ประมาณ 2.5% ที่แยกได้จากกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วยในประเทศไทย (90) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *ndh* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ NADH dehydrogenase ส่งผลให้มีปริมาณ NADH ที่เพิ่มสูงขึ้น และเกิดการยับยั้งการเข้าจับระหว่างยา Isoniazid กับ NAD⁺ สามารถส่งผลต่อการดื้อต่อยา Isoniazid ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ (90, 112) ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ *inhA* เป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 33 ตัวอย่างพบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ประมาณ 88.85% และของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ประมาณ 15.15% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Soolingen และคณะ ที่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง ประมาณ 75-89% (113) และแสดงให้เห็นว่าการดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูง อาจมีผลมาจากกลายพันธุ์ของยีนชนิดอื่นที่นอกเหนือจากยีน *katG* ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีน *katG* เพียงชนิดเดียวอาจไม่สามารถใช้ระบุความสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้นระดับสูงได้

การพัฒนาเทคนิคที่อาศัยหลักการทางอณูชีววิทยา สามารถช่วยลดระยะเวลาการวินิจฉัยความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* การศึกษาครั้งนี้อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS1081 เพื่อวินิจฉัยเชื้อ และ Allele specific primer ที่จำเพาะต่อยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ร่วมกับการอ่านผลด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ซึ่งเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปของบริษัท Tohoku Bio-array จำกัด ประเทศญี่ปุ่น เพื่อช่วยลดระยะเวลาและง่ายต่อการอ่านผลด้วยตาเปล่า ซึ่งทดแทนการตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์ในการทดสอบหลายชนิด และมีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน รวมไปถึงใช้ระยะเวลาในการอ่านผลนานประมาณ 30-40 นาที (84) อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาของ Singpanomchai และคณะ (94) ได้ออกแบบ Allele specific primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่แบบ Singleplex ด้วยปฏิกิริยา Recombinase polymerase amplification พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 แต่ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำ Allele specific primer ทั้งสองชนิดดังกล่าว มาทดสอบเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยา PCR และพบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสองชนิดข้างต้น ประกอบกับการมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน IS1081 ยีน *katG* และยีน *inhA* พร้อมกัน จึงได้เลือกใช้หลักการของ Multiplex PCR ในการศึกษาครั้งนี้

การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยทั่วไป รวมถึงการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาของเชื้อ ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียว ดังนั้นการออกแบบ Allele specific primer จึงเป็นองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพื่อให้สามารถจำแนกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ออกจากกันได้ ในตำแหน่งยีนที่เฉพาะเจาะจง จึงได้เลือกใช้ Allele specific primer ที่ผ่านการออกแบบให้ด้านปลาย 3' จับอย่างจำเพาะกับลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มี การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 315 ของยีน *katG* และที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ของยีน *inhA* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid ส่วนใหญ่ 36-98% และ 10-23% ของเชื้อที่ดื้อยา ตามลำดับ (52, 96-104) และเพิ่มความจำเพาะของ Allele specific primer ด้วยการให้มีลำดับเบสที่ไม่ใช่คู่สม (mismatch) จำนวน 1-2 นิวคลีโอไทด์ในลำดับรองสุดท้ายจากด้านปลาย 3' ผลการทดสอบคัดกรองเบื้องต้นของ Allele specific primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มี

และไม่มี การกลายพันธุ์ออกจากกันได้ จึงนำ Allele specific primer ดังกล่าว ร่วมกับ IS1081 primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* ไปดำเนินการติดฉลากเพิ่ม เพื่อใช้ในเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick chromatography strip ต่อไป

การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Dipstick chromatography strip ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ Primer จำนวน 3 คู่ร่วมกัน ได้แก่ 1. IS1081 primer เพื่อใช้ในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* 2. *katG* 315 primer เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และ 3. *inhA* (-15) primer เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน -15 โดย Forward primer แต่ละคู่ถูกติดฉลากด้านปลาย 5' ด้วยลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับฉลากที่ถูกตรึงไว้บนแผ่นเมมเบรน และ Reverse primer ถูกติดฉลากด้าน 5' ด้วย Biotin ทำให้ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สามารถถูกตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดย Primer ทั้ง 3 ชนิดถูกทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายในหลอดทดลองเดียวกันให้ลดเวลา และขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา อีกทั้งยังเป็นการประหยัดน้ำยา อุปกรณ์พลาสติกสิ้นเปลืองต่างๆ และงบประมาณในการตรวจวิเคราะห์ (114) ดังนั้นในหนึ่งหลอดปฏิกิริยาสามารถตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นได้ของยีนทั้งสามชนิดพร้อมกัน โดยสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR และการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีดังนี้ ความเข้มข้นของ IS1081 primer เท่ากับ 0.02 μM ความเข้มข้นของ *katG* 315 primer เท่ากับ 0.04 μM และความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer เท่ากับ 1.8 μM ความเข้มข้นของ dNTP และดีเอ็นเอที่ 100 μM และ 20 ng ตามลำดับ ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่อุณหภูมิ 62 $^{\circ}\text{C}$ จำนวน 30 รอบ และเมื่อตรวจสอบผลผลิตแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ต้องใช้ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 250 μM ปริมาตร 10 μl ร่วมกับ Streptavidin-coated blue latex beads 2 μl และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที สำหรับการอ่านผลของปฏิกิริยาที่ชัดเจน

เป็นที่น่าสังเกตว่าความเข้มข้นของ *inhA* (-15) primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา MAS-PCR มีความเข้มข้นสูงกว่า Primer อีกสองชนิดค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจมีเนื่องจาก *inhA* (-15) primer มีลักษณะนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันทั้งแบบซ้ำกันชนิดเดียว (Single base runs) และซ้ำกันชนิดคู่ (Di-nucleotide repeats) ซึ่งจะลดประสิทธิภาพการจับกันของ Primer กับสายดีเอ็นเอต้นแบบ และอาจเกิดการจับกันเองของ Primer (Self-complementary) หรือการเกิด Hair pin loop (115) เหตุการณ์ดังกล่าวส่งผลต่อประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ *inhA* (-15) primer ซึ่งหากใช้ความเข้มข้นของ Primer ต่ำเกินไป จะไม่สามารถพบผลผลิตของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ดังที่เห็นจากขั้นตอนการทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสม ซึ่งเริ่มพบผลผลิตของ *inhA* (-15) primer เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Primer ตั้งแต่ 1.0 μM และเห็นผลผลิตชัดเจน จำแนกได้ระหว่าง

ผลบวกและผลลบ ที่ความเข้มข้นของ Primer เท่ากับ 1.8 μM ในขณะที่เมื่อใช้ Primer ความเข้มข้นที่สูงขึ้นมากกว่า 1.8 μM สอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้าของ Chia และคณะ ที่ใช้เทคนิค Multiplex allele specific polymerase chain reaction ในการตรวจสอบหาเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวยาลายขนาน ซึ่งใช้ความเข้มข้นของ *inhA* (-15) Primer สูงกว่า Primer ชนิดอื่นที่ใช้ในหลอดทดสอบและปฏิกิริยาเดียวกัน (82)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาในครั้งนี้ เนื่องจากปฏิกิริยา PCR แบบ Multiplex จำเป็นต้องมีดีเอ็นเอต้นแบบที่เพียงพอ เนื่องจากเป็นการทำปฏิกิริยาร่วมกันของ Primer มากกว่า 1 ชนิด ใน 1 หลอด ปฏิกิริยา ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบจึงจำเป็นต้องมากพอที่จะทำให้ Primer เข้าทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ ซึ่งมักจะใช้ปริมาณที่มากกว่าในปฏิกิริยาของ Sigleplex PCR (116) การศึกษาที่ผ่านมาของ Singpanomchai และคณะ (94) พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR สำหรับวินิจฉัยตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ด้วย Allele specific primer ของเชื้อ *M. tuberculosis* เท่ากับ 4 และ 20 ng/ μl ตามลำดับ ในขณะที่หากเป็นการเพิ่มปริมาณยีน *katG* และยีน *inhA* โดยใช้ Primer ทั่วไป ต้องการใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเพียง 1 ng ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องมาจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Allele specific primer จำเป็นต้องอาศัยความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่สูงกว่าการใช้ Primer ปกติทั่วไป โดยเฉพาะเมื่อใช้ Allele specific primer เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด SNPs หลายยีนในเวลาเดียวกัน จะทำให้เกิดความไม่เสถียรของการจับกันระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบและ Primer แต่ละชนิดมากขึ้น และอาจส่งผลให้เกิด Non-specific product (116) รวมถึงหนึ่งในยีนที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ คือ ยีน *inhA* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ซึ่งมีคู่เบสชนิด G-C จำนวนมาก ส่งผลต่อการเข้าจับของ Primer ได้ยาก จึงจำเป็นต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอสูงเพื่อเพิ่มโอกาสในการเข้าจับ (117) ดังนั้นขั้นตอนการ Optimization ของปฏิกิริยาจึงมีความสำคัญมากที่จะมีส่วนทำให้สามารถวินิจฉัยยีนมากกว่าหนึ่งชนิดที่มีและไม่มีการกลายพันธุ์ได้ภายใต้สภาวะเดียวกัน (118) เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งเป็นการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาลายขนานของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค Multiplex allele specific polymerase chain reaction ได้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบสูงถึง 20 ng (82) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

สัดส่วนของปริมาณน้ำยาที่ใช้ในขั้นตอนการอ่านผลจากแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ยังมีความสำคัญที่ทำให้การอ่านผลถูกต้องและชัดเจน ในการตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้น จำเป็นต้องมีการนำผลผลิตมาผสมกับสารละลาย Dipstick developing buffer ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นเกลือ ที่ช่วยให้ฉลากนิวคลีโอไทด์คู่สมที่ถูกติดไว้ที่ผลผลิตจับกับฉลากนิวคลีโอ

ไอโหด ที่ถูกตรึงไว้บนแผ่นเมมเบรนของแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography อย่างคงที่และจำเพาะมากขึ้น ทั้งนี้บริษัทผู้ผลิตได้แนะนำให้ใช้สารละลาย Dipstick developing buffer ที่ความเข้มข้นของ NaCl 150 mM ปริมาตร 10 μ l ในกรณีผสมกับผลผลิตที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดย Primer หลายคู่ (87) อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลาย Dipstick developing buffer เท่ากับ 250 mM ซึ่งสูงกว่าที่ทางบริษัทผู้ผลิตได้แนะนำ จึงจะสามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตที่ให้ผลบวกได้อย่างชัดเจน แต่ยังคงไม่ส่งผลให้เกิดแถบผลบวก การเจือจางสัดส่วนผลผลิต MAS-PCR ในอัตราส่วนต่างๆ ก่อนนำไปผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads จากการศึกษานี้ ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกการอัตราส่วนเจือจางผลผลิตแบบ Undiluted ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีการเจือจางเพิ่มเติมในการตรวจวัดผลผลิต จึงช่วยลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ใช้ในการศึกษานี้เท่ากับ 2 μ l ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ทางบริษัทผู้ผลิตได้แนะนำ ในขณะที่ระหว่างการทดสอบเมื่อใช้ปริมาณของ Streptavidin-coated blue latex beads เท่ากับ 1 μ l ซึ่งเป็นปริมาณมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาทั่วไป หรือสูงขึ้นมาเท่ากับ 1.5 μ l ไม่สามารถมองเห็นแถบผลผลิตที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่น้อยเกินไปส่งผลให้เกิดผลปลอม เนื่องจากโมเลกุล Streptavidin ที่อยู่บนเม็ด Latex มีโอกาสไปแย่งจับกับ Free biotinylated primer ที่มีเหลืออยู่ในผลผลิต จนทำให้ Streptavidin-coated blue latex beads ไม่เหลือพอจะไปจับกับผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการทำ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบระยะเวลาในการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และพบว่าหากทำการจุ่ม 5 นาที หรือ 10 นาที (ซึ่งเป็นระยะเวลาที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ) แม้จะสามารถมองเห็นแถบผลผลิตที่เกิดขึ้นได้ แต่ไม่ชัดเจนเท่ากับระยะเวลาที่จุ่มแผ่นทดสอบนาน 15 นาที

ความเข้มข้นน้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความแตกต่างกันในแต่ละ Primer กล่าวคือ IS1081 primer และ *katG* 315 primer ต้องใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดเท่ากับ 2 ng ในขณะที่ *inhA* (-15) primer ต้องใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบน้อยที่สุดเท่ากับ 20 ng ซึ่งสูงกว่า Primer สองชนิดแรกถึง 10 เท่า ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากมาจากลักษณะของ *inhA* (-15) primer ที่เป็นนิวคลีโอไอดีซ้ำกัน และอาจเกิดการจับกันเองระหว่าง Primer จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบลดลง (115) รวมไปถึงตำแหน่งของยีน *inhA* ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้อยู่ในตำแหน่งเหนี่ยวยีน (Operator gene) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีคู่เบสชนิด G-C สูง จึงอาจส่งผล Primer เข้าจับได้ยาก ดังที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น (117) อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick Chromatography มีความจำเพาะสูงในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโค

ตอน 315 และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ของเชื้อ *M. tuberculosis* เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. kansasii*, *M. gordonae* และ *M. intracellulare* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้บ่งชี้ว่าสิ่งส่งตรวจที่มาจากระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง เช่น เสมหะ ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้วินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งพบการก่อโรคในปอดเป็นส่วนใหญ่ จึงควรอาศัยการออกแบบ Primer ให้มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากที่สุด เพื่อนำมาสู่การวินิจฉัยและรักษาที่ถูกต้องตามลำดับ (119)

เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ให้ผลการทดสอบที่สามารถแปลผลได้ 248 จาก 250 ตัวอย่าง ในขณะที่หากเมื่อทำการตรวจวัดผลผลิตด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis สามารถแปลผลได้ 245 จาก 250 ตัวอย่าง ซึ่งถือว่ามีความไวในการวินิจฉัยวัณโรคได้ถึง 99.20% และ 98% ตามลำดับ และมีค่าทำนายผลบวกเท่ากันเท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับการวินิจฉัยด้วยชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test ทั้งนี้ไม่สามารถคำนวณค่าความจำเพาะค่าการทำนายผลลบได้เนื่องจากไม่มีตัวอย่างที่ไม่ใช่เชื้อ *M. tuberculosis* ในการศึกษา สาเหตุที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีน IS1081 ได้ อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้สำหรับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test เป็นโคลนหรือเชื้อที่ได้จากการเพาะเชื้อโดยตรง แต่สำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ยังไม่สามารถทดสอบกับโคลนของเชื้อได้โดยตรง จำเป็นต้องนำโคลนมาผ่านกระบวนการสกัดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอก่อนนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคการต้มในการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งอาจทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าเมื่อสกัดด้วยวิธีอื่น(120) รวมถึงชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test เป็นการทดสอบเพื่อหาโปรตีนของแอนติเจนจากเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้แอนติบอดีในการเข้าจับ (121) การเกิดปฏิกิริยาจึงเกิดได้ง่ายและมีปัจจัยภายนอกที่สามารถรบกวนการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่าปฏิกิริยาทาง PCR โดยเฉพาะ MAS-PCR ที่เป็นตรวจหายีนหลายชนิดพร้อมกันภายในสภาวะและหลอดทดลองเดียวกัน เป็นที่น่าสังเกตว่า แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ให้ผลการตรวจสอบผลผลิตดีกว่าวิธี Agarose gel electrophoresis อาจเนื่องมาจากแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ใช้ตรวจวัดผลผลิตได้โดยตรงหลังปฏิกิริยา MAS-PCR เสร็จสิ้นทันทีและมีสารละลาย Buffer และ Latex bead ที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหาผลผลิตโดยไม่ผ่านกระแสไฟฟ้าเหมือนกับวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ต้องใช้ทั้งความร้อนและสารช่วยเพิ่มน้ำหนักให้แก่ผลผลิตเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่บนแผ่นเจล ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Tian และคณะ ที่ศึกษาความไวของชุดทดสอบ Dipstick chromatography ในการตรวจหาเชื้อ Microbiota

จากเทคนิค Multiplex-PCR และพบว่าชุดทดสอบ Dipstick chromatography มีความไวในการตรวจสอบผลผลิตสูงกว่าวิธี Agarose gel electrophoresis (122)

การวินิจฉัยว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ต่อดื้อยา Isoniazid เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จะอาศัยการแปลผลว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* โดยดูจากแถบผลผลิตยีน IS1081 ร่วมกับแถบผลผลิตยีน *katG315* และ ยีน *inhA* (-15) ทั้งนี้หากไม่พบแถบผลผลิตยีน *katG315* หรือยีน *inhA* (-15) ยีนใดยีนหนึ่ง หมายถึง ยีนเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนดังกล่าว ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบที่สูง (91.67%, 100%, 100% และ 85.42% ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ โดยมีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก ในขณะที่เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบที่สูง (91.67%, 100%, 100% และ 85.42% ตามลำดับ) ซึ่งมีความสอดคล้องกันในเกณฑ์ดีมาก เช่นเดียวกัน จากข้อมูลข้างต้นสังเกตได้ว่าทั้งเทคนิค MAS-PCR ที่ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และด้วย Agarose gel electrophoresis ไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid ได้เท่ากันที่ 14 ตัวอย่าง ผลลบปลอมที่เกิดขึ้นทำให้ค่าความไวลดลง ซึ่งผลลบปลอมที่เกิดขึ้นนั้นหมายถึงไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และ/หรือยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนี่ยวยีน (-15) เท่านั้น ดังนั้นตัวอย่างที่ดื้อยา Isoniazid แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของสองตำแหน่งยีนข้างต้นอาจเป็นผลมาจากดื้อยาด้วยกลไกอื่นหรือการกลายพันธุ์ของยีนอื่น หรือตำแหน่งอื่น นอกเหนือจากที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี MAS-PCR แม้ว่าผลทดสอบทางพีโนไทป์เป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา รวมถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสกัดโดยวิธีการต้มและอาจได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ต่ำกว่าเมื่อสกัดด้วยวิธีอื่น (120) นอกจากนี้ดีเอ็นเออาจมีการปนเปื้อนสารที่ยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลดลง (123) หรือทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (124) ประกอบกับในระหว่างทำการศึกษามีการเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20°C และมีการนำมาละลายที่ 4°C ทุกครั้งก่อนการทดสอบ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้ดีเอ็นเอเกิดการสลายตัวได้ โดยเฉพาะดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 100 กิโลเบส (125) เนื่องจากในกรณีของเชื้อ *M. tuberculosis* มีขนาดของดีเอ็นเอใหญ่ประมาณ 4,411 กิโลเบส

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับวิธีการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing พบว่าเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เท่ากับ

100%, 99.28%, 99.11% และ 100% ตามลำดับ และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เท่ากับ 100%, 99.51%, 97.78% และ 100% ตามลำดับ โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมาก ในขณะที่เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis มีความไว ความจำเพาะ ค่านายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 เท่ากับ 100%, 98.54%, 93.62% และ 100% ตามลำดับ และยีน *inhA* ณ ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เท่ากับ 100%, 99.51%, 97.78% และ 100% ตามลำดับ โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมากเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ ค่าความจำเพาะที่ลดลงเป็นผลเนื่องมาจากผลบวกปลอมของเทคนิค MAS-PCR ที่พบได้ทั้งในการตรวจสอบผลผลิตร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และ Agarose gel electrophoresis โดยไม่พบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนตำแหน่งนั้นๆ ด้วยเทคนิค MAS-PCR จึงแปลผลการทดสอบว่าพบการกลายพันธุ์ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ ลำดับเบสที่ไม่พบการกลายพันธุ์ โดยยีน *inhA* สามารถพบผลบวกปลอมมากกว่ายีน *katG* ทั้งจากการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และ เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับ Agarose gel electrophoresis ซึ่งอาจเกิดขึ้นจากปัจจัยของลำดับคู่เบส G-C ที่มีปริมาณที่สูงกว่ายีน *katG* ณ ตำแหน่งที่ศึกษา รวมถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบดังที่อธิบายไปข้างต้น

การอ่านผลจากแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography หากไม่พบแถบของ IS1081 ไม่ควรแปลผลการทดสอบที่เกิดขึ้น เนื่องจากไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อที่กำลังตรวจสอบได้ ในทางตรงกันข้ามหากปรากฏแถบของยีน IS1081 แต่ไม่ปรากฏแถบของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) เพราะมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น จะสามารถแปลผลการทดสอบได้ว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid เพราะพบการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าว อย่างไรก็ตาม หากปรากฏแถบของยีน IS1081 ร่วมกับแถบของยีน *katG* 315 และยีน *inhA* (-15) ซึ่งหมายถึงพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) อาจยังไม่สามารถสรุปได้ในทันทีว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ดังกล่าวไวต่อยา Isoniazid เพราะในการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ที่เกิดขึ้นทำการตรวจการกลายพันธุ์เพียงยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) ซึ่งอาจยังคงมีสาเหตุและการกลายพันธุ์รูปแบบอื่นที่ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Isoniazid ได้ ดังนั้นในกรณีนี้ จึงควรทำการทดสอบอื่นเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าเชื้อไวต่อยา Isoniazid หรือไม่ นอกจากนี้ แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ยังมีข้อจำกัดบางประการ เนื่องจากบนแถบทดสอบที่ถูกผลิตจากโรงงานผู้ผลิตไม่มีแถบควบคุมคุณภาพ เช่น Control line ในบางกรณีที่ผลการทดสอบไม่พบแถบผลผลิตยีนเกิดขึ้น จึงไม่สามารถบ่งชี้ได้แน่ชัดว่า การไม่ปรากฏของแถบยีนเกิดเป็นเพราะไม่มีผลผลิตเกิดขึ้นหลังเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม หรือแถบทดสอบเสื่อม ดังนั้นทุกครั้งที่มีการเตรียมตรวจสอบผลผลิต บนแถบ

ทดสอบจึงควรมีตัวอย่างควบคุมคุณภาพทั้งปฏิกิริยาบวกและลบเพื่อยืนยันผลการทดสอบให้มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากขึ้น



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* และสัมพันธ์กับการดื้อยา Isoniazid คือ การกลายพันธุ์ของยีน *katG* (64.9 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) ถัดมาเป็นยีน *inhA* (25.8 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) ในขณะที่เชื้อบางส่วนเกิดการกลายพันธุ์ร่วมกันของทั้งสองยีนนี้ (1.2 % ของเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid) โดยทุกการกลายพันธุ์ของยีน *katG* เกิดขึ้นที่ตำแหน่งโคดอน 315 ซึ่งมีการกลายพันธุ์ 2 รูปแบบ ได้แก่ Serine 315-Threonine (99.1% ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) และ Serine315-Asparagine (1.9 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) ตำแหน่งการกลายพันธุ์หลักของยีน *inhA* ได้แก่ ตำแหน่งเหนื่อยีนที่ลำดับเบสที่ 15 (97.8 % ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) และ ตำแหน่งเหนื่อยีนที่ลำดับเบสที่ 13 (2.2% ของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์) ทั้งนี้ยังพบว่าเชื้อที่ดื้อยา Isoniazid บางส่วนที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนทั้งสอง ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุการกลายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากยีนทั้งสองชนิดข้างต้น

การศึกษาค้นคว้านี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนื่อยีน (-15) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการดื้อยา Isoniazid ในเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้เทคนิค Multiplex allele specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดังนี้ เข้มข้น Primer ของยีน IS1081 เท่ากับ 0.02 μ M *katG* 315 เท่ากับ 0.04 μ M และ *inhA* (-15) เท่ากับ 1.8 μ M ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 20 ng dNTP 100 μ M และดำเนินปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ Annealing 62 $^{\circ}$ C จำนวน 30 รอบปฏิกิริยา และใช้การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยใช้ Dipstick developing buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 250 mM ปริมาตร 10 μ l ร่วมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 2 μ l และอ่านผลปฏิกิริยาที่ 15 นาที ทั้งนี้เทคนิค เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่พัฒนาขึ้น มีขีดจำกัดต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้ ดังนี้ ยีน IS1081 เท่ากับ 2 ng ยีน *katG* 315 เท่ากับ 2 ng และ *inhA* (-15) เท่ากับ 20 ng และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. kansasii*, *M. gordonae* และ *M. intracellulare*

เทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีความไวและค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 99.20% และ 100% ตามลำดับ ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดสอบแอนติเจน MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid

test ในขณะที่มีความไวเท่ากับ 91.67% ความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% และค่าทำนายผลลบ 85.42% ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ที่ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางพีโนไทป์ โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมาก

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิค MAS-PCR ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และเทคนิค Sanger DNA Sequencing ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ณ ตำแหน่งโคดอน 315 และยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) มีค่าความไวและค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% ในขณะที่มีค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกเท่ากับ 99.28% และ 99.11% ตามลำดับ ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ณ ตำแหน่งโคดอน 315 และ 99.51% และ 97.78% ตามลำดับ ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ที่ตำแหน่งเหนือยีน (-15) โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมาก ทั้งนี้เทคนิค MAS-PCR ยังคงต้องอาศัยเครื่องมือ Thermocycler สำหรับทำปฏิกิริยา MAS-PCR แต่การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ช่วยทำให้ลดขั้นตอน อุปกรณ์ในการอ่านผลของปฏิกิริยาน้อยลง อ่านผลง่ายและรวดเร็วมากขึ้น เป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนในการทดสอบไม่ซับซ้อน ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ ดังนั้นเพื่อให้การนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยา Isoniazid สำหรับงานภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็กเป็นไปได้มากขึ้น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อาศัยอุณหภูมิคงที่ หรือ Isothermal amplification และใช้ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ซึ่งจะช่วยให้ลดการใช้เครื่องมือที่จำเพาะในขั้นตอนการทดสอบได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น

บรรณานุกรม

1. WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 22 January 2019. Available from : https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. Kittikraisak W, Burapat C, Kaewsard S, Watthanaamornkiet W, Sirinak C, Sattayawuthipong W, et al. Factors associated with tuberculosis treatment default among HIV-infected tuberculosis patients in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(1):59-66.
3. สำนักวัณโรค. แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ.2561. In: กระทรวงสาธารณสุข ก, editor. กรุงเทพมหานคร2561.
4. Tharinjaroen CS. การตรวจวินิจฉัยวัณโรค จากความรู้ สู่นวัตกรรมเพื่อชุมชน. *Associated Medical Sciences.* 2017;50:1-21.
5. Sangsayun P. วัณโรคดื้อยา. *วารสารกรมการแพทย์.* 2561(3):5-18.
6. Erwin ER, Addison AP, John SF, Olaleye OA, Rosell RC. Pharmacokinetics of isoniazid: The good, the bad, and the alternatives. *Tuberculosis.* 2019.
7. สำนักวัณโรค. แนวทางบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข: กรุงเทพมหานคร; 2558.
8. Hitap. "วัณโรคดื้อยา" ปัญหาระดับชาติ2556 [cited 2019 1 June]. Available from: <http://www.hitap.net/17316>.
9. กรมควบคุมโรค. แนวทางปฏิบัติป้องกันควบคุม วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก ภายใต้พระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ.2558. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
10. สำนักวัณโรค ก. การคัดกรองเพื่อค้นหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
11. Gegia M, Winters N, Benedetti A, van Soolingen D, Menzies D. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2017;17(2):223-34.
12. Brossier F, Cambau E, Tessier E, Jarlier V, Sougakoff W. The in vitro mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2016;101:144-5.
13. Vilchèze C, Jacobs JR. WR. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiology Spectrum.* 2014;2(4).

14. Quenard F, Fournier PE, Drancourt M, Brouqui P. Role of second-line injectable antituberculosis drugs in the treatment of MDR/XDR tuberculosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;50(2):252-4.
15. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. 2001;2(3):164-8.
16. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119628-e.
17. Jaksuwan R, Tharavichikul P, Patumanond J, Chuchottaworn C, Chanwong S, Smithtikarn S, et al. Genotypic distribution of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in northern Thailand. *Infect Drug Resist*. 2017;10:167-74.
18. Suthum K, Tipkrua N. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance Testing between Real-time PCR Using a Dual Priming Oligonucleotide Method and Drug Susceptibility Testing by The BACTEC TM MGIT TM 960 System 2014.
19. Gupta A, Anupurba S. Detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Methods, principles and applications. *Indian Journal of Tuberculosis*. 2015;62(1):13-22.
20. Faksri K, Kaewprasert O, Ong RT-H, Suriyaphol P, Prammananan T, Teo Y-Y, et al. Comparisons of whole genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019.
21. Kamphee H, Chaiprasert A, Prammananan T, Wiriyachaiyorn N, Kanchanatavee A, Dharakul T. Rapid Molecular Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137791.
22. Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiology*. 2011;6(9):1067-82.
23. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin Spain: GPS Publishing; 2016.
24. Nathavitharana RR, Cudahy PGT, Schumacher SG, Steingart KR, Pai M, Denkinger CM. Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*. 2017;49(1):1601075.
25. Evans CA. GeneXpert--a game-changer for tuberculosis control? *PLoS Med*. 2011;8(7):e1001064-e.

26. Adigun. R, Singh. R. Tuberculosis2019 [cited 2019 1 June]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441916/>.
27. Barberis I, Bragazzi NL, Galluzzo L, Martini M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. J Prev Med Hyg. 2017;58(1):E9-E12.
28. contributors W. Mycobacterium2019 [cited 2019 10 March]:[Mycobacterium p.]. Available from: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Mycobacterium&oldid=899949922>.
29. Pena T, Klesney-Tait J. Mycobacterial Infections in Solid Organ and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Clinics in Chest Medicine. 2017;38(4):761-70.
30. Techata A. วัณโรคในหญิงตั้งครรภ์ (Tuberculosis in pregnancy) 2019 [cited 2019 20 March]. Available from: http://www.med.cmu.ac.th/dept/obgyn/2011/index.php?option=com_content&view=article&id=1483:tuberculosis-in-pregnancy&catid=45&Itemid=561.
31. Getahun H, Sculier D, Sismanidis C, Grzemska M, Raviglione M. Prevention, Diagnosis, and Treatment of Tuberculosis in Children and Mothers: Evidence for Action for Maternal, Neonatal, and Child Health Services2012. S216-27 p.
32. Cardona P-J. Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2018;36(1):38-46.
33. วรณไสย ค. พยาธิวิทยาของโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อย. Pathology of common bacterial infections. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
34. Rao M, Ippolito G, Mfinanga S, Ntoumi F, Yeboah-Manu D, Vilaplana C, et al. Latent TB Infection (LTBI) – *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and the dynamics of the granuloma battleground. International Journal of Infectious Diseases. 2019;80:S58-S61.
35. Singhanian A, Wilkinson RJ, Rodrigue M, Haldar P, O'Garra A. The value of transcriptomics in advancing knowledge of the immune response and diagnosis in tuberculosis. Nat Immunol. 2018;19(11):1159-68.
36. Madacki J, Mas Fiol G, Brosch R. Update on the virulence factors of the obligate pathogen *Mycobacterium tuberculosis* and related tuberculosis-causing mycobacteria. Infection, Genetics and Evolution. 2018.
37. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):463-96.
38. Maiti D, Bhattacharyya A, Basu J. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. The Journal of biological chemistry. 2001;276(1):329-33.

39. Guidelines for treatment of drug-susceptible tuberculosis and patient care. In: Organization WH, editor. Switzerland 2017.
40. ธรรมคัมภีร์ ก, รัชชัยพิชิตกุล ว, สุวรรณพิมลกุล ก. แนวทางการรักษาผู้ป่วยวัณโรคที่หายหลายขนานด้วยหลักสูตรระยะสั้น 9 เดือน. In: กระทรวงสาธารณสุข สก, editor.: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิค แอนด์ดีไซน์; 2561.
41. Unissa AN, Subbian S, Hanna LE, Selvakumar N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Infection, Genetics and Evolution. 2016;45:474-92.
42. Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, et al. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* *inhA* resolves the target of isoniazid. Nature Medicine. 2006;12(9):1027-9.
43. Lei B, Wei C-J, Tu S-C. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid: ACTIVATION BY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* KatG, ISOLATION, AND CHARACTERIZATION OF *InhA* INHIBITOR. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(4):2520-6.
44. Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. Molecular Microbiology. 2006;62(5):1220-7.
45. Isoniazid. Tuberculosis. 2008;88(2):112-6.
46. Arbex MA, Varella Mde C, Siqueira HR, Mello FA. Antituberculosis drugs: drug interactions, adverse effects, and use in special situations. Part 2: second line drugs. Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. 2010;36(5):641-56.
47. Odone A, Calderon R, Becerra MC, Zhang Z, Contreras CC, Yataco R, et al. Acquired and Transmitted Multidrug Resistant Tuberculosis: The Role of Social Determinants. PLoS One. 2016;11(1):e0146642-e.
48. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis. In: Organization WH, editor.: World Health Organization; 2018.
49. Unissa AN, Selvakumar N, Narayanan S, Suganthi C, Hanna LE. Investigation of Ser315 substitutions within *katG* gene in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from south India. Biomed Res Int. 2015;2015:257983-.
50. Lempens P, Meehan CJ, Vandellanoot K, Fissette K, de Rijk P, Van Deun A, et al. Isoniazid resistance levels of *Mycobacterium tuberculosis* can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations. Scientific Reports. 2018;8(1):3246.
51. Jnawali HN, Ryoo S. First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance 2013 [cited 2019 25 Febuary]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/tuberculosis-current-issues-in-diagnosis-and-management/first-and-second-line-drugs-and-drug-resistance>.

52. Prammananan T. Distribution of Drug-Resistant Genes Among Thai Multidrug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* (MDR-TB) Clinical Isolates. 2017. 2017;63(3):4.
53. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 2009;13(11):1320-30.
54. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of the Catalase-Peroxidase Gene (katG) and inhA Locus in Isoniazid-Resistant and -Susceptible Strains of *Mycobacterium tuberculosis* by Automated DNA Sequencing: Restricted Array of Mutations Associated with Drug Resistance. The Journal of Infectious Diseases. 1996;173(1):196-202.
55. Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(8):2640-9.
56. Niehaus AJ, Mlisana K, Gandhi NR, Mathema B, Brust JCM. High Prevalence of inhA Promoter Mutations among Patients with Drug-Resistant Tuberculosis in KwaZulu-Natal, South Africa. PLoS One. 2015;10(9):e0135003-e.
57. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification—SYBR green I assays. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2019;33(2):e22655.
58. Kunawararak P. ต้นทุนประสิทธิผลในการวินิจฉัยวัณโรคด้วยโรคตัวอย่างหลายขนานของวิธีการตรวจที่รวดเร็ว โดย เทคนิคทางโมเลกุล (XpertTB/RIF). 2556.
59. Jenkins HE, Zignol M, Cohen T. Quantifying the burden and trends of isoniazid resistant tuberculosis, 1994-2009. PLoS One. 2011;6(7):e22927-e.
60. Boonsarngsuk V, Tansirichaiya K, Kiatboonsri S. Thai drug-resistant tuberculosis predictive scores. Singapore medical journal. 2009;50(4):378-84.
61. Banik A, Das N, Lyngdoh V, Phukan A, Dutta V. Prevalence and first-line drug sensitivity trends of *Mycobacterium tuberculosis* at a tertiary center in North-East India2018. 32 p.
62. Villegas L, Otero L, R Sterling T, Huaman M, Van der Stuyft P, Gotuzzo E, et al. Prevalence, Risk Factors, and Treatment Outcomes of Isoniazid- and Rifampicin- Mono-Resistant Pulmonary Tuberculosis in Lima, Peru2016. e0152933 p.
63. Huyen MNT, Cobelens FGJ, Buu TN, Lan NTN, Dung NH, Kremer K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(8):3620-7.

64. Li Q, Zhao G, Wu L, Lu M, Liu W, Wu Y, et al. Prevalence and patterns of drug resistance among pulmonary tuberculosis patients in Hangzhou, China. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7:61-.
65. Chumpangern W, Reechaipichitkul W. Isoniazid-resistant Tuberculosis: WHO Treatment Guidelines 2018 2018.
66. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. In: Organization WH, editor. Switzerland 2018.
67. contributors W. Becton Dickinson 2019 [cited 2019 10 มกราคม]:[Becton Dickinson p.]. Available from: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Becton_Dickinson&oldid=900943882.
68. Schön T, Miotto P, Köser CU, Viveiros M, Böttger E, Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(3):154-60.
69. Santos PFGD, Costa ERD, Ramalho DM, Rossetti ML, Barcellos RB, Nunes LdS, et al. Detection of tuberculosis drug resistance: a comparison by *Mycobacterium tuberculosis* MLPA assay versus Genotype® MTBDRplus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):396-403.
70. Xpert MTB/RIF implementation manual. In: Organization WH, editor.: France; 2014.
71. Lawn SD, Nicol MP. Xpert(R) MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1067-82.
72. Cepheid. Xpert® HBV Viral Load 2016 [cited 2019 23 March]. Available from: <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/virology/xpert-hbv-viral-load>.
73. (WHO) WHO. MOLECULAR LINE PROBE ASSAYS FOR RAPID SCREENING OF PATIENTS AT RISK OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS. In: (WHO) WHO, editor. 2008.
74. Ninan MM, Gowri M, Christopher DJ, Rupali P, Michael JS. The diagnostic utility of line probe assays for multidrug-resistant tuberculosis. *Pathog Glob Health*. 2016;110(4-5):194-9.
75. Hagemann IS. Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J, editors. *Clinical Genomics*. Boston: Academic Press; 2015. p. 3-19.
76. Ckumdee J, Santiwatanakul S, Kaewphinit T, editors. Development of a rapid and sensitive DNA turbidity biosensor test for diagnosis of katG gene in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis*. 2017 IEEE SENSORS; 2017 29 Oct.-1 Nov. 2017.

77. Nagai K, Horita N, Yamamoto M, Tsukahara T, Nagakura H, Tashiro K, et al. Diagnostic test accuracy of loop-mediated isothermal amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis*: systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2016;6:39090-.
78. Chen i, Richmond, VA. ALLELE SPECIFIC PCR FOR GENOTYPING. United States 2003.
79. จวนสัมฤทธิ์ อ, สุระ ช. ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. 2534;4:469-77.
80. Twyman RM. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 871-5.
81. Wang X, Jiao J, Xu W, Chai X, Li Z, Wang Q. A simple, rapid and economic method for detecting multidrug-resistant tuberculosis. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013;17(6):667-71.
82. Chia B-S, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Y Kim E, Sailer C, et al. Use of Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction (MAS-PCR) to Detect Multidrug-Resistant Tuberculosis in Panama 2012. e40456 p.
83. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012(62):3923.
84. Tohoku Bio-Array [cited 2019 March 28]. Available from: https://www.tbioarray.com/index_en.html.
85. Shanmugakani RK, Akeda Y, Yamamoto N, Sakamoto N, Hagiya H, Yoshida H, et al. PCR-Dipstick Chromatography for Differential Detection of Carbapenemase Genes Directly in Stool Specimens. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6).
86. E. Farrell R. Stringency. 2010. p. 173-8.
87. BIO-ARRAY T. Standard Protocol for Genetic Testing using C-PAS series. In: BIO-ARRAY T, editor. TOHOKU BIO-ARRAY.
88. Buderer NM. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*. 1996;3(9):895-900.
89. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. In: Organization WH, editor. Spain 2018.
90. Booniam S, Chaiprasert A, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(4):396-9.

91. Cracolici V. ADVANCED APPROACH: Introduction to The Yaku-Bonczyk Primer Design Method. In: LB-145 Laboratory Guide [Internet]. 2011 [cited 2019 April 25]. Available from: <https://msu.edu/user/luckie/ABLE2012/lab-book.pdf>.
92. Meyers H, Ohri S, Phillips K, Khatib-Shahidi B, Vangorder E. Alteration of Yaku-Bonczyk mismatch location to diagnose the G551D mutation on the human CFTR gene 2018.
93. Collins DM, Stephens DM. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS microbiology letters. 1991;67(1):11-5.
94. Singpanomchai N. Development of Allele specific-recombinase polymerase amplification for detection of Rifampicin and Isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Chulalongkorn University; 2017.
95. Hartling L, Hamm M, Milne A, Vandermeer B, Santaguida PL, Ansari M, et al. Validity and Inter-rater Reliability Testing of Quality Assessment Instruments. Agency for Healthcare Research and Quality, Services DoHaH; 2012.
96. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respir Res. 2001;2(3):164-8.
97. Madania A, Habous M, Zarzour H, Ghoury I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. Pol J Microbiol. 2012;61(1):23-32.
98. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. PLoS One. 2015;10(3):e0119628.
99. Torres JN, Paul LV, Rodwell TC, Victor TC, Amalraja AM, Elghraoui A, et al. Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates. Emerg Microbes Infect. 2015;4(7):e42-e.
100. Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jaton K, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(6):3047-53.
101. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5477-82.
102. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MSN, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, et al. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in

- Mycobacterium tuberculosis clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiology*. 2009;9(1):39.
103. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, et al. Identification of katG mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(5):1793-9.
104. Zenteno-Cuevas R, Cuevas-Córdoba B, Parissi-Crivelli A. rpoB, katG and inhA mutations in multi-drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from southeast Mexico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2018;37.
105. Chien JY, Chen YT, Wu SG, Lee JJ, Wang JY, Yu CJ. Treatment outcome of patients with isoniazid mono-resistant tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(1):59-68.
106. Vilchèze C, Jacobs WR, Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4):Mgm2-0014-2013.
107. Song Y, Wang G, Li Q, Liu R, Ma L, Li Q, et al. The Value of the inhA Mutation Detection in Predicting Ethionamide Resistance Using Melting Curve Technology. *Infect Drug Resist*. 2021;14:329-34.
108. Click ES, Kurbatova EV, Alexander H, Dalton TL, Chen MP, Posey JE, et al. Isoniazid and Rifampin-Resistance Mutations Associated With Resistance to Second-Line Drugs and With Sputum Culture Conversion. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020;221(12):2072-82.
109. Zaw M, Faris A, Oo Tha N, Mustapha Z, Emran NA, Lin Z. KatG 315 Mutation as a Molecular Determinant for Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Borneo Journal of Medical Sciences*. 2017;11:1-12.
110. Valafar SJ. Systematic Review of Mutations Associated with Isoniazid Resistance Points to Continuing Evolution and Subsequent Evasion of Molecular Detection, and Potential for Emergence of Multidrug Resistance in Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(3).
111. Liu L, Jiang F, Chen L, Zhao B, Dong J, Sun L, et al. The impact of combined gene mutations in inhA and ahpC genes on high levels of isoniazid resistance amongst katG non-315 in multidrug-resistant tuberculosis isolates from China. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):183-.
112. Kolyva A, Karakousis P. Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance. 2012.
113. van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the katG gene are associated with high-level

resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis.* 2000;182(6):1788-90.

114. Marmiroli N, Peano C, Maestri E. 1 - Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M, editor. *Food Authenticity and Traceability*: Woodhead Publishing; 2003. p. 3-33.

115. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp.* 2012(63):e3998.

116. Sint D, Raso L, Traugott M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods Ecol Evol.* 2012;3(5):898-905.

117. Bachmann HS, Siffert W, Frey UH. Successful amplification of extremely GC-rich promoter regions using a novel 'slowdown PCR' technique. *Pharmacogenetics.* 2003;13(12):759-66.

118. Imyanitov EN, Buslov KG, Suspitsin EN, Kuligina ES, Belogubova EV, Grigoriev MY, et al. Improved Reliability of Allele-Specific PCR. *BioTechniques.* 2002;33(3):484-90.

119. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):559-70.

120. Barbosa C, Nogueira S, Gadanho M, Chaves S. DNA extraction: Finding the most suitable method. 2016. p. 135-54.

121. Babu D, Kumar P, Purohit H. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using MPT64 Immunochromatographic Assay. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis.* 2018;Volume 7:3.

122. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N. Rapid and Sensitive PCR-Dipstick DNA Chromatography for Multiplex Analysis of the Oral Microbiota. *Biomed Res Int.* 2014;2014:180323.

123. Yang JL, Wang MS, Cheng AC, Pan KC, Li CF, Deng SX. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection. *World J Gastroenterol.* 2008;14(18):2872-6.

124. Todd D, Mawhinney KA, McNulty MS. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1661-6.

125. Shao W, Khin S, Kopp WC. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank.* 2012;10(1):4-11.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นवलนภา จรจรรย์ส
วัน เดือน ปี เกิด	21 มกราคม 2534
สถานที่เกิด	อ.บ้านแพรง จ.อยุธยา
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY