



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจหากลไกการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานใน
เชื้อวัณโรค

Identification of a Novel Mechanism Conferring Aminoglycoside
Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

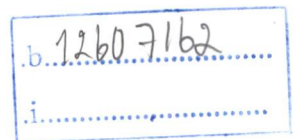
ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤษกุล
รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ
ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนนท์

RCH
RC
311.4
ส 349ก

เลขหมู่.....131143
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ค. 2557

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔-๒๕๕๕
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ชื่อโครงการ การตรวจหาการดื้อยาของกลุ่ม Aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค
แหล่งเงิน งบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ประจำปี 2554-2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 480,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2555 ✓

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุหน่วยงานต้นสังกัด

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณະนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลกที่สำคัญซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* การอุบัติของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant *M. tuberculosis*; MDR-TB) และเชื้อวัณโรคดื้อยาทุกขนาน (Extensively drug-resistant *M. tuberculosis*; XDR-TB) ทำให้การรักษาและการควบคุมวัณโรคทำได้ยากขึ้น ดังนั้น การตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาอย่างรวดเร็วจึงมีความสำคัญสำหรับการเอาชนะวัณโรคดื้อยาเหล่านี้ ยาปฏิชีวนะอะมิคาซินและกานามัยซินเป็นยาสำรองชนิดฉีดที่ใช้สำหรับการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน การต้านทานต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่งทำให้เชื่อถูกนิยามว่าเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาทุกขนาน กลไกการดื้อยาเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันดีในทุกกลไก ความเข้าใจในกลไกการดื้อยาให้มากขึ้นจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่ดื้อยาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านยาปฏิชีวนะอะมิคาซินและกานามัยซินของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน 3 สายพันธุ์และเชื้อวัณโรคดื้อยาทุกขนาน 26 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย เป็นที่น่าเสียดายว่าการแสดงออกของเวกเตอร์สำหรับ *E. coli* และมัคโคแบคทีเรีย pOLYG และ pSMT1 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดมาจากเชื้อวัณโรคที่แยกมาจากผู้ป่วยไม่ประสบความสำเร็จ ดังนั้น จึงทำการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์โดยการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ยีน *eis* ยีน *gidB* ยีน *tap* และยีน *whiB7* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่เพอริเมอเรสและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ผลการทดลองพบว่าเชื้อวัณโรคดื้อยาร้อยละ 72 มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G ในขณะที่เชื้อวัณโรคดื้อยาร้อยละ 17 มีการกลายพันธุ์ของบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* ที่ตำแหน่ง C-14T หรือ G-37T เชื้อวัณโรคดื้อยาที่เหลืออีกร้อยละ 11 นั้นยังไม่ทราบกลไกการดื้อยาที่แน่นอน การกลายพันธุ์ของยีน *tap* และยีน *gidB* ถูกพบในทั้งในเชื้อวัณโรคที่ดื้อและไวต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน แสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยานี้

คำสำคัญ : มัยโคแบคทีเรีย, ยาสำรอง, การดื้อยา, อะมิโนไกลโคไซด์

Research Title: Identification of a novel mechanism conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Researcher: Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch Faculty of Science King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang, Assoc. Prof. Dr. Angkana Chaiprasert Faculty of Medicine Siriraj hospital, Dr. Therdsak Prammananan National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an important global public health problem caused by infection with *Mycobacterium tuberculosis*. The emergence of multidrug-resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) and extensively drug-resistant *M. tuberculosis* (XDR-TB) makes the treatment and control of tuberculosis difficult. Rapid detection of drug-resistant strains is important for the successful treatment of drug-resistant tuberculosis. Amikacin (AK) and kanamycin (KM) are injectable second-line anti-TB drugs used for treatment of MDR-TB, and resistance to one of these drugs is a criterion for XDR-TB. Not all resistance mechanisms to these drugs are well understood. Improved understanding of resistance mechanisms could promote the development of highly sensitive methods for the detection of drug-resistant strains. This study aimed to investigate the mechanisms associated with AK and KM resistance in 26 XDR-TB and 3 MDR-TB clinical strains isolated in Thailand. Unfortunately, overexpression of *E. coli*/*Mycobacteria* shuttle vectors pOLYG and pSMT1 containing DNA fragments isolated from *M. tuberculosis* clinical isolates was unsuccessful. Therefore, genes involving aminoglycoside resistance including 16S rRNA, *eis*, *gidB*, *tap*, and *whiB7* were investigated by DNA amplification by PCR and sequencing. The results revealed that 72% of resistant strains had an A1401G mutation in the 16S rRNA gene, while 17% harbored either a C-14T or a G-37T mutation in the promoter region of the *eis* gene. No known resistance mechanisms were found in the remaining 11% of the resistant strains. Mutations of *tap* and *gidB* were found in both KM-resistant and KM-susceptible strains, indicating that they were not associated with the resistance phenotype.

Key words: *Mycobacterium*, second-line drug, resistance, aminoglycoside

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การตรวจหาไกลโคการติ้อยากลุ่ม aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากงบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี ๒๕๕๔ ถึง ๒๕๕๕ คณะผู้ร่วมวิจัย ขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการทุนวิจัยวัณโรค ต้อยยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกษ์

รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ

ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อวัณโรคดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรค	29
4.2 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	29
4.3 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค ด้วยวิธีการทำ Overexpression ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคดื้อยาในเซลล์ <i>E. coli</i>	33
4.4 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้อง	38
4.5 ผลการวิเคราะห์ค่า MIC (Minimum Inhibition concentration) ต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซิน และกานามัยซินของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์	43
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	45
บรรณานุกรม	50
ภาคผนวก	54
ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย	66

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	22
3.2 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำ Dephosphorylation ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI	23
3.3 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Ligation	23
3.4 โพรเมออร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ของเชื้อ <i>M.tuberculosis</i> สายพันธุ์ที่ติดต่อกานามัยซิน	26
4.1 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ทั้ง 29 สายพันธุ์	32
4.2 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน <i>eis</i> , <i>gidB</i> , <i>tap</i> และ <i>whiB7</i> และค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะ อะมิกาซินและกานามัยซิน ในเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 8 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA	44

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ขนาดและรูปร่างของเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
2.2 การก่อโรคของเชื้อวัณโรคในปอด	7
3.1 วิธีการเจือจางความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Sau3AI</i> ในการตัดแบบ Partial digestion	21
3.2 ตัวอย่างการออกแบบไพรเมอร์ของยีน <i>tap</i> (Rv1258c)	25
4.1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA	30
4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ 13287 ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ด้วยโปรแกรม ClustalW	31
4.3 ตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ต่างๆ ที่ดื้อต่อยากานามัยซิน	34
4.4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุด High-speed Plasmid Mini Kit	35
4.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ 17984 ด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> แบบ Partial digestion	36
4.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i>	37
4.5 แถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์	34
4.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>rrs</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ 13287 ด้วยโปรแกรม ClustalW และตำแหน่งการกลายพันธุ์ A1401G ในยีน <i>rrs</i>	35
4.7 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน <i>eis</i> (Rv2416c) ยีน <i>gidB</i> (Rv3919c) ยีน <i>tap</i> (Rv1258c) และยีน <i>whiB7</i> (Rv3197A)	39
4.8 การกลายพันธุ์ของยีน <i>eis</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ดื้อต่อยากานามัยซิน ที่ตำแหน่ง C-14T (ก) และ G-37T (ข)	41
4.9 การกลายพันธุ์ของยีน <i>gidB</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ดื้อต่อยากานามัยซิน ที่ตำแหน่ง A276C และ C299T การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>eis</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	42
4.10 การกลายพันธุ์ของยีน <i>tap</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ดื้อต่อยากานามัยซินที่ตำแหน่ง Ins581C	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของมนุษย์เป็นลำดับต้นๆ มาตั้งแต่อดีตกาล จนกระทั่งในปีพุทธศักราช 2425 Robert Koch นายแพทย์ชาวเยอรมันได้ค้นพบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของวัณโรคคือเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในแต่ละปี จะมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคประมาณ 2 ล้านคน และยังมีผู้ติดเชื้ออีกมากที่ยังไม่แสดงอาการ จากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี พ.ศ. 2552 พบว่าประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 22 ประเทศที่มีผู้ป่วยวัณโรคมากที่สุดในโลก โดยประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่ 18 ในแต่ละปี มีผู้ป่วยวัณโรคใหม่ประมาณ 91,000 รายและมีผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตประมาณ 14,000 คน (WHO, 2009) การควบคุมวัณโรคให้ได้ผลดีนั้นต้องประกอบด้วย การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยให้ได้ผลรวดเร็ว และถูกต้อง ตลอดจนการรักษาผู้ป่วยให้หายขาดอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อลดการแพร่กระจายเชื้อจากผู้ป่วยสู่บุคคลอื่นและชุมชน ในปัจจุบัน การควบคุมวัณโรคในประเทศไทยที่อาศัยปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นนั้นยังไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพเท่าที่ควร นอกจากนี้ ยังมีอุบัติการณ์การติดเชื้อวัณโรคคือยา ทั้งเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) และเชื้อวัณโรคคือยาเกือบทุกขนาน (Extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) ที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศทั่วโลก เป็นสาเหตุอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การควบคุมวัณโรคเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น แนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาความรุนแรงของวัณโรคไม่ให้เพิ่มมากขึ้นและสามารถกำจัดวัณโรคให้หมดไปได้ในระยะยาว คือการพัฒนาการรักษาวัณโรคที่มีประสิทธิภาพซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้กับเชื้อวัณโรคคือยาและเชื้อวัณโรคที่อยู่ในระยะแฝง และการพัฒนาการใช้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพให้ภูมิคุ้มกันกับผู้ป่วยวัณโรคปอดซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถแพร่กระจายเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม การพัฒนาการรักษาโรคหรือการพัฒนาวัคซีนจำเป็นต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจในเชื้อวัณโรคเสียก่อน ไม่ว่าจะเป็นความรู้เกี่ยวกับกลไกพยาธิกำเนิดของโรค ความรู้ในด้านพันธุศาสตร์ของเชื้อ ความรู้เกี่ยวกับกลไกการคือยา ความรู้เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันเมื่อเชื้ออยู่ในร่างกาย รวมทั้งความรู้เกี่ยวกับปัจจัยและวิธีการที่ทำให้เชื้อเข้าสู่ระยะแฝง (Persistence) ในปัจจุบัน ความรู้ที่กล่าวมานี้ยังไม่สามารถอธิบายและเข้าใจได้ทั้งหมด ยังต้องอาศัยการศึกษาค้นคว้าวิจัยอีกมาก

ยาที่ใช้รักษาวัณโรคในปัจจุบันประกอบด้วยยาหลักที่ใช้ร่วมกันหลายชนิด ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (Isoniazid) ริแฟมพิซิน (Rifampicin) ไพราซินามายด์ (Pyrazinamide) และอีแทมบูทอล (Ethambutol) นอกจากนี้ ยังมียาสำรองที่จะนำมาใช้ในกรณีที่เชื้อคือยาหลักริแฟมพิซิน และ/หรือ ไอโซไนอะซิด ได้แก่ ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) เอทไทโอนามายด์ (Ethionamide) กรกพาราอะมิโนซาลิไซลิก (PAS) และไซโคลเซอร์ิน (Cycloserine)

ยาต่างๆ ที่กล่าวมานี้เกือบทั้งหมดโดยเฉพาะยาหลักได้ค้นพบและใช้รักษาวัณโรคมานานไม่น้อยกว่า 40 ปีแล้ว ในปัจจุบันพบเชื้อที่ดื้อต่อยาเหล่านี้แล้วทั้งหมด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง มีรายงานพบเชื้อดื้อยาสายพันธุ์ที่เรียกว่า Totally drug-resistant tuberculosis ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาที่ใช้รักษาวัณโรคทั้งหมดที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Velayati et al., 2009) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนาศึกษารักษาวัณโรคชนิดใหม่ ที่จะใช้รับมือกับปัญหาวัณโรคดื้อยาที่พบมากและรุนแรงขึ้นขนาดอันใกล้นี้ การศึกษากลไกการดื้อยาของเชื้อวัณโรคเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของยา และวิธีการที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา ซึ่งความรู้ที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาปรับปรุงยาหรือสูตรโครงสร้างของยาเพื่อเอาชนะการดื้อยาของเชื้อ นอกจากนี้ ความรู้ที่ได้ยังสามารถนำไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อดื้อยาแบบทราบผลเร็ว โดยอาศัยวิธีการทางอณูชีววิทยาตรวจหายีนดื้อยาอีกด้วย

ยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในปัจจุบัน ได้แก่ อะมิคาซิน (Amikacin) กานามัยซิน (Kanamycin) และคาปริโอมัยซิน (Capreomycin) โดยยากาปริโอมัยซินเป็นยาเพียงชนิดเดียวที่ไม่ใช่ในประเทศไทย ยากุ่มนี้เป็นยาสำคัญในกลุ่มยาสำรองคู่กับยากุ่มฟลูออโรควิโนโลนในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และการดื้อยากุ่มนี้ยังใช้เป็นหลักในการนิยามเชื้อวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม XDR-TB ยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกฤทธิ์โดยจับกับไรโบโซม (Ribosome) บริเวณ 16S rRNA ของ 30S Small subunit และยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อ การดื้อต่อยากุ่มนี้ของเชื้อวัณโรคพบมากกว่าร้อยละ 90 เกิดจากการผ่าเหล่า (Mutation) ของยีน 16S rRNA บริเวณตำแหน่งจับของยา ส่งผลให้ยาไม่สามารถจับกับเป้าหมายและออกฤทธิ์ได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีเชื้ออีกจำนวนหนึ่งที่ดื้อต่อยากุ่มนี้ แต่ไม่พบการผ่าเหล่าดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อวัณโรคยังมีกลไกอื่นที่เกี่ยวเนื่องต่อการดื้อยา จึงเป็นที่มาของการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่ว่านี้ และผลจากการศึกษาที่ได้จะสามารถนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในการดื้อต่อยา โดยอาจนำไปใช้ศึกษาต่อยอดเพื่อการพัฒนาต้านวัณโรคชนิดใหม่ได้ ส่วนในระยะสั้น สามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ XDR-TB แบบทราบผลเร็วที่สามารถตรวจหาเชื้อต่อยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ได้มากกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน

จากผลการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยกับเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยกับการดื้อยากานามัยซินและอะมิคาซินพบว่า ประมาณร้อยละ 14-30 ของเชื้อที่ดื้อยาที่ศึกษานั้น ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ในบริเวณที่มีการรายงานมาก่อน โดยเชื้อวัณโรคเหล่านี้ส่วนมากจะดื้อต่อยาทั้งกานามัยซินและอะมิคาซิน ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าน่าจะมีกลไกอื่นๆ ที่มีผลทำให้เชื้อวัณโรคเหล่านี้ดื้อต่อยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์อีก เมื่อรวมกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ จึงทำให้เกิดแนวคิดที่จะทำการค้นหาและศึกษายีนอื่นๆ ที่มีรายงานถึงการดื้อต่อยากุ่มนี้ในเชื้อวัณโรค เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้ ทำให้เข้าใจถึงกลไกการดื้อต่อยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ยิ่งขึ้น และอาจจะนำองค์ความรู้นี้มาใช้ในการพัฒนาทางการแพทย์ได้อีกต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรค

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรค 2 วิธี คือ (1) ทำการ Overexpression ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเชื้อวัณโรคดื้อยากานามัยซิน และอะมิกาซินที่ไม่ได้เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่พบเป็นส่วนใหญ่ โดยใช้เชื้อ *Mycobacterium smegmatis* เป็น Model bacteria ในการคัดเลือกโค่นที่ดื้อยาในกลุ่มนี้ จากนั้นทำการวิเคราะห์ยีนที่อยู่ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีผลต่อการดื้อยา (2) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกจากผู้ป่วยวัณโรค โดยจะทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อที่ดื้อและไวต่อยากานามัยซิน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ รวมทั้งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนายาต้านวัณโรคชนิดใหม่ที่สามารถทำลายเชื้อก่อวัณโรคดื้อยาเหล่านี้ได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

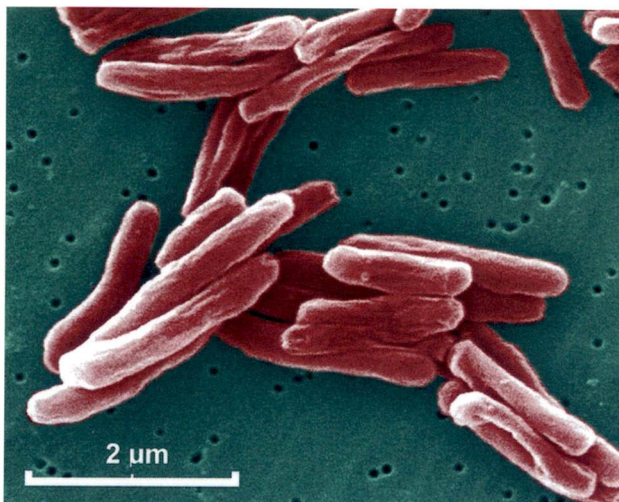
2.1 วัณโรค

วัณโรคเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* เมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อวัณโรคแล้ว จะมีอาการโดยทั่วไปคือ เป็นไข้เรื้อรัง ผอมลง เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ไข้มีเสมหะ จนถึงไอเป็นเลือด หอบเหนื่อย เจ็บหน้าอก ต่อมน้ำเหลืองโต คลำได้ก้อนในท้อง ปวดศีรษะ หมดสติ ชักเกร็ง ฯลฯ คนส่วนมากเมื่อติดเชื้อวัณโรคมักจะไม่แสดงอาการใดๆ เนื่องจากภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ มีเพียงร้อยละ 8-10 ของผู้ติดเชื้อเท่านั้นที่จะเกิดเป็นโรคและแสดงอาการ เมื่อกล่าวถึงวัณโรคนั้น บุคคลทั่วไปมักจะเข้าใจไปว่าเป็นโรคที่เกิดที่ปอดหรือวัณโรคปอด แต่ความจริงแล้ว วัณโรคอาจเป็นได้กับทุกๆ อวัยวะของร่างกาย เช่น ลำไส้ ตับ ม้าม ต่อมน้ำเหลือง ผิวหนัง และเยื่อหุ้มสมอง ฯลฯ อย่างไรก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ยังเชื่อว่าการติดเชื้อวัณโรคจะต้องเริ่มต้นจากปอดก่อนเสมอ แม้ว่าอาจไม่พบในปอดก็ตาม วัณโรคสามารถแบ่งได้ 2 ชนิดตามอวัยวะที่เกิดพยาธิสภาพ คือ วัณโรคปอด (Pulmonary Tuberculosis) ซึ่งปอดเป็นอวัยวะที่มีการติดเชื้อวัณโรคบ่อยที่สุดและวัณโรคนอกปอด (Extrapulmonary Tuberculosis) ซึ่งพบได้ในเกือบทุกอวัยวะ อาทิเช่น วัณโรคต่อมน้ำเหลืองบริเวณคอ วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง วัณโรคเยื่อหุ้มปอด วัณโรคกระดูกสันหลัง และวัณโรคเยื่อหุ้มหัวใจ เป็นต้น

2.2 เชื้อวัณโรค

2.2.1 ลักษณะของเชื้อ *M. tuberculosis*

เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค บางครั้งอาจจะเรียกชื่อนี้ว่า เชื้อเอเอฟบี (AFB/Acid Fast Bacilli) เชื้อ *M. tuberculosis* จัดอยู่ในวงศ์ Mycobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปท่อน โค้งเล็กน้อย ขนาดยาวประมาณ 2-4 ไมครอน กว้างประมาณ 0.2-0.5 ไมครอน (รูปที่ 2.1) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการอากาศ มักพบได้ในที่แห้งแล้งและที่มีน้ำมันมาก จากการศึกษารูปร่างของผนังเซลล์พบว่า ผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคนและมีลิพิดเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 60 ลิพิดที่พบในบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กรดมัยโคลิก (Mycolic acid) คอร์ดแฟกเตอร์ (Cord factor) และแวกซ์-ดี (Wax-D) โดยพบว่าองค์ประกอบทั้งสามนี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการดำรงชีวิตของเชื้อวัณโรค กรดมัยโคลิกจะทำหน้าที่เป็นสารเลือกผ่านที่ผนังเซลล์ เพื่อปกป้องเซลล์จากการทำลายของโปรตีนประจุบวก ไลโซไซม์และอนุมูลออกซิเจน (Oxygen radical) คอร์ดแฟกเตอร์จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสามารถยับยั้ง Polymorphonuclear Leucocyte migration แวกซ์-ดีจัดเป็นไกลโคลิพิดที่มีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแอนติเจนต่างๆ



รูปที่ 2.1 ขนาดและรูปร่างของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*
ที่มา : <http://www.flickr.com/photos/flickrsy/6936515861/>

M. tuberculosis เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนและมีอัตราการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่อัตราการเจริญของเชื้อนี้จะต่ำกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ *M. tuberculosis* ใช้เวลา 18 ชั่วโมงในการแบ่งตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้น จึงต้องใช้เวลาอย่างน้อย 10-14 วัน จึงจะเห็นเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะของโคโลนี คือ มีขนาดเล็ก แห้ง และเป็นเกล็ด ในอาหารเหลวสังเคราะห์ เชื้อจะเจริญเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าของอาหารเนื่องจากเชื้อมีผิวเซลล์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ การให้อากาศโดยการเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญเร็วขึ้นและทำให้ระยะพักตัว (Lag phase) สั้นลง พีเอชของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ พีเอช 7.0 อย่างไรก็ตาม สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอช 6.0-7.6 ได้เช่นกัน

2.2.2 การจำแนกชนิดของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย

เชื้อมัคโคแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

1. Typical mycobacteria หรือ “Tubercle bacilli” เป็นเชื้อมัคโคแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรคในคนและในสัตว์ เช่น *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* เป็นต้น
2. Atypical mycobacteria หรือ Non tuberculous mycobacteria เป็นเชื้อมัคโคแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค เช่น *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii*, *M. fortuitum* เป็นต้น แต่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง

นอกจากนี้ Runyon (1959) ได้จำแนกชนิดของมัคโคแบคทีเรียโดยอาศัยความเร็วในการเจริญเติบโต การสร้างรงควัตถุคาโรทีนอยด์ และลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ชนิด คือ

1. Runyon Group I Photochromogen สร้างเม็ดสีเมื่อถูกแสง และเจริญเติบโตช้า
2. Runyon Group II Scotochromogen สร้างเม็ดสีโดยไม่ขึ้นกับแสง เจริญเติบโตช้า
3. Runyon Group III Nonchromogen ไม่สามารถสร้างเม็ดสีได้
4. Runyon Group IV Rapid grower เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

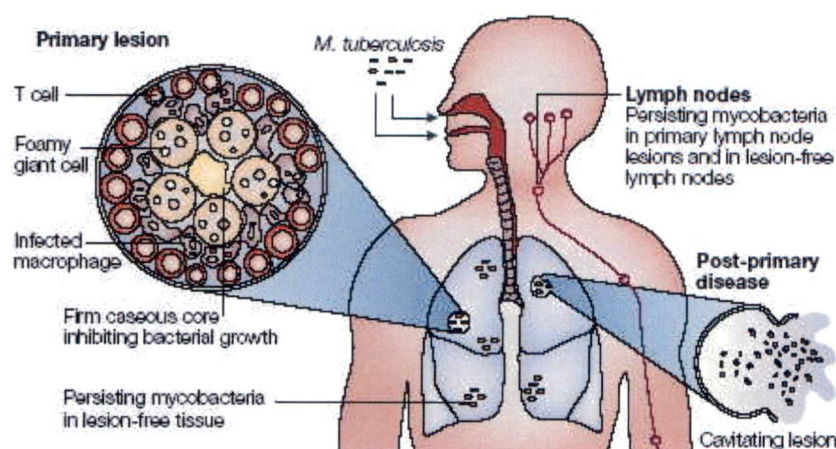
2.3 การติดต่อและการแพร่เชื้อ

การติดต่อและการแพร่เชื้อวัณโรคระหว่างมนุษย์ สามารถเกิดขึ้นได้โดยผ่านทางระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากมนุษย์จำเป็นต้องนำก๊าซออกซิเจนที่ได้จากการหายใจเข้าไปใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหาร เชื้อวัณโรคส่วนใหญ่ติดตามจากการไอหรือจามของผู้ป่วยวัณโรค เมื่อผู้ป่วยไอหรือจาม จะทำให้เชื้อที่อยู่ภายในทางเดินหายใจของผู้ป่วยกระจายออกสู่ภายนอก โดยจะมีลักษณะเป็นละอองเสมหะ การไอครั้งหนึ่งจะก่อให้เกิดละอองเสมหะในบรรยากาศถึง 3,000 เซลล์ของเชื้อวัณโรคต่ออนุภาคของละอองอากาศ 1 อนุภาค ซึ่งหากเทียบกับละอองเสมหะของคนพูด จะต้องใช้เวลาพูดนานถึง 5 นาทีจึงจะเกิดละอองเสมหะในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่ถ้าเป็นการจามจะเกิดละอองเสมหะมากกว่าการไอหลายเท่า ละอองเสมหะที่มีขนาดใหญ่จะตกลงสู่พื้นดิน เมื่อเสมหะแห้งแล้วอาจเกิดละอองของเชื้อขนาดเล็กและมีโอกาสฟุ้งกระจายจากพื้นได้อีกครั้ง ละอองเสมหะที่สำคัญที่สามารถลงสู่ถุงลมปอดได้คือ ละอองที่มีขนาดเล็กกว่า 4 ไมโครเมตร การติดต่อแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคทางการหายใจเอาละอองเชื้อเข้าไปนี้ นับเป็นทางติดต่อที่สำคัญที่สุด ส่วนการติดต่อทางอื่นๆ เช่น ทางผิวหนังจากแผลที่เกิดจากเชื้อวัณโรค การสัมผัสสิ่งของเครื่องใช้ของผู้ป่วย หรือ ทางอาหารนั้นเกิดขึ้นได้เช่นกัน แต่โอกาสมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการติดต่อในระบบทางเดินหายใจ ดังนั้น จึงเชื่อว่าเชื้อวัณโรคที่ติดอยู่ตามเสื้อผ้า เครื่องเรือน หนังสือ และพื้นดิน จึงไม่ใช่แหล่งที่มาของการติดต่อที่สำคัญ เชื้อโรคสามารถถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วยความร้อน แสงแดด และความแห้ง ถึงแม้ว่าเชื้อจะแห้ง เมื่อลงเชื้อก็จะไม่แขวนลอยในอากาศ แต่หากเชื้อปลิวไปกับลม ก็เป็นอนุภาคขนาดใหญ่ที่มักไม่ทำให้เกิดการติดต่อ ผู้ที่อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่แพร่เชื้อวัณโรคซึ่งมีโอกาสจะได้รับเชื้อวัณโรคเข้าไปบ่อยจะมีโอกาสติดต่อและเป็นโรคมมากกว่าผู้ที่ไม่ได้อยู่ใกล้ชิดกับผู้ป่วย

2.4 กลไกการก่อโรค

เมื่อเชื้อเข้าสู่ทางเดินหายใจ บริเวณที่พบเชื้อวัณโรคเข้าไปก่อพยาธิสภาพแห่งแรกมักเป็นบริเวณปอดข้างขวา ได้แก่ ส่วนล่างของปอดกลีบบน ส่วนบนของปอดกลีบล่าง ปอดกลีบกลาง เพราะมีอากาศไหลถ่ายเทมากกว่าบริเวณอื่นๆ อัลวีโอลาแมคโครฟาจ (Alveolar macrophages) ที่อยู่ในถุงลมปอดจะเข้ามาจับกินเชื้อที่เข้ามาถึงปอด หากมีปริมาณเชื้อไม่มาก ร่างกายก็สามารถกำจัดเชื้อเหล่านี้ได้ แต่ถ้ามีปริมาณเชื้อมาก จะมีลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) และโมโนไซต์ (Monocyte) เข้ามาเพิ่มยังบริเวณนี้และช่วยกำจัดเชื้อด้วยการทำให้มีปฏิกิริยาของการอักเสบเกิดขึ้นโดยเกิดเป็นลักษณะของทูเบอร์เคิล (Tubercle) หรือที่เรียกว่าแกรนูโลมาต์สลิซัน (Granulomatous lesion) ซึ่งจะเต็มไปด้วยเซลล์พวกโมโนนิวเคลียร์ (Mononuclear cell) ลิมโฟไซต์และแมคโครฟาจเรียงรายอยู่ล้อมรอบเซลล์ที่ตาย ต่อมา ภายในทูเบอร์

เซลล์จะกลายเป็นไขเหลวๆ ซึ่งเกิดจากการสะสมของเซลล์ที่ตายและมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมากเรียกว่า “Caseous necrosis” เมื่อทูเบอร์เคิลนีผู้กร่อนหรือแตกออก เชื้อที่อยู่ภายในก็จะกระจายออกมาตามหลอดเลือด ปนออกมากับเสมหะของผู้ป่วยได้ ทำให้ทูเบอร์เคิลมีลักษณะเป็นโพรงอากาศที่มีเชื้ออยู่จำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไป จะมีแคลเซียมมาจับ ทำให้เกิดเป็นรอยโรค (รูปที่ 2.2) การตรวจพบรอยโรคสามารถทำได้โดยดูจากภาพเอกซเรย์ปอด ซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะของการที่แคลเซียมไปจับบริเวณปอดที่ติดเชื้อครั้งแรกและที่ต่อมมน้ำเหลืองบริเวณซั้วปอด เชื้อที่สามารถทนอยู่ภายในเซลล์ของแมคโครฟาจได้จะรอดพ้นจากการถูกจับกินและเพิ่มปริมาณขึ้นได้ภายในแมคโครฟาจ จากนั้น เชื้อจะแพร่กระจายทางน้ำเหลืองไปยังต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอด ทำให้ต่อมน้ำเหลืองเหล่านี้มีขนาดโตขึ้น หรือ อาจแพร่กระจายโดยตรงจากปอดไปยังเยื่อหุ้มปอด นอกจากนี้ ยังแพร่กระจายทางกระแสโลหิตไปยังอวัยวะต่างๆ นอกปอด เช่น ไต กระดูก เยื่อหุ้มสมอง ตับ และม้าม เป็นต้น



รูปที่ 2.2 การก่อโรคของเชื้อวัณโรคในปอด

ที่มา : <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis.html>

สิ่งที่ทำให้เชื้อวัณโรคสามารถรอดพ้นจากการถูกจับกินได้นั้นก็คือ เมื่อเชื้ออยู่ภายในฟาโกโซม (Phagosome) เชื้อจะป้องกันการรวมตัวของไลโซโซมกับฟาโกโซม ส่งผลให้เชื้อไม่ถูกทำลายแต่ยังคงอยู่ในเซลล์ได้ นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถทำลายแมคโครฟาจได้โดยตรงอีกด้วย เชื้อวัณโรคสามารถคงอยู่ในเซลล์หรืออวัยวะต่างๆ เป็นเวลานานและมักเป็นสาเหตุของการติดเชื้อซ้ำภายหลัง โดยการติดเชื้อในภายหลังนี้เองที่ทำให้พบรอยโรคหรือทูเบอร์เคิลที่ยอดปอดหรือส่วนต่างๆ ของปอด ในการทดสอบทูเบอร์คูลิน จะให้ผลบวกภายหลังการติดเชื้อเป็นเวลา 3-8 สัปดาห์ เมื่อร่างกายติดเชื้อวัณโรค คนส่วนใหญ่จะสามารถทำลายเชื้อได้หมดเองและไม่แสดงอาการออกมาใดๆ แต่ให้ผลการทดสอบทูเบอร์คูลินเป็นบวก หากทำการทดสอบทูเบอร์คูลินให้ผลบวก จะมีเพียงประมาณร้อยละ 10 ของผู้ติดเชื้อเท่านั้นที่เป็นวัณโรคและแสดงอาการ

2.5 การวินิจฉัยโรค

การวินิจฉัยวัณโรคสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การตรวจสอบอาการที่น่าสงสัยว่าเป็นวัณโรคปอด ได้แก่ อาการไอเรื้อรัง โดยเฉพาะไอเกิน 3 สัปดาห์ หรือไอเป็นเลือด และอาการอื่นๆ เช่น อาการเหนื่อย อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เป็นต้น
2. การถ่ายภาพรังสีทรวงอก เพื่อตรวจสอบเงาเปราะเปื้อนบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งการตรวจนี้จะมี ความจำเพาะต่ำ เนื่องจากความผิดปกติที่เห็นอาจจะไม่ได้เกิดจากวัณโรคก็ได้
3. การตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อวัณโรค วิธีการนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจสอบ เชื้อวัณโรค ซึ่งจะทำให้การวินิจฉัยถูกต้องยิ่งขึ้น การตรวจสอบทำได้โดยการย้อมเสมหะด้วยวิธี Ziehl Neelsen แล้วการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือทำการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจากเสมหะของผู้ป่วย แล้วทดสอบความไวของเชื้อต่อยา
4. การตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อ
5. การทดสอบวัณโรคบนผิวหนัง หรือ Tuberculin skin test สามารถทำได้โดยการฉีดยาเข้าสู่ ภายใต้วงแขน แล้วทำการตรวจดูตุ่มที่เกิดขึ้น โดยผลการทดสอบจะแสดงเป็นค่าบวกหรือค่าลบ
6. การใช้เทคนิคทันสมัยอื่นๆ ในการตรวจสอบ เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR), Ligase chain reaction (LCR) เป็นต้น แต่วิธีเหล่านี้ยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคปอด ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและต้องอาศัยความชำนาญของเจ้าหน้าที่

2.6 ยารักษาวัณโรคและเชื้อวัณโรคคือยา

ยารักษาวัณโรคสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ยาหลัก (First-line drug) และยาสำรอง (Second-line drug) โดยยาหลัก คือ ยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาวัณโรคและมีผลข้างเคียงที่พองอมรับได้ ยาที่ใช้เป็นยาหลัก ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (Isoniazid, INH) ไรแฟมพิซิน (Rifampicin, RIF) ไพราซินามิด (Pyrazinamide, PZA) และอีแทมบูทอล (Ethambutol) ส่วนยาสำรอง คือ ยาที่จะนำมาใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยวัณโรคเกิดการดื้อยาหลักที่ใช้ในการรักษาแล้ว โดยยาสำรองที่นิยมใช้ในการรักษาวัณโรค เช่น ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) และยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) เป็นต้น

ยาไอโซไนอะซิด (INH) เป็นยาที่ออกฤทธิ์โดยทำหน้าที่ในการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันโคคลิกที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย จากงานวิจัยของ Zhang et al. (1992) พบว่า การออกฤทธิ์ของยาชนิดนี้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์คะตาเลสเพอรอกซิเดส (Catalase peroxidase) หรือ Kat G ในการทำให้ยาอยู่ในรูป Active form ซึ่ง Active form ของ INH จะจับด้วยพันธะโควาเลนต์กับ Acyl carrier protein (InhA) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมันโคคลิก และส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันโคคลิก การกลายพันธุ์ของยีน *katG* และบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *inhA* จึงมีผลทำให้เกิดการดื้อต่อยาไอโซไนอะซิด (Johnson et al., 2006)

ยาไรแฟมพิซิน (RIF) เป็นยาที่ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อ โดยจับกับ β -subunit ของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) โดยที่ RIF จะจับกับเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสของแบคทีเรียเท่านั้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสของเซลล์ยูคาริโอต (McClure and Cech, 1978) จากงานวิจัยของ Rattan et al. (1998) พบว่า การดื้อยาของกลุ่มนี้ของเชื้อวัณโรคจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ซึ่งเป็นยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็น β -subunit ของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส โดยทำให้ RIF ไม่สามารถเข้าไปจับกับเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรสได้

ยาไพราซิโนไมด์ (PZA) เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่ไม่ชัดเจน (Cynamon et al., 1992) ทราบเพียงยาชนิดนี้จะสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไพราซิโรอิก ซึ่งเป็น Active form ของยาชนิดนี้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไพราซิโนไมเดส (Pyrazinamidase) ที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *pncA* ดังนั้นการกลายพันธุ์ของยีนนี้จึงมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาไพราซิโนไมด์ (Portugal et al., 2004)

ยาอีแทมบูทอล (Ethambutol) เป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะราบิโนซิลทรานสเฟอเรส (Arabinosyl transferase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสร้างอะราบิโนกาแลคแทน (Arabinogalactan) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย การขัดขวางการสร้างอะราบิโนกาแลคแทนจะทำให้ไม่เกิดการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย และทำให้ยาหลายชนิดเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น (Takayama and Kilburn, 1989) การกลายพันธุ์ของยีนในโอเปอรอน *embCAB* ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อะราบิโนซิลทรานสเฟอเรสจะทำให้เกิดการดื้อยาอีแทมบูทอลนี้ (Ramaswamy et al., 2000)

ยาสำรองที่นิยมใช้ในการรักษาวัณโรค ได้แก่ ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน และ ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เป็นต้น ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยยาจะจับกับบริเวณ 16S rRNA บนไรโบโซม ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในกระบวนการแปลรหัส (Alangaden et al., 1998) ดังนั้น หากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่เป็นเป้าหมายของยา จึงส่งผลให้เกิดการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

จากการศึกษาการดื้อยาของเชื้อวัณโรคดังที่กล่าวมาในขั้นต้น จึงทำให้องค์การอนามัยโลก (WHO) จัดจำแนกเชื้อวัณโรคดื้อยาเป็น 2 ประเภท (WHO, 2010) ดังนี้

1. เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis หรือ MDR-TB) หมายถึง เชื้อวัณโรคดื้อยามากกว่าหนึ่งขนาน แต่อย่างน้อยที่สุดต้องดื้อยาไอโซไนอะซิดและไรแฟมพิซิน
2. เชื้อวัณโรคดื้อยาทุกขนาน (Extensively drug-resistant tuberculosis หรือ XDR-TB) หมายถึง เชื้อ MDR-TB ที่ดื้อต่อยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนตัวใดตัวหนึ่ง และยาชนิดอย่างน้อยอีก 1 ชนิด คือ กานามัยซิน อะมิคาซิน หรือ คาปริโอมัยซิน

2.7 การป้องกันวัณโรค

การป้องกันการติดเชื้อวัณโรค (ที่มา: สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข) สามารถทำได้ดังนี้

1. หลีกเลี่ยงการสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่กำลังมีอาการไอ และยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค
2. ในผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ โดยเฉพาะในเด็กอายุต่ำกว่า 4 ปี ที่ตรวจได้ผลทูเบอร์คิวลินเป็นบวก แพทย์จะพิจารณาให้ยาป้องกันไอโซไนอะซิด เป็นเวลา 2-3 เดือน
3. การให้วัคซีน BCG เพื่อป้องกันวัณโรค โดยองค์การอนามัยโลกจะแนะนำให้ฉีดวัคซีนในเด็กแรกเกิด ซึ่งวัคซีนนี้จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันวัณโรคชนิดรุนแรงแบบแพร่กระจาย และวัณโรคเยื่อหุ้มสมองได้

2.8 ปัญหาของวัณโรคในปัจจุบัน

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า ประชากรมีอัตราการตายเนื่องจากวัณโรคสูง โดยวัณโรคเป็นสาเหตุหนึ่งในสิบอันดับแรกของการตายของประชากรและเป็นสาเหตุของการตายที่สูงที่สุดในบรรดาโรคติดเชื้อทั้งหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานว่ วัณโรคที่เคยได้รับการควบคุมอัตราการป่วยและอัตราการตายลดลงเป็นลำดับนั้นกลับมีการแพร่ระบาดมากขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนาทั่วโลก รวมถึงในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย ทั้งนี้เชื่อว่ามีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องคือ การระบาดของยารุ่นแรงของเชื้อไวรัสเอดส์ การระบาดของเชื้อก่อวัณโรคชนิดดื้อยาหลายขนาน รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ อาทิเช่น ภาวะทางเศรษฐกิจสังคมที่ย่ำแย่ในชุมชนบางแห่ง และการควบคุมวัณโรคที่ไม่เข้มงวดเท่าที่ควรในบางประเทศ องค์การอนามัยโลกจึงต้องประกาศเตือนว่า ขณะนี้การระบาดของวัณโรคเป็นภาวะฉุกเฉินระดับโลกและร้ายแรงมากที่สุดในประวัติศาสตร์ หากไม่มีการจัดการให้สถานการณ์ดีขึ้นกว่าในปัจจุบันนี้ วัณโรคจะทำลายชีวิตมนุษย์เพิ่มมากขึ้น และอาจจะมีผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตถึง 30 ล้านคนต่อปี รวมถึงผู้ป่วยหลายรายอาจเป็นวัณโรคที่รักษาไม่ได้เนื่องจากภาวะดื้อยาหลายขนานที่เพิ่มมากขึ้นอีกด้วย

ในประเทศไทย โดยเฉพาะกรุงเทพมหานครที่มีประชากรหนาแน่น รวมทั้งมีการอพยพของประชากรจากชนบท และมีชาวต่างชาติเข้ามาพำนักเป็นจำนวนมากนั้น พบว่ามีการระบาดของวัณโรค และเชื้อไวรัสเอดส์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีประชากรหนาแน่น อยู่อย่างแออัด สถานะทางเศรษฐกิจต่ำและสุขภาพของประชาชนส่วนใหญ่ไม่ได้รับการดูแลอย่างทั่วถึง นอกจากนี้ ในต่างประเทศ อาทิเช่น ในเมืองนิวยอร์ก ก็มีอัตราการป่วยด้วยวัณโรคเพิ่มขึ้น 4 เท่าของอัตราการป่วยโดยเฉลี่ยของประเทศ หรือ ในเมืองโตรอนโต ก็มีอัตราการป่วยด้วยวัณโรคเพิ่มขึ้น 3 เท่าของอัตราป่วยโดยเฉลี่ยของประเทศเช่นกัน นอกจากนี้อัตราการป่วยด้วยวัณโรคที่มีรายงานว่เพิ่มมากขึ้นในเมืองใหญ่ๆ หลายแห่งทั่วโลกแล้ว ยังพบว่ามีภาวะการติดเชื้อดื้อยาหลายขนานเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน

ปัจจุบัน นักวิจัยพยายามปรับปรุงวิธีการรักษาวัณโรค โดยการสร้างยาต้านวัณโรคใหม่ๆ ที่จะไม่ก่อให้เกิดการดื้อยาขึ้นมาอีก มีงานวิจัยที่คิดค้นวิธีการรักษาโรคโดยมุ่งเน้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการก่อโรคของเชื้อในระดับโมเลกุลแล้วหาวิธีการยับยั้งการก่อโรค ซึ่งคาดว่าจะเป็นการแก้ปัญหาที่ต้นเหตุโดยจะไม่ทำให้เกิดการดื้อของเชื้อก่อวัณโรคดื้อยาขึ้นมาอีก

2.9 กลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรค

หลังจากการค้นพบเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) การใช้ยาสำรองจึงกลายเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วย แต่ในปัจจุบันกลับพบว่ามีการดื้อของเชื้อวัณโรคดื้อยาทุกขนาน (XDR-TB) ที่ดื้อต่อทั้งยาหลักและยาสำรองบางชนิด นักวิจัยทั่วโลกจึงได้เร่งทำการวิจัยศึกษาวิธีการยับยั้งวัณโรคดื้อยาอย่างเร่งด่วน โดยก่อนอื่นจะต้องเข้าใจกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาเสียก่อน กลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) ของเชื้อวัณโรคที่ทราบกันดีในปัจจุบัน มีทั้งหมด 3 กลไก ดังนี้

1. กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของเป้าหมายยา (Alteration of drug target structure)

ยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะสามารถออกฤทธิ์ได้โดยการเข้าไปจับกับบริเวณ 16S rRNA ของไรโบโซมของเชื้อวัณโรคเพื่อทำการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน การกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA หรือ *rrs* จึงมีผลทำให้เชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยาในกลุ่มนี้ (Alangaden et al., 1998)

2. กลไกการสร้างเอนไซม์ที่สามารถทำลายฤทธิ์ของยา (Aminoglycoside modifying enzyme)

เอนไซม์ที่พบว่าสามารถทำลายฤทธิ์ของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคได้คือ เอนไซม์อะมิโนไกลโคไซด์อะเซทิลทรานสเฟอเรส (Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase) หรือ AAC เอนไซม์ชนิดนี้จะทำการย่อยสลายหมู่อะมิโนตำแหน่งที่ 2 ของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยอาศัยกระบวนการอะเซทิลเลชัน (Acetylation) ทำให้ยาในกลุ่มนี้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Vetting et al., 2005)

3. กลไกการป้องกันยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์เข้าสู่เซลล์หรือกลไกการขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump)

กลไกนี้จะเป็นการอาศัยการทำงานของโปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาปฏิชีวนะหรือสารพิษต่างๆ จึงทำให้ยาปฏิชีวนะหรือสารพิษต่างๆ มีการสะสมภายในเซลล์ลดลง และมีผลทำให้เชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยา (Louw et al., 2009)

2.10 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

จนกระทั่งถึงปัจจุบันนี้ พบว่าการกลายพันธุ์ของยีนบางยีนมีผลทำให้เชื้อวัณโรคสามารถดื้อยาได้ โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่จะทำการศึกษาในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 5 ยีน ดังนี้

1. ยีน 16S rRNA หรือ *rrs*

การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA หรือ *rrs* จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* เกิดการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยส่วนใหญ่การกลายพันธุ์จะพบที่ตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1401 มากที่สุด ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงจากเบสอะดีนีน (Adenine) ไปเป็นเบสกวานีน (Guanine) การกลายพันธุ์นี้จะส่งผลให้ยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ไม่สามารถเข้าจับกับบริเวณเป้าหมายของยาได้ จึงทำให้เชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยาในกลุ่มนี้ มีรายงานพบว่าเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1401 (A→G) จะมีความสามารถในการดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินในระดับที่สูง โดยมีค่า MIC (Minimum inhibition concentration) มากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Suzuki et al., 1998)

2. ยีน *eis* (Rv2416c)

ยีน *eis* (Rv2416c) ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อะมิโนไกลโคไซด์อะเซทิลทรานสเฟอเรสในเชื้อ *M. tuberculosis* จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า การกลายพันธุ์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* จะมีผลทำให้ระดับการถอดรหัสของยีน *eis* เพิ่มสูงขึ้น และส่งผลทำให้เชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยากานามัยซินในระดับที่ต่ำ โดยมีค่า MIC น้อยกว่า 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Zaunbrecher et al., 2009)

3. ยีน *gidB* (Rv3919c)

ยีน *gidB* (Rv3919c) ทำหน้าที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ 7-Methylguanosine (m^7G) methyltransferase ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเมทิลเลชันที่ตำแหน่ง G527 ในบริเวณ loop-530 ของ 16S rRNA การกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในเชื้อ *M. tuberculosis* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาสเตรปโตมัยซินซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA หรือ *rrs* โดยมีผลทำให้เกิดการดื้อยานิดนี้ในระดับต่ำ ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 2 - 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Spies et al., 2011)

4. ยีน *tap* (Rv1258c)

จากการศึกษาการนำยีน *tap* จากเชื้อ *Mycobacterium fortuitum* ไปแสดงออกในเชื้อ *Mycobacterium smegmatis* พบว่า ยีน *tap* นี้สามารถแสดงออกโดยถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาอะมิโนไกลโคไซด์และเตตราไซคลินให้ออกนอกเซลล์ได้ (Drug efflux pump) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Tap ของเชื้อ *M. fortuitum* กับลำดับกรดอะมิโนของจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน Rv1258c ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีความคล้ายคลึง (Homolog) กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Tap ของเชื้อ *M. fortuitum* (Ainsa et al., 1998)

5. ยีน *whiB7*

ยีน *whiB7* หรือ Rv3197A สามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่กระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (Transcriptional activator) ในเชื้อวัณโรค โดยยีนนี้จะเกิดการแสดงออกได้โดยการชักนำจากยาปฏิชีวนะอีริโทรมัยซิน (Erythromycin) เตตราไซคลิน (Tetracycline) และสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) นอกจากนี้ พบว่ามียีนบางยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในเชื้อวัณโรคที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *whiB7* เช่น ยีน *eis* (Rv2416c) และยีน *tap* (Rv1258c) เป็นต้น (Morris et al., 2005) จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *whiB7* ในเชื้อวัณโรคดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ด้วยวิธี qRT-PCR พบว่าการกลายพันธุ์ในบริเวณ 5' untranslated ของยีน *whiB7* จะมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของ *whiB7* เพิ่มมากขึ้นถึง 23–145 เท่าและจะมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *eis* และ *tap* เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน (Reeves et al., 2013)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ที่แยกได้จากผู้ป่วยและมีความสามารถในการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ได้รับความอนุเคราะห์จากทุนวิจัยวัณโรคดื้อยา ศิริราช มูลนิธิในพระอุปถัมภ์ของสมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนากรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
- 3.1.2 เชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv
- 3.1.3 เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α (F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ) (Invitrogen, USA)

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.2.1.1 อาหารสูตร Löwenstein Jensen (LJ) (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารเหลวสูตร Middlebrook 7H9 broth และอาหารแข็งสูตร Middlebrook 7H10 agar (ภาคผนวก ก)
- 3.2.1.2 อาหารสูตร LB (ภาคผนวก ก)

3.2.2 ยาปฏิชีวนะ

- 3.2.2.1 กานามัยซิน (Kanamycin) (Sigma Aldrich, Germany)
- 3.2.2.2 อะมิกาซิน (Amikacin) (Sigma Aldrich, Germany)
- 3.2.2.3 ไฮโกรามัยซิน (Hygromycin) (PAA Laboratories, Austria)

3.2.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

แลมบ์ดาฟาจ (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ HindIII (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Invitrogen, USA)

3.2.4 พลาสมิดดีเอ็นเอ

3.2.4.1 พลาสมิด pOLYG (Gaora et al., 1997) (ภาคผนวก ข)

3.2.4.2 พลาสมิด pSMT1 (Snewin, 1999) (ภาคผนวก ข)

3.2.5 เอนไซม์และเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3.2.5.1 เอนไซม์ RNaseA (Promega, USA)

3.2.5.2 เอนไซม์ Proteinase K (USB, USA)

3.2.5.3 เอนไซม์ Calf Intestinal alkaline phosphatase (Promega, USA)

3.2.5.4 เอนไซม์ T4 ligase (Fermentas, USA)

3.2.5.5 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3.2.5.6 เอนไซม์ Lysozyme (Amresco, USA)

3.2.5.7 เอนไซม์ *Sau3AI* (Promega, USA)

3.2.5.8 เอนไซม์ *BamHI* (Biolabs, England)

3.2.6 ชุดทดสอบ (Kit)

3.2.6.1 ชุดทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit) (Geneaid, Taiwan)

3.2.6.2 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (High-speed Plasmid Mini Kit) (Geneaid, Taiwan)

3.2.7 เคมีภัณฑ์

3.2.7.1 อะกาโรส (Agarose) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)

3.2.7.2 เจลสตาร์ (GelStar[®] Nucleic acid gel stain) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)

3.2.7.3 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye) 0.25% (v/v) Bromophenol blue, 30% (v/v) Glycerol)

3.2.7.4 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris 0.1 โมลาร์, EDTA 0.01 โมลาร์ pH 8.0 และ pH 7.5)

3.2.7.5 บัฟเฟอร์ Tris-Borate-EDTA (Tris 89 มิลลิโมลาร์, Boric acid 89 มิลลิโมลาร์ EDTA 2 โมลาร์ pH 8.3)

3.2.7.6 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

3.2.7.7 โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate)

3.2.7.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

3.2.7.9 เอ็น-อะเซทิล-แอล-ซิสเทอีน (N-Acetyl-L-Cysteine)

3.2.7.10 บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2

- 3.2.7.11 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด (70% Ethanol)
- 3.2.7.12 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ที่เย็นจัด (99% Ethanol)
- 3.2.7.13 กลีเซอรอล (Glycerol) เข้มข้นร้อยละ 86
- 3.2.7.14 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
- 3.2.7.15 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 5 โมลาร์
- 3.2.7.16 ทวิน 80 (Tween 80) (Fluka, Switzerland)
- 3.2.7.17 CTAB; N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide (Sigma Aldrich, USA)
- 3.2.7.18 สารละลาย Tris-EDTA-Tween-Lysozyme; TETL (Tris 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์, Tween 80 0.5 เปอร์เซ็นต์, ไลโซไซม์ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
- 3.2.7.19 สารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) อัตราส่วน 24 ต่อ 1

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น Autoclave-325 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortechnik รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี
- 3.3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Labnet รุ่น Spectrafuge ประเทศเยอรมนี
- 3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย
- 3.3.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น
- 3.3.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipments) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน
- 3.3.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Gel documentation analysis) บริษัท Syngene รุ่น Bts-20.M ประเทศเยอรมนี
- 3.3.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน
- 3.3.11 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215

ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.12 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) (D1100 AccuBlock™, Labnet, USA)

3.3.13 เครื่องแก้ว (Glasswares)

3.3.14 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค

3.4.1.1 การคัดแยกเชื้อวัณโรคจากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรค

นำเสมหะที่ได้จากผู้ป่วยมาย่อยด้วยสารละลายเอ็น-อะเซทิล-แอล-ซิสเทอีน (N-Acetyl-L-Cysteine) 0.5 เปอร์เซ็นต์ในโซเดียมซิติเรท 1.45 เปอร์เซ็นต์ ที่มีโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.25 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณที่เท่ากันในหลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร โดยปริมาณทั้งหมดไม่ควรเกิน 20 มิลลิลิตร ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ปริมาณทั้งหมดเป็น 35 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปั่นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร สุดท้าย ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายแขวนลอยของเซลล์ที่ได้ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรไปเพาะเชื้อวัณโรคบนอาหารไข่ Löwenstein Jensen (LJ) (ภาคผนวก ก) บ่มหลอดเพาะเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 สัปดาห์หรือจนกว่าจะเห็นโคโลนีเชื้อ ทำการจำแนกชนิดเชื้อวัณโรคด้วยวิธี One-tube multiplex PCR โดยขั้นตอนการทำทั้งหมดยกเว้นการปั่นและการบ่มเชื้อต้องทำใน Biosafety cabinet Class II

3.4.1.2 การจำแนกชนิดเชื้อวัณโรคด้วยวิธี One-tube multiplex PCR

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเชื้อที่เพาะขึ้นจากเสมหะด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยมีองค์ประกอบในการเกิดปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ดังนี้ (1) ไพรเมอร์ 2 คู่ประกอบด้วยไพรเมอร์ TPOL (5'-CCGGCGCTTGCGGGCGGACCCACCGCC-3') ปริมาณ 25 พิโคโมล ไพรเมอร์ TPOR (5'-CAGGCTGCCCTGCCCCACGCCCGGTAG-3') ปริมาณ 25 พิโคโมล ไพรเมอร์ PT1 (5'-CAACGCGCCGTCGGTGG-3') ปริมาณ 10 พิโคโมล ไพรเมอร์ PT2 (5'-CCCCCAGGCACCGC-3') ปริมาณ 10 พิโคโมล (2) บัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH8.4) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (3) MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (4) dNTP ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ (5) Taq DNA polymerase ปริมาณ 1 ยูนิต (6) ดีเอ็นเอของเชื้อปริมาณ 5-10 นาโนกรัม ขั้นตอนของการทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจด้วย PCR มีดังนี้ Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที PCR ครั้งแรกจำนวน 20 รอบ มีสภาวะดังนี้ Denaturation ที่ 94 องศา

เซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ Primer extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที PCR ครั้งที่สองจำนวน 35 รอบ ดังนี้ Denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ Primer extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR จำเพาะขนาด 768 (จาก TPOL/TPOR) และ 396 (จาก PT1/PT2) คู่เบส ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2.5 เปอร์เซ็นต์

3.4.1.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคคอตีบจากน้ามัยซิน

นำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มี OADC 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) และยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบในงานวิจัยนี้ จะทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มี OADC 10 เปอร์เซ็นต์ งานอาหารแข็งทั้งหมดจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ โดยเชื้อ *M. tuberculosis* คอตีบจากน้ามัยซินที่ทำการเพาะเลี้ยงได้ในงานวิจัยนี้ จะนำไปทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

3.4.2 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค โดยการทำให้ Overexpression ของยีนส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากเชื้อวัณโรคคอตีบจากน้ามัยซิน

3.4.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคและคอตีบจากน้ามัยซิน มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้น นำเซลล์มากระจายในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีบัฟเฟอร์ TE (Tris 0.1 โมลาร์ EDTA 0.01 โมลาร์ (pH 8.0)) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเซลล์มากระจายในสารละลาย Tris-EDTA-Tween-Lysozyme (TETL) (Tris 10 มิลลิโมลาร์ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ Tween 80 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไนโซไซม์ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น ย้ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีเอนไซม์โปรตีนเนส เค (Proteinase K) ปริมาณ 0.44 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สารละลาย CTAB ร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้น ใช้ปิเปตกระจายเซลล์อย่างเบาเมื่อจนเกิดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน แล้วนำหลอดไปบ่มที่

อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เติมนสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่และเติมนสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตรอีกครั้ง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสด้านบน เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่อีกครั้ง จากนั้น ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมนสารละลายโซเดียมอะซีเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ และเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เย็นจัด ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทั้งส่วนใสและทิ้งไว้จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง หลังจากนั้น จึงละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris 0.1 โมลาร์ EDTA 0.01 โมลาร์ (pH 7.5)) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้น เติมนเอนไซม์ RNaseA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออก แล้วทำการวิเคราะห์หัจโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.4.2.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยชุด High-speed Plasmid Mini kit

นำโคลนของเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG หรือ pSMT1 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิิตรที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใส หลังจากนั้น เติบบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วกระจายเซลล์โดยการปิเปตขึ้นลง เติบบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น ทำการเติบบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ใส่ลงใน PD column ที่วางลงใน Collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทั้งส่วนใส แล้วเติบบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน PD column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทั้งสารละลาย เติบบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทั้งสารละลาย หลังจากนั้น ปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการย้าย PD column แห่งไปวางลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติบบัฟเฟอร์

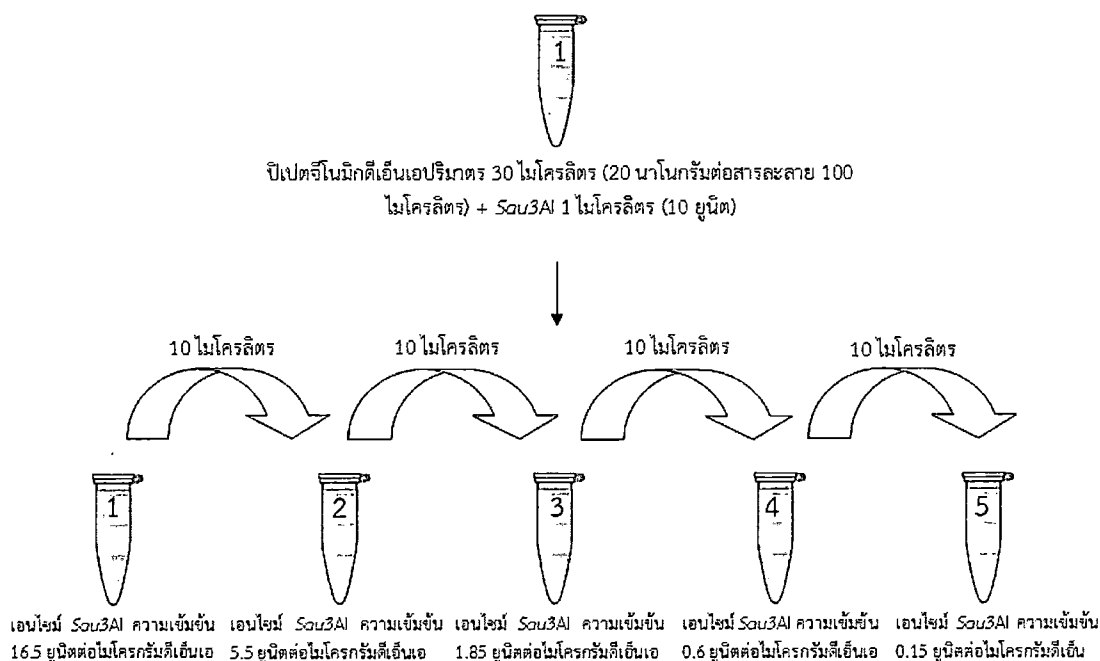
สำหรับชะ (Elution buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้น ทำการวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.4.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจลเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม กระจายในบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อนแล้วรอให้อุ่น จากนั้น จึงเติมสารละลายเจลสตาร์ (Gelstar) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทใส่แม่พิมพ์ที่ประกอบด้วยถาดรองและหวี โดยต้องหลีกเลี่ยงการโดนแสง เมื่อเจลแข็งตัวจึงดึงหวีออกแล้วย้ายแผ่นเจลพร้อมถาดรองลงอ่าง (Gel chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ TBE จากนั้น ทำการหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (ผสมสีย้อมแล้ว) ลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้น นำเจลที่ได้ไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต วิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจลด้วย Gel documentation analysis

3.4.2.4 การทำ Partial digestion

นำจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการสกัดได้จากวิธีการในขั้นตอนที่ 3.4.2.1 มาทำการย่อยแบบ Partial digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* โดยการนำจีโนมดีเอ็นเอผสมกับบัฟเฟอร์ 1 เท่า ให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตรและมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้น ทำการแบ่งสารละลายดีเอ็นเอนี้ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ 5 หลอด โดยปิเปตสารปริมาตร 30, 20, 20, 20 และ 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1-5 ตามลำดับ ปิเปตเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยจีโนมดีเอ็นเอให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ โดยปิเปตสารผสมจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 2 ปิเปตสารผสมจากหลอดที่ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 3 ปิเปตสารผสมจากหลอดที่ 3 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 4 และปิเปตสารผสมจากหลอดที่ 4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ 5 จะได้ความเข้มข้นของสุดท้ายเอนไซม์ในหลอดที่ 1 ถึง 5 เท่ากับ 16.5, 5.5, 1.85, 0.6, 0.15 ยูนิตต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ (รูปที่ 3.1) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ทั้ง 5 หลอด ไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาการย่อยโดยการเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 5 โมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทั้งห้า จากนั้น จึงนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ Partial digestion ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ และนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (Geneaid, Taiwan)



รูปที่ 3.1 วิธีการเจือจางความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ในการตัดแบบ Partial digestion

3.4.2.5 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

ตัดแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในอะกาโรสเจลที่ต้องการ ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าเจลจะละลายหมด ทำการกลับหลอดทุก 2 นาที หลังจากที่เจลละลายหมดแล้ว ย้ายสารละลายเจลไปใส่ใน DF Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น เดิมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งสารละลายที่กั้นหลอด ทำการเดิมบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนใส่ที่กั้นหลอด และทำการปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ย้ายคอลัมน์ไปวางในหลอดเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เดิมบัฟเฟอร์สำหรับชะ (Elution buffer) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง เพื่อให้เกิดการชะล้างดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์

3.4.2.6 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่สกัดได้จากวิธีการในหัวข้อ 3.4.2.2 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* โดยใช้องค์ประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้น นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว มาศึกษาผลการตัดด้วยการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอะกาโรส

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (0.8 เปอร์เซ็นต์) เมื่อพบว่าเกิดการย่อยที่สมบูรณ์ จึงนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (Geneaid, Taiwan) พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI (หัวข้อ 3.4.2.5) จะสามารถนำไปเชื่อมกับชิ้นส่วนจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดแบบ Partial digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI (หัวข้อ 3.4.2.4)

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ส่วนประกอบที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG (120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	80	-
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	-	80
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	12	12
บัฟเฟอร์ NEB 10 เท่า	12	12
สารละลาย BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	12	12
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	4	4
ปริมาตรสุทธิ	120	120

3.4.2.7 การทำปฏิกิริยา Dephosphorylation

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มาทำปฏิกิริยา Dephosphorylation เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของสายดีเอ็นเอออก ทำให้การเชื่อมต่อ (Ligation) ของพลาสมิดดีเอ็นเอกับจีโนมิกดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI ทำได้ง่ายขึ้น องค์ประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.2 นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น ปิดเอนไซม์ CIAP เพิ่มลงไปอีก 4 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมบัฟเฟอร์สำหรับหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ CIAP (CIAP stop buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit และวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์

3.4.2.8 การทำปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (Ligation)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอและพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ทำการเตรียมไว้จากหัวข้อ 3.4.2.4 และ 3.4.2.6 มาทำปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ โดยใช้องค์ประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่

3.3 บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้น หยุดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อโดยนำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำการย้ายเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α ต่อไป

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการทำให้ Dephosphorylation ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ส่วนประกอบที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	
	พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG/ <i>Bam</i> HI (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	18
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1/ <i>Bam</i> HI (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	-	18
เอนไซม์ Calf intestinal alkaline phosphatase หรือ CIAP (0.01 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	4	4
บัฟเฟอร์ CIAP 10 เท่า	4	4
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	14	14
ปริมาตรสุทธิ	40	40

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Ligation

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)			
	Ligation reaction	Negative	Ligation reaction	Negative
พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG/ <i>Bam</i> HI (Purified) (67.44 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2	2	-	-
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1/ <i>Bam</i> HI (Purified) (22.48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	-	-	4	4
จีโนมิกดีเอ็นเอ/ <i>Sau</i> 3AI (Purified) (11.63 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4	-	4	-
บัฟเฟอร์ Ligation 10 เท่า	1.5	1.5	1.5	1.5
เอนไซม์ T4 ligase (0.15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.5	1.5	1.5	1.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6	10	4	8
ปริมาตรสุทธิ	15	15	15	15

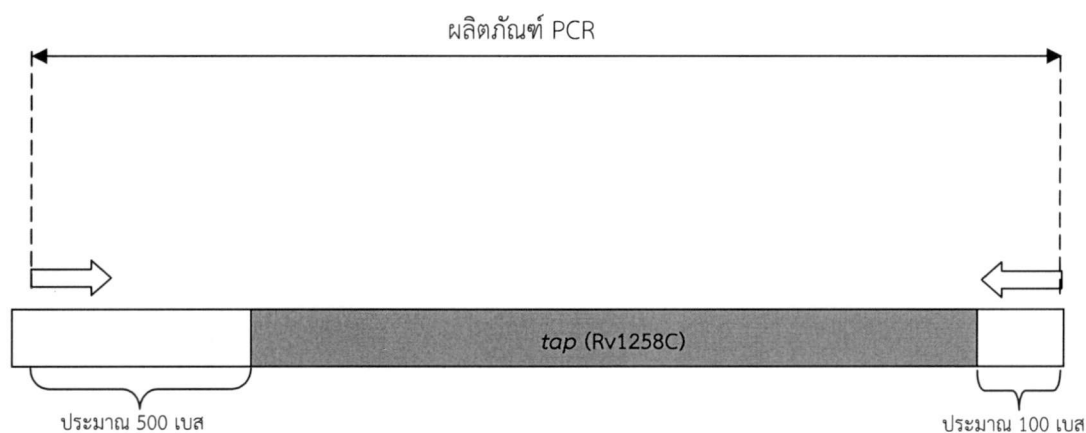
3.4.2.9 การทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E.coli* DH5 α

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Ligation (หัวข้อ 3.4.2.7) มาทำการ Transformation เข้าสู่เซลล์ Competent ของ *E. coli* และใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 เป็น Positive transformation และใช้น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็น Negative transformation นอกจากนี้ ยังมีพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และทำให้บริสุทธิ์แล้ว ที่จะถูกนำมาใช้เป็น Negative ligation (หัวข้อ 3.4.2.7) การทรานสฟอร์มทำโดยการปิเปตเซลล์ Competent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่วางบนน้ำแข็ง ปิเปตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา Ligation (Ligation reaction), Positive transformation, Negative transformation และ Negative ligation ลงในหลอดที่มีเซลล์ Competent ที่เย็น ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำหลอดทุกหลอดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้น เติมหอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยพลิกหลอดกลับไปมาทุก 10 นาที หลังจากนั้น นำสารละลายเซลล์ทั้งหมดมาทำการ spread plate บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและยากานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลาข้ามคืน แล้วจึงทำการคัดเลือกโคลนที่ได้ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.3 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคโดยการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่สนใจ (Gene mutation) ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

3.4.3.1 การออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการศึกษาจากธนาคารยีน (GeneBank) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ของยีน 16S rRNA (*rrs*) ยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *gidB* และ *tap* ทำการออกแบบให้ไพรเมอร์ด้าน Forward อยู่ห่างจากบริเวณจุดเริ่มต้นการแปลรหัสของยีนประมาณ 500 เบส และออกแบบไพรเมอร์ด้าน Reverse ให้อยู่ห่างจากบริเวณจุดสิ้นสุดการแปลรหัสของยีนประมาณ 100 เบส (รูปที่ 3.2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 3.4



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *tap* (Rv1258c)

3.4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เอส (Polymerase chain reaction; PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจศึกษา ได้แก่ ยีน 16S rRNA (*rrs*) ยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เอส (PCR) โดยองค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เอสจะแสดงตารางที่ 3.5 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะแสดงในตารางที่ 3.6 โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนการจับของไพรเมอร์ (Annealing step) จะเปลี่ยนแปลงตามค่า Melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ของแต่ละคู่ที่ใช้ในปฏิกิริยา (ตารางที่ 3.4) รวมทั้งเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอ (Extension step) จะขึ้นอยู่กับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการ โดยจะใช้เวลา 1 นาทีสำหรับผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 1,000 คู่เบส จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

ตารางที่ 3.4 โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ของเชื้อ *M.tuberculosis* สายพันธุ์ที่ติดต่อยากานามัยซิน

ยีนที่ทำการศึกษา	โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรเมอร์ (5'-3')	Tm (°C)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
16S rRNA (<i>rrs</i>)	F-tb16s R-261	5'-GAAAGCGTGGGGAGCGAACA-3' 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	56	779
<i>eis</i> (Rv2416c)	F-Rv2417c R-eis-Rv2415c	5'-GCGGTGCATCACGTCGCCGA-3' 5'-GCAACGCGATCCGCGAGTGC-3'	60	1,660
<i>gidB</i> (Rv3919c)	F-gidB R-gidB	5'-CTGAACAAGTTGGTCGGGCG-3' 5'-CGTCGGTGTCGGTGGTGTCA-3'	60	1,237
<i>tap</i> (Rv1258c)	F-Rv1259 R-Rv1257c	5'-CAGGCCGGCCCTATGCAGTG-3' 5'-CGGTCTTGCCGGTAGCCGTC-3'	58	1,847
<i>whiB7</i> (Rv3197A)	F URT-whiB7 R whiB7	5'-GCTGGTTCGCGGTCGGACCT-3' 5'-CGGGGTATCGGCGAACCACA-3'	59	550

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ Gotaq PCR 10 เท่า	10
แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์)	3
ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (10 มิลลิโมลาร์)	1
ไพรเมอร์ Forward (5 ไมโครโมลาร์)	2.5
ไพรเมอร์ Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	2.5
เอนไซม์ Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.5
จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	1
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	29.5
ปริมาตรสุทธิ	50

ตารางที่ 3.6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นที่	ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	Initial denaturation	94	5 นาที
2 (35 รอบ)	Denaturation	94	30 วินาที
	Annealing	56-60	60 วินาที
	Extension	72	90-120 วินาที
3	Final extension	72	7 นาที

3.4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (Geneaid, Taiwan) หลังจากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจจากปฏิกิริยา BigDye Terminator Reactions ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA

Analyzer โดยส่งวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv (Accession no. NC_000962) ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีนด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1994) เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของแต่ละยีน

3.4.4 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซิน กานามัยซิน และคาปริโอมัยซิน

ทำการทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซินต่อเชื้อวัณโรคคือยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่แยกจากผู้ป่วยในประเทศไทย โดยวิธี Agar dilution test (Wood et al., 2003) นำโคลนนี้ของเชื้อที่ต้องการทดสอบมาทำ Stock solution โดยการเจือจางในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ที่เติม OADC ความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น วัดความขุ่นของสารละลายของเชื้อให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐานของ McFarland หมายเลข 1 หรือ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายของเชื้อที่มีความขุ่นตรงกับที่ต้องการ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มียาปฏิชีวนะปฏิชีวนะอะมิกาซินหรือกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Spread plate ให้ทั่ว นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จากนั้น วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะอะมิกาซิน และกานามัยซิน ที่สามารถทำการยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรคคือยาได้ (Minimum Inhibition Concentration; MIC) โดยเปรียบเทียบกับค่า MIC ต่อยาทั้ง 3 ชนิดของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยเทียบกับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv

งานศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล Certificate of Approval no. Si 208/2005

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อวัณโรคคือยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จากเสมหะของผู้ป่วยวัณโรค

จากการนำเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากทุนวิจัยวัณโรคคือยา ศิริราชมูลนิธิ ในพระอุปถัมภ์ของสมเด็จพระเจ้าพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนากรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มาทำการทดสอบเชื้อวัณโรคที่มีคุณสมบัติต้านยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยนำโคลนของเชื้อทุกสายพันธุ์ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มี OADC ความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์และมียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่ามีเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยที่เจริญบนอาหาร Middlebrook 7H10 ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินทั้งหมด 29 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 13287, 13617, 14260, 15966, 16179, 16825, 17012, 17016, 17092, 17164, 17592, 17653, 17688, 17845, 17962, 17984, 18182, 18515, 18810, 19109, 19111, 19381, 20120, 21127, 21388, 21848, 22104, 24433 และ 27058 ซึ่งเชื้อทั้ง 29 สายพันธุ์ที่ได้นี้จะนำไปใช้ศึกษาอื่นและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการต้านยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ต่อไป

4.2 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการคือยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคคือยา โดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

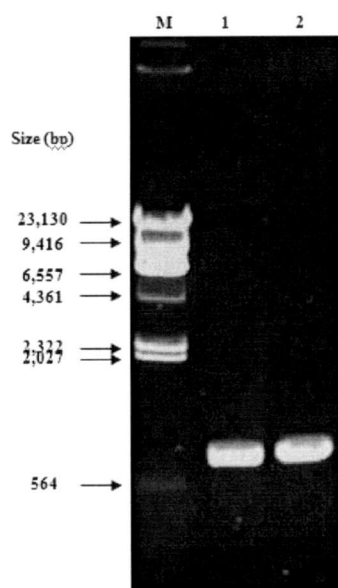
ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการคือยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคคือยา ขั้นแรกจะต้องทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA หรือ *rrs* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกมาจากผู้ป่วยและมีคุณสมบัติการต้านยากานามัยซินเสียก่อน เนื่องจากการคือยาส่วนใหญ่ที่พบมักจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA หลังจากนั้น จึงทำการคัดเลือกเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA มาทำการศึกษายีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการคือยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ต่อไป

4.2.1 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่คือยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

4.2.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงในหัวข้อ 3.4.3.2 โดยไซไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบไว้ในตารางที่ 3.4 และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ

M. tuberculosis ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือ 779 คู่เบส (รูปที่ 4.1) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินทุกสายพันธุ์ เป็นแม่แบบไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ก่อนตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 16825

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17841

4.2.1.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ที่ได้ด้วย BigDye Terminator Reactions จากด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินทั้ง 29 สายพันธุ์มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962) ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (NCBI) ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาจำนวน 21 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1401 โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์จากเบสอะดีนีน (A) ไปเป็นกวัวนีน (G) (รูปที่ 4.2) ในขณะที่มีเพียงเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาจำนวน 8 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งนี้ (ตารางที่ 4.1)

แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินคิดเป็นร้อยละ 72.4 มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA อย่างไรก็ตาม จากการทดลองไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นๆ ของยีนนี้ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษา ในการทดลองต่อไป จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาจำนวน 8 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ยีน 16S rRNA ไปทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ต่อไป

```

>xrs_gene      AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGGGGTTTCCTTCCTTGG 840
>xrs_13287    AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGGGGTTTCCTTCCTTGG 89
*****

>xrs_gene      GATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCCTGGGGAGTACGCGCCGCAAGGCTAA 900
>xrs_13287    GATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCCTGGGGAGTACGCGCCGCAAGGCTAA 149
*****

>xrs_gene      AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGAGCATGTGGATTAAATTCGATGC 960
>xrs_13287    AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGAGCATGTGGATTAAATTCGATGC 209
*****

>xrs_gene      AACGCGAAGAACCCTTACCTTGGGTTTGACATGCACAGGACCGCTCTAGAGATAGCGGTTCC 1020
>xrs_13287    AACGCGAAGAACCCTTACCTTGGGTTTGACATGCACAGGACCGCTCTAGAGATAGCGGTTCC 269
*****

>xrs_gene      CTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG 1080
>xrs_13287    CTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG 329
*****

>xrs_gene      TTAGTCCCGCACCAGCCCAACCCCTTGTCTCAITGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACT 1140
>xrs_13287    TTAGTCCCGCACCAGCCCAACCCCTTGTCTCAITGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACT 389
*****

>xrs_gene      CGTGACAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCC 1200
>xrs_13287    CGTGACAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGCC 449
*****

>xrs_gene      CCTTAATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCG 1260
>xrs_13287    CCTTAATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCG 509
*****

>xrs_gene      AGGTTAAGCGAATCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCC 1320
>xrs_13287    AGGTTAAGCGAATCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCC 569
*****

>xrs_gene      GTGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTCGGGTGAATACGTTCCCGGG 1380
>xrs_13287    GTGAAGTCCGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTCGGGTGAATACGTTCCCGGG 629
*****

>xrs_gene      CCTTGTACACACCGTCCGTCACGTCATTAAGTCCGGTAAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAA 1440
>xrs_13287    CCTTGTACACACCGTCCGTCACGTCATTAAGTCCGGTAAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAA 689
*****

>xrs_gene      CCCTCGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGACGAAGTCCGTAACAGGTA 1500
>xrs_13287    CCCTCGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGATCGGCGATTGGACGAAGTCCGTAACAGGTA 746
*****

```

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 13287 ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ด้วยโปรแกรม ClustalW กรอบสี่เหลี่ยมแสดงตำแหน่งของการกลายพันธุ์ A1401G ในยีน 16S rRNA

ตารางที่ 4.1 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 29 สายพันธุ์

ลำดับ ที่	สายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA	ลำดับ ที่	สายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA
1	13287	A1401G	16	17984	NM
2	13617	NM	17	18182	A1401G
3	14260	NM	18	18515	A1401G
4	15966	NM	19	18810	A1401G
5	16179	A1401G	20	19109	A1401G
6	16825	NM	21	19111	A1401G
7	17012	A1401G	22	19381	A1401G
8	17016	A1401G	23	20120	NM
9	17092	A1401G	24	21127	A1401G
10	17164	NM	25	21388	A1401G
11	17592	A1401G	26	21848	A1401G
12	17653	A1401G	27	22104	A1401G
13	17688	A1401G	28	24433	NM
14	17845	A1401G	29	27058	A1401G
15	17962	A1401G	Ctrl	H37Rv	NM

NM หมายถึง ไม่เกิดการกลายพันธุ์ (No mutation)

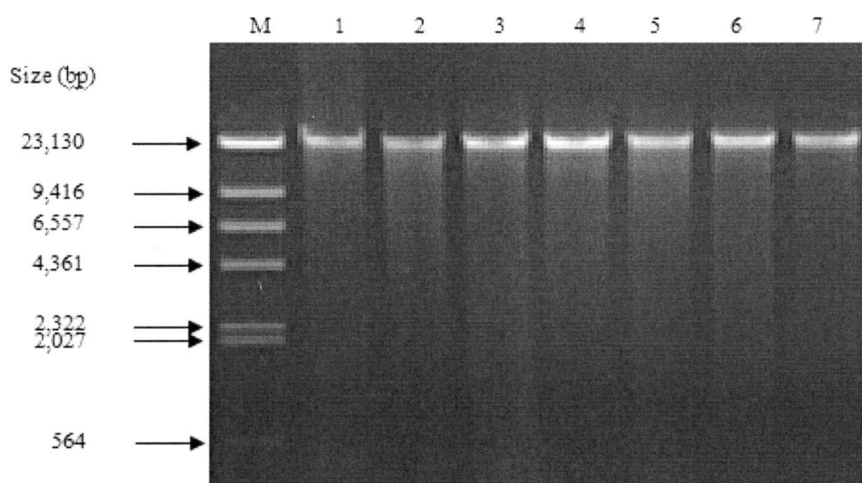
A1401G หมายถึง การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 1401 จากเบสอะดีนีน (A) เปลี่ยนไปเป็นเบสกวานีน (G)

4.3 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค ด้วยวิธีการทำ Overexpression ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคดื้อยาในเซลล์ *E. coli*

การศึกษายีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยการทำ Overexpression มีวิธีการดังนี้ นำจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยาที่สกัดได้มาย่อยบางส่วน (Partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* เพื่อให้มีขนาดเล็กลง จากนั้น นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pOLYG และ pSMT1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (พลาสมิดทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถแสดงออกได้ทั้งใน *E. coli* และ *Mycobacterium* sp.) นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมทรานสฟอร์มเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* DH5 α สุดท้าย ศึกษาคุณสมบัติการต้านยาของทรานสฟอร์มแมนท์และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

4.3.1 ผลการเตรียมจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคดื้อยากานามัยซิน

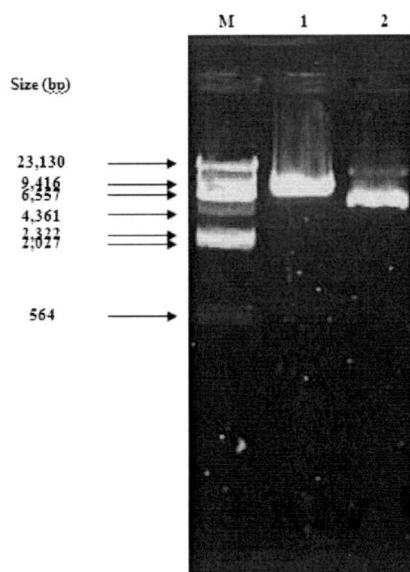
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยที่ต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินทั้งหมด 8 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ แล้วนำโคโลนีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาทำการสกัดจีโนมดีเอ็นเอตามวิธีการทดลองในหัวข้อ 3.4.2.1 และวิเคราะห์จีโนมดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปรากฏแถบจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ทุกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากานามัยซินเพียง 1 แถบ โดยอยู่เหนือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* ที่มีขนาด 23,130 คู่เบส (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ตัวอย่างจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆ ที่ตัดต่อยากานามัยซิน
 เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 เลน 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 13617
 เลน 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 14260
 เลน 3 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 15966
 เลน 4 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 16825
 เลน 5 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164
 เลน 6 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17984
 เลน 7 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 20120

4.3.2 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยชุด High-speed Plasmid Mini kit

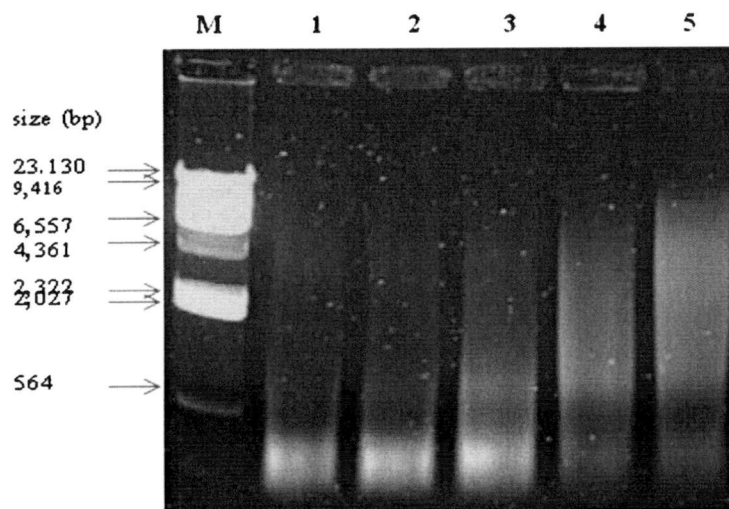
จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยชุด High-speed Plasmid Mini kit ตามขั้นตอนในหัวข้อที่ 3.4.2.2 และวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ทำการสกัดได้นี้มีความเข้มข้นประมาณ 120 และ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุด High-speed Plasmid Mini Kit
เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG
เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1

4.3.3 ผลการย่อยจีโนมดีเอ็นเอบางส่วน (Partial digestion)

จากการนำจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่างๆ มาทำการย่อยแบบ Partial digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ตามวิธีการในขั้นตอนที่ 3.4.2.4 เพื่อหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการตัดจีโนมดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 500-3,000 คู่เบส) แล้วทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยแบบบางส่วน (Partial digested DNA) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยนั้นมีความแตกต่างกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ที่ต่างกัน โดยเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 16.5 และ 5.5 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ จีโนมดีเอ็นเอจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ ไม่พบลักษณะเป็นแถบป็น (รูปที่ 4.5) ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.15 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ จีโนมดีเอ็นเอจะถูกย่อยอย่างไม่สมบูรณ์ พบแถบดีเอ็นเอเป็นป็นที่มีขนาดตั้งแต่ 500 ถึงประมาณ 6,000 คู่เบส (รูปที่ 4.5) จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมในการตัดจีโนมดีเอ็นเอให้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 500-3,000 คู่เบส คือ 0.15 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ จากนั้น จึงทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 ถึง 3,000 คู่เบสออกจากเจล และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit



รูปที่ 4.5 ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17984 ด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* แบบ Partial digestion

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 1 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 16.5 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ

เลน 2 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 5.5 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ

เลน 3 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 1.85 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ

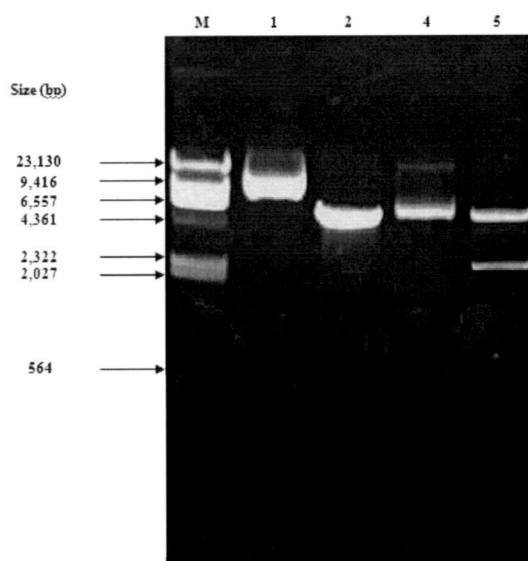
เลน 4 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ

เลน 5 คือ ผลิตรหัสที่ได้จากการตัดจีโนมมิกทีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* ความเข้มข้นสุดท้าย 0.15 ยูนิตต่อไมโครกรัมของดีเอ็นเอ

4.3.4 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* และการทำ dephosphorylation

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* ตามวิธีการในหัวข้อ 3.4.2.5 แล้วนำผลิตรหัสที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* มีขนาดประมาณ 5,000 คู่เบส เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG มีขนาด 5,315 คู่เบส มีจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* เพียงตำแหน่งเดียว (ภาคผนวก ข) ดังนั้น เมื่อนำพลาสมิด pOLYG มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* แล้วจะทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรงเพียงขนาดเดียว ส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอ

pSMT1 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 5,000 และ 2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.6) เนื่องจากพลาสมิด pSMT1 มีจุดจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 2 ตำแหน่งที่บริเวณส่วนต้นและส่วนท้ายของยีน *luxAB* (ภาคผนวก ข) ดังนั้น เมื่อนำพลาสมิด pSMT1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 ชิ้นที่มีขนาด 5,817 คู่เบส และ 2,403 คู่เบส หลังจากนั้น จึงทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' (Dephosphorylation)



รูปที่ 4.6 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1

เลน 4 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

4.3.5 ผลการเชื่อมต่อ (Ligation) และผลการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม

จากการนำชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI เพียงบางส่วนมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG และ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะทำให้ได้เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม แล้วทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อให้อาศัย *E. coli* DH5 α ตามขั้นตอนที่ 3.4.2.7 และ 3.4.2.8 ตามลำดับ โดยทำการศึกษาในเชื้อวัณโรคทั้งหมด 8 สายพันธุ์ พบว่า ไม่สามารถพบโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการโคลนยีน เช่น ขนาดของ

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสม การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3A* อาจตัดตรงกลางยีน ทำให้ไม่สามารถโคลนยีนทั้งหมดได้ สภาวะในการทำการ Dephosphorylation, Ligation และ Transformation หรืออาจเป็นไปได้ว่ายีนดังกล่าวไม่สามารถแสดงออกได้ในเชื้อ *E. coli* เป็นต้น ดังนั้น คณะวิจัยจึงพยายามหาวิธีการอื่นมาใช้ในการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา จากการตรวจเอกสารพบว่า เชื้อดื้อยาจำนวนมากเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งๆ ของยีนที่เกี่ยวข้อง ในการทดลองต่อไป จะได้นำเชื้อวัณโรคดื้อยาทั้งหมด 8 สายพันธุ์มาศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา

4.4 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้อง

ยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคดื้อยาที่ศึกษา มีดังนี้ ยีน *eis* (Rv2416c) ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์อะมิโนไกลโคไซด์อะซิetylทรานสเฟอเรส (Aminoglycoside acetyltransferase) ยีน *gidB* (Rv3919c) ที่ถอดและแปลรหัสเป็น 7-Methylguanosine (m^7G) methyltransferase ยีน *tap* (Rv1258c) ที่ถอดและแปลรหัสเป็น Multidrug efflux pump และยีน *whiB7* (Rv3197A) ที่ถอดและแปลรหัสเป็น Transcriptional activator โดยทำการเพิ่มปริมาณของยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ก่อนทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้

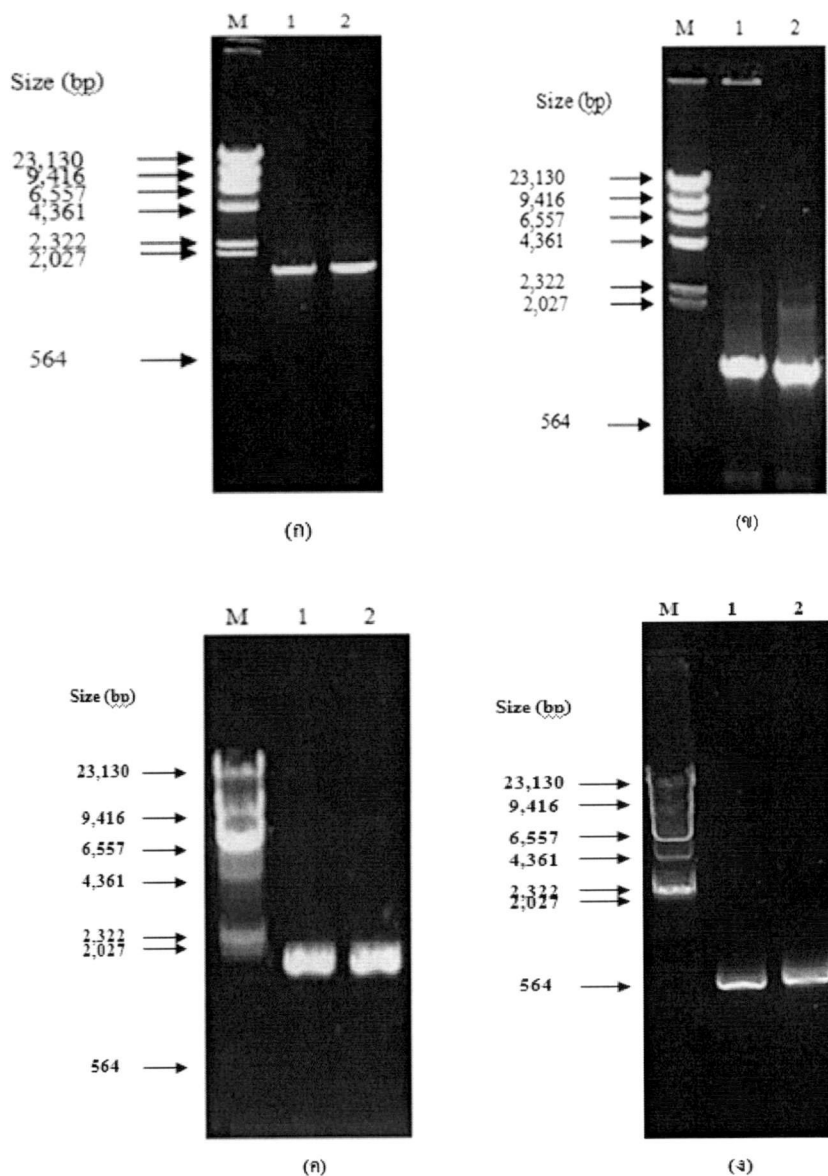
4.4.1 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 13617, 14260, 15966, 16825, 17164, 17984, 20120 และ 24433 ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA จะถูกนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *eis* ยีน *gidB* ยีน *tap* และยีน *whiB7* (Rv3197A) แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv (Accession no. NC_000962) ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (NCBI) ด้วยโปรแกรม ClustalW

4.4.1.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังแสดงในหัวข้อ 3.4.3.2 โดยไซพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบไว้ในตารางที่ 3.4 และใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A) ที่มีขนาดประมาณ 1,600, 1,200, 1,800 และ 500 คู่เบส

ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,660, 1,237, 1,847 และ 550 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 4.7) จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของทุกยีนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินทั้ง 8 สายพันธุ์ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



รูปที่ 4.7 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *eis* (Rv2416c) (น) ยีน *gidB* (Rv3919c) (ข) ยีน *tap* (Rv1258c) (ค) และยีน *whiB7* (Rv3197A) (ง)

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 13617

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 14260

4.4.1.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วย BigDye Terminator Reactions จากด้วยเครื่อง ABI PRISM^R 3700 DNA Analyzer และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *eis* (Rv2416c) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินและไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ทั้ง 8 สายพันธุ์ มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (NCBI) ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 13617, 14260, 15966, 17984 และ 20120 มีการกลายพันธุ์ของยีน *eis* (Rv2416c) โดยกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เกิดที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ -14 (นิวคลีโอไทด์ที่พบก่อนหน้า Start codon 14 ตัว) ซึ่งเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (C) ไปเป็นเบสไทมีน (T) หรือ C-14T และมีเพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น คือ สายพันธุ์ 15966 ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *eis* ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ -37 โดยเปลี่ยนจากเบสกวานีน (G) เปลี่ยนไปเป็นไทมีน (T) หรือ G-37T (รูปที่ 4.8ก และ ข) ในขณะที่เชื้อ *M. tuberculosis* อีก 2 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *eis* (ตารางที่ 4.2)

```

>eis_gene      CACGGCGAAATTCGTCGCTGATTCTCGCAGTGGCGTCACGCTGGCGGGGCTACCCGCATC 240
>eis_14260    CACGGCGAAATTCGTCGCTGATTCTCGCAGTGGCGTCACGCTGGCGGGGCTACCCGCATC 197
*****

>eis_gene      GCGTSAICCCITGGCCAGACACTGTCGTCGTAATATTCACGTGCACGTGGCCGCGGCATAT 300
>eis_14260    GCGTSAICCCITGGCCAGACACTGTCGTCGTAATATTCACGTGCACGTGGCCGCGGCATAT 257
*****

                C-14T
>eis_gene      GCCACAGTCCGATTCTGTGACTGTGACCCCTGTGTAGCCCGACCGAGGACGACTGGCCGGG 360
>eis_14260    GCTACAGTCCGATTCTGTGACTGTGACCCCTGTGTAGCCCGACCGAGGACGACTGGCCGGG 317
** *****

>eis_gene      GATGTTCCCTACTGGCCGCGGCCAGTTTCACCGATTTCATCGGCCCTGAATCAGCGACCCG 420
>eis_14260    GATGTTCCCTACTGGCCGCGGCCAGTTTCACCGATTTCATCGGCCCTGAATCAGCGACCCG 377
*****

>eis_gene      CTGGCCGACCCCTGGTCCACCACCGAGCGGCTGGTGGTCCCGCATGGTCCGCGCCCGGG 480
>eis_14260    CTGGCCGACCCCTGGTCCACCACCGAGCGGCTGGTGGTCCCGCATGGTCCGCGCCCGGG 437
*****

```

(ก)

```

>eis_gene      GTGGGTGCCGGAGCCGTCGGGGTATGCTCGACGTGGGAGCGTCCGCCACCGTAACGT 180
>eis_15966_R  GTGGGTGCCGGAGCCGTCGGGGTATGCTCGACGTGGGAGCGTCCGCCACCGTAACGT 180
*****

>eis_gene      CACGGCGAAATTCGTCGCTGATTCTCGCAGTGGCGTCACGCTGGCGGGGCTACCCGCATC 240
>eis_15966_R  CACGGCGAAATTCGTCGCTGATTCTCGCAGTGGCGTCACGCTGGCGGGGCTACCCGCATC 240
*****

                G-37T
>eis_gene      GCGTGATCCITGGCCAGACACTGTCGTCGTAATAT CACGTGCACGTGGCCGCGGCATAT 300
>eis_15966_R  GCGTGATCCITGGCCAGACACTGTCGTCGTAATAT CACTTGCACGTGGCCGCGGCATAT 300
*****

>eis_gene      GCCACAGTCCGATTCTGTGACTGTGACCCCTGTGTAGCCCGACCGAGGACGACTGGCCGGG 360
>eis_15966_R  GCCACAGTCCGATTCTGTGACTGTGACCCCTGTGTAGCCCGACCGAGGACGACTGGCCGGG 360
*****

```

(ข)

รูปที่ 4.8 การกลายพันธุ์ของยีน *eis* ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่ออายุากานามัยซิน ที่ตำแหน่ง C-14T (ก) และ G-37T (ข)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gidB* เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ต่ออายุปฏิชีวนะกานามัยซินและไม่มีอาการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ทุกสายพันธุ์ที่ทำการศึกษามีการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 299 โดยเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (C) ไปเป็นเบสไทมีน (T) หรือ C299T (รูปที่ 4.9ก) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์นี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสในตำแหน่งที่ 100 จากกรดอะมิโนเซอรีน (Serine; S) ไปเป็นกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine; F) หรือ S100F (ตารางที่ 4.2) นอกจากนี้เชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 7 สายพันธุ์ ยังพบการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 276 จากเบสอะดีนีน (A) ไปเป็นเบสไซโตซีน (C) หรือ A276C (รูปที่ 4.9ข) โดยการกลายพันธุ์ที่

ตำแหน่ง A276C จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 92 จากกรดกลูตามิก (Glutamic acid; E) ไปเป็นกรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid; D) หรือ E92D (ตารางที่ 4.2) จากการทดลองพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* เกิดขึ้นในเกือบทุกสายพันธุ์ของเชื้อที่ทำการศึกษา จึงคาดว่ากรการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เพื่อเป็นการยืนยันว่าการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* นี้ไม่มีผลต่อการดื้อยา จึงได้นำเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ทั้งหมด 27 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gidB* และพบว่าเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์มีการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในตำแหน่ง A276C และ C299T เช่นกัน (ข้อมูลไม่ได้แสดง)

```

>gidB_gene      GGGCTGGTGGGACCCCGGAAGTCGGTAGGCTATGGGACCGGCATCTACTGAACTGCGCC 660
>gidB_15966    GGGCTGGTGGGACCCCGGAAGTCGGTAGGCTATGGGACCGGCATCTACTGAACTGCGCC 589
*****

>gidB_gene      GTGATCGGTGAGCTCCTCGAACGCGGTGACCGGGTCGTGGATATCGGTAGCGGAGCCGGG 720
>gidB_15966    GTGATCGGTGAGCTCCTCGAACGCGGTGACCGGGTCGTGGATATCGGTAGCGGAGCCGGG 649
***** A276C

>gidB_gene      TTGCCGGCGTGCCATTGGCGATAGCGCGCCGGACCTCCAGGTAGTTCTCTTAGAACCG 780
>gidB_15966    TTGCCGGCGTGCCATTGGCGATAGCGCGCCGGACCTCCAGGTAGTTCTCTTAGAACCG 709
*****

C299T

>gidB_gene      CTA CTACTGCGCCGCACCAGTCTCTTGAGAGATGTTGACAGATCTGGGCGTGCCGTTGAG 840
>gidB_15966    CTA CTACTGCGCCGCACCAGTCTCTTGAGAGATGTTGACAGATCTGGGCGTGCCGTTGAG 769
*****

>gidB_gene      ATCGTGCGGGGGCGCGCCGAGGAGTCTGGGTGCAGGACCAATTGGGCGGCAGCGACGCT 900
>gidB_15966    ATCGTGCGGGGGCGCGCCGAGGAGTCTGGGTGCAGGACCAATTGGGCGGCAGCGACGCT 829
*****

```

รูปที่ 4.9 การกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ดื้อต่อยากานามัยซิน ที่ตำแหน่ง A276C และ C299T

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tap* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ 7 สายพันธุ์ จะสามารถพบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 581 โดยจะมีเบสไซโตซีน (C) เพิ่มขึ้นมา 1 เบส หรือ Ins581C (รูปที่ 4.10) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแปลรหัสของกรดอะมิโนของโปรตีน Tap โดยจะทำให้พบ Stop codon และนำไปสู่การสิ้นสุดการแปลรหัส การเพิ่มเบสไซโตซีนในสายดีเอ็นเอจะมีผลทำให้ได้โปรตีนที่มี 231 ตัว ซึ่งน้อยกว่าโปรตีน Tap ที่มีกรดอะมิโน 419 ตัว (ตารางที่ 4.2) นอกจากนี้ มีเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 24433 ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *tap* (ตารางที่ 4.2)

```

>tap_gene      GTC AACG TGT GGT GCT GGC CGT ATT GGC CGC CCT TGG CGG CCG CCT TCG GCC CCG GCG AG GC 360
>tap_15966     GTC AACG TGT GGT GCT GGC CGT ATT GGC CGC CCT TGG CGG CCG CCT TCG GCC CCG GCG AG GC 360
*****

>tap_gene      ATG ACG GCT CGT GACT CGAT GCT GCC CGA GCG CCG CCG CT C GGG CAG GCT G GTC GT TGG AC 420
>tap_15966     ATG ACG GCT CGT GACT CGAT GCT GCC CGA GCG CCG CCG CT C GGG CAG GCT G GTC GT TGG AC 420
*****

>tap_gene      CGC AIC AAC CGG CGC CT ACC GAG GCG AIC CT C AAC CT TGG CCT TTT ATT GT C GG CCG GCG C AIC 480
>tap_15966     CGC AIC AAC CGG CGC CT ACC GAG GCG AIC CT C AAC CT TGG CCT TTT ATT GT C GG CCG GCG C AIC 480
*****

>tap_gene      GGT GGC TTG ATG AT CCG CAG CG GT TGG CGG C AIC ACC CAA TGT GGA TT ACC GCG ACG GCG CA 540
>tap_15966     GGT GGC TTG ATG AT CCG CAG CG GT TGG CGG C AIC ACC CAA TGT GGA TT ACC GCG ACG GCG CA 540
*****

>tap_gene      IT C GGG TTG TCC AIC C C TCG CG ATT TGG CCG CCT TGC A G TIC G -AGGG TCC GGC AAG CCG CA 599
>tap_15966     IT C GGG TTG TCC AIC C C TCG CG ATT TGG CCG CCT TGC A G TIC G -AGGG TCC GGC AAG CCG CA 600
*****

>tap_gene      CCAC ACC TCG CGG CCG CCA AGG GT TGG A TCC GGG A TCG CCG A GGG GCT TCG CTT C GIC TG 659
>tap_15966     CCAC ACC TCG CGG CCG CCA AGG GT TGG A TCC GGG A TCG CCG A GGG GCT TCG CTT C GIC TG 660
*****

```

Ins 581C

รูปที่ 4.10 การกลายพันธุ์ของยีน *tap* ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ต่อยากานามัยซินที่ตำแหน่ง Ins581C

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *whiB7* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าไม่เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่ายีน *whiB7* ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

4.5 ผลการวิเคราะห์ค่า MIC (Minimum Inhibition concentration) ต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซินของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

จากการวิเคราะห์ค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* ต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซินของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ทั้ง 29 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มีค่า MIC ต่อยากานามัยซินมากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจัดว่าเป็นค่า MIC ที่สูง ในขณะที่ค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* ต่ออะมิกาซินมีค่าเท่ากับ 8 หรือมากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการพิจารณาค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซินของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1401G ในยีน 16S rRNA พบว่ามีเชื้อ *M. tuberculosis* 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 16825 และ 17164 ที่มีค่า MIC ต่ออะมิกาซินมีค่าเท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *eis*, *gidB*, *tap* และ *whiB7* และค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะอะมิคาซินและกานามัยซิน ในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 8 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA

สายพันธุ์	การกลายพันธุ์ของยีน <i>eis</i>	การกลายพันธุ์ของยีน <i>gidB</i>		การกลายพันธุ์ของยีน <i>tap</i>		การกลายพันธุ์ของยีน <i>whiB7</i>	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งลำดับกรดอะมิโน	ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	ตำแหน่งลำดับกรดอะมิโน		AK	KM
13617	C-14T	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	8	>64
14260	C-14T	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	8	>64
15966	G-37T	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	8	>64
16825	NM	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	>64	>64
17164	NM	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	>64	>64
17984	C-14T	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	8	>64
20120	C-14T	A276C C299T	E92D S100F	ins 581C	Frameshift (419>231)	NM	8	>64
24433	NM	C299T	S100F	NM	NM	NM	ND	ND

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินทั้ง 29 สายพันธุ์

ในการทดลองนี้ ชั้นแรกเป็นการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาทั้งหมด 29 สายพันธุ์ เนื่องจากการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์มักเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA เป็นส่วนใหญ่ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาจำนวน 21 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 72.4 จะเกิดการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง 1401 โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จากเบสอะดีนีน (A) ไปเป็นเบสกวานีน (G) (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาจำนวน 8 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 27.6 จะไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA (ตารางที่ 4.2) จากการทดลองพบเฉพาะการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ในตำแหน่งอื่น โดยทั่วไป การกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G จะพบมากที่สุดในการศึกษาเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซิน (Suzuki et al., 1998) อย่างไรก็ตาม สามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่งอื่นๆ เช่น C1402G และ G1484T ได้เช่นกัน (Kiet et al., 2010; Brossier et al., 2010; Feuerriegel et al., 2009; Suzuki et al., 1998; Sirgel et al., 2012) การกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G จัดเป็นยีนเครื่องหมายที่สำคัญ (Strong marker) ของการต้านยาปฏิชีวนะอะมิกาซิน กานามัยซิน และคาปริโอมัยซิน โดยการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G มีผลต่อการต้านยาคาปริโอมัยซินในระดับต่ำ ในขณะที่การกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C1402T จัดเป็นยีนเครื่องหมายที่ไม่ดี (Poor marker) ของการต้านยาปฏิชีวนะนี้ เนื่องจากสามารถพบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง C1402T ในเชื้อสายพันธุ์ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptible strain) ได้ (Georghiou et al., 2012) ในการทดลองนี้ พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทยคิดเป็นร้อยละ 72.4 ซึ่งสูงกว่าร้อยละ 56 ที่ได้จากงานวิจัยของ Georghiou และคณะ (2012) เนื่องจากสายพันธุ์ที่ทำการศึกษากลับมาจากการคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน

จากการทดลองพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G จำนวน 20 สายพันธุ์จากทั้งหมด 21 สายพันธุ์ที่มีการดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินในระดับสูง โดยมีค่า MIC ของเชื้อดื้อยาทั้งสองชนิดมากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง

A1401G มีค่า MIC ต่อยาอะมิกาซินและกานามัยซินในระดับที่สูง (Jugheli et al., 2009) นอกจากนี้จากการศึกษาค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* ต่อยากานามัยซินทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G พบว่าเชื้อทั้ง 8 สายพันธุ์มีการต่อยากานามัยซินในระดับสูงเช่นกัน โดยมีค่า MIC มากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าอาจมียีนหรือกลไกอื่นๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับการต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคอีก จากการศึกษาค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* ต่อยากานามัยซินทั้ง 8 สายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง A1401G พบว่ามีเชื้อเพียง 5 สายพันธุ์ที่มีค่า MIC ต่อยาอะมิกาซินในระดับต่ำ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่ากลไกหรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการต่อยาอะมิกาซินและกานามัยซินอาจมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรค

5.2 ผลการตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค ด้วยวิธีการทำ Overexpression ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคที่อยู่ใน *E. coli*

จากการนำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA มาศึกษาชิ้นที่อาจมีส่วนร่วมในกลไกการต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อเหล่านี้มาย่อยเพียงบางส่วน (Partial digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* แล้วทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยเข้ากับพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG หรือ pSMT1 ที่สามารถแสดงออกใน *E. coli* และ *Mycobacteria* จากนั้นทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เชื้อ *E. coli* พบว่าไม่สามารถได้ทรานสฟอร์มแมนท์ที่เจริญบนอาหารที่มีทั้งยาปฏิชีวนะกานามัยซินและไฮโกรมัยซิน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการโคลนยีน ดังนี้

(1) ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เหมาะสม

พลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 5,315 คู่เบสและมีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเองของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย (*oriM*) (Gaora et al., 1997) ในขณะที่พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 8,220 คู่เบสและมีจุดเริ่มต้นของการจำลองตัวเองของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย (*ALori*) และ *E. coli* (*Eori*) ซึ่งสามารถใช้พลาสมิดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชนิดนี้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจในเชื้อมัคโคแบคทีเรียได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองนี้มีขนาดใหญ่ จึงทำให้การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ (ที่อาจมีขนาดที่ใหญ่เช่นกัน) นั้นทำได้ยาก

(2) สภาวะที่ใช้ในการโคลนยีน

สภาวะที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการโคลนยีน ได้แก่ สภาวะการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอและจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สภาวะในการทำ Dephosphorylation สภาวะการเชื่อมต่อและการทรานสฟอร์มแมนซ์ ฯลฯ

(3) การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีขนาดเล็กลงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์เพียง 4 ตำแหน่ง ถึงแม้จะเป็นการตัดเพียงบางส่วน แต่ก็อาจทำการตัดบริเวณภายในของยีนที่สนใจซึ่งจะทำให้ยีนดังกล่าวไม่สามารถแสดงออกได้

(4) ปัจจัยอื่นๆ เช่น การควบคุมระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจโดยอาศัยโปรตีนควบคุมชนิดของโปรโมเตอร์ เป็นต้น

5.3 ผลการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรคดื้อยากานามัยซิน โดยการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *eis* (Rv2416c) ยีน *gidB* (Rv3919c) ยีน *tap* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3197A)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *eis* ในเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* 5 สายพันธุ์จากทั้งหมด 8 สายพันธุ์ จะเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* (ตารางที่ 4.2) ซึ่งยีน *eis* สามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นเอนไซม์อะมิโนไกลโคไซด์อะเซทิลทรานสเฟอเรส (Aminoglycoside acetyltransferase) มีรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* เกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินในเชื้อ *M. tuberculosis* (Zaunbrecher et al., 2009) อย่างไรก็ตาม จะพบการกลายพันธุ์ของยีน *eis* ในเชื้อวัณโรคดื้อยาน้อยกว่าการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA จากการทดลองพบตำแหน่งของการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* ที่ตำแหน่ง -14 โดยเปลี่ยนจากเบสไซโตซีน (Cytosine) ไปเป็นเบสไทมีน (Thymine) จำนวน 4 สายพันธุ์ และที่ตำแหน่ง -37 ที่เปลี่ยนจากเบสกวานีน (Guanine) ไปเป็นเบสไทมีน (Thymine) จำนวน 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ได้คือ C-14T และ G-37T นั้นได้มีการรายงานแล้วในเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Zaunbrecher et al., 2009) รวมถึงมีการแสดงตำแหน่งอื่นๆ ของการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* เช่น ตำแหน่ง G-6T (ตำแหน่ง -6 เปลี่ยนจากเบสกวานีนไปเป็นเบสไทมีน) ตำแหน่ง G-10A (ตำแหน่ง -10 เปลี่ยนจากเบสกวานีนไปเป็นเบสอะดีนีน) ตำแหน่ง C-12T (ตำแหน่ง -12 เปลี่ยนจากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสไทมีน) เป็นต้น (Engström et al., 2011; Gikalo et al., 2012) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* จะทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินในระดับสูง โดยมีค่า MIC มากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Zaunbrecher และคณะ (2009) ที่พบว่าการเพิ่มการแสดงออก (Overexpression) ของยีน *eis* จะทำให้เกิดการดื้อต่อยากานามัยซินในระดับต่ำ โดยมีค่า MIC น้อยกว่า 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีกลไกอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน *eis* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากานามัยซินในระดับสูงในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการศึกษา

ยีน *gidB* เป็นยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ 16S rRNA methyltransferase (Okamoto et al., 2007) มีรายงานพบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *gidB* นี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินในระดับต่ำ (Wong et al., 2011) จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในเชื้อวัณโรคที่ดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้ง 8 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ที่ตำแหน่งต่างๆ โดยเชื้อทุกสายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ที่ C299T (ตำแหน่ง 299 เปลี่ยนจากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสไทมีน) และเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 7 สายพันธุ์ หรือคิดเป็นร้อยละ 87.5 มีการกลายพันธุ์ที่ A276T (ตำแหน่ง 276 เปลี่ยนจากเบสอะดีนีนไปเป็นเบสไทมีน) ถึงแม้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ทั้งสองตำแหน่งนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของเอนไซม์ 16S rRNA methyltransferase แต่จากการพบการกลายพันธุ์ของยีน *gidB* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะกานามัยซิน จึงคาดว่ายีน *gidB* นี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินของเชื้อวัณโรคที่ทำการศึกษา

ยีน *tap* หรือยีน Rv1258c เป็นยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็น Multidrug efflux pump ในเชื้อ *M. fortuitum* ซึ่งโปรตีนนี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน Tap ในเชื้อ *M. tuberculosis* (Ainsa et al., 1998) โดยเมื่อนำยีน *tap* ของเชื้อ *M. fortuitum* มาแสดงออกในเชื้อ *M. smegmatis* พบว่าเชื้อที่ได้รับยีน *tap* มีความสามารถในการดื้อต่อยาเตตระไซคลินและยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Ainsa et al., 1998; De Rossi et al., 2002; Siddiqi et al., 2004) จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *tap* หรือ Rv1258c ในเชื้อวัณโรคดื้อยากานามัยซินพบว่า มีเชื้อ *M. tuberculosis* 7 สายพันธุ์ที่เกิดการเพิ่มขึ้น (insertion) ของเบสไซโตซีนที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 581 ซึ่งการกลายพันธุ์ลักษณะนี้จะส่งผลต่อการอ่านรหัสโคดอนและทำให้เกิดการหยุดการแปลรหัสเร็วขึ้น จำนวนของกรดอะมิโนของโปรตีน Tap ที่มีการเพิ่มเบสไซโตซีนในยีน *tap* จะได้ 231 ตัวจากเดิมที่แปลรหัสได้ 419 ตัว และอาจส่งผลต่อการทำงานของโปรตีน Tap อย่างไรก็ตาม แต่พิจารณาจากค่า MIC ของเชื้อดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินพบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *tap* นี้ สามารถดื้อยาทั้งสองชนิดได้ แสดงให้เห็นว่า อาจมีกลไกอื่นในเชื้อก่อวัณโรคดื้อยานอกเหนือจากกลไกการนำยาออกนอกเซลล์โดยโปรตีน Tap

ยีน *whiB7* หรือยีน Rv3197A เป็นยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นโปรตีนกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (Transcriptional activator) (Burian et al., 2012) มีรายงานพบว่า การแสดงออกของโปรตีน WhiB7 จะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนดื้อยา *eis* และ *tap* (Morris et al., 2005) โดยเมื่อระดับการแสดงออกของยีน *whiB7* เพิ่มขึ้นจากการกลายพันธุ์ในบริเวณ 5'-untranslated จะส่งผลให้ระดับการแสดงออกของยีน *eis* และ *tap* มากขึ้นเช่นเดียวกัน การกลายพันธุ์ในบริเวณ 5'-untranslated ของยีน *whiB7* นี้จะทำให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะกานามัยซินและสเตรปโตมัยซินในระดับต่ำ (Reeves et al., 2013) จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *whiB7* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ไม่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณ 5' untranslated ของยีน *whiB7* ในเชื้อทั้งหมด

จากการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยากานามัยซินที่คัดแยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคในประเทศไทย สรุปได้ว่าร้อยละ 72 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยากานามัยซินจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA หรือ *rrs* ที่ตำแหน่ง 1401 (จากเบสอะดีนีนไปเป็นเบสกวานีน) การกลายพันธุ์นี้จะทำให้เกิดการดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินในระดับสูง ในขณะที่มีเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยากานามัยซินร้อยละ 17 เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* และอีกร้อยละ 11 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อยากานามัยซิน ที่ใช้ในการศึกษานี้ ยังไม่ทราบกลไกหรือยีนที่หน้าที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาอะมิกาซินและกานามัยซินที่แน่ชัด

บรรณานุกรม

- สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2552. คู่มืออบรม แนวทางมาตรฐานการดำเนินงานควบคุมวัณโรคสำหรับคลินิกวัณโรค. [Online].
Available : http://dpc3.ddc.moph.go.th/academic_site/attachments/article/43/TB.pdf
- Aínsa, J.A., Blokpoel, M.C.J., Ota, I., Young, D.B., Smet, K.A.L.D. and Martin, C. 1998. "Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*." *J. Bacteriol.* 180: 5836-5843.
- Alangaden, G.J., Kreiswirth, B.N., Aouad, A., Khetarpal, M., Igno, F.R., Moghazeh, S.L., Manavathul, E.K. and Lerner, S.A. 1998. "Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1295-1297.
- Brossier, F., Veziris, N., Aubry, A., Jarlier, V. and Sougakoff, W. 2010. "Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates." *J. Clin. Microbiol.* 48: 1683-1689.
- Burian, J., Ramón-García, S., Howes, C.G. and Thompson, C.J. 2012. "WhiB7, a transcriptional activator that coordinates physiology with intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10: 1037-1047.
- Cynamon, M.H., Klemens, S.P., Chou, T.S., Gimi, R.H. and Welch, J.T. 1992. "Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters." *J. Med. Chem.* 35: 1212-1215.
- De Rossi, E., Arrigo, P., Bellinzoni, M., Silva, P.A.E., Martin, C., Aínsa, J.A., Gugliera, P. and Riccardi, G. 2002. "The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily (MFS) in *Mycobacterium tuberculosis*." *Mol. Med.* 8: 714-724.
- Engström, A., Perskvist, N., Werngren, J., Hoffner, S.E. and Jureen, P. 2011. "Comparison of clinical isolates and *in vitro* selected mutants reveals that *tlyA* is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1247-1254.
- Feuerriegel, S., Cox, H.S., Zarkua, N., Karimovich, H.A., Braker, K., Rüscher, S. and Niemann, S. 2009. "Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-

- resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment.” **Antimicrob. Agents Chemother.** 53: 3353-3356.
- Gaora, P.O., Barnini, S., Hayward, C., Filley, E., Rook, G., Young, D. and Thole, J. 1997. “Mycobacteria as immunogens: development of expression vectors for use in multiple mycobacterial species.” **Med Princ Pract.** 6: 91-96.
- Georghiou, S.B., Magana, M., Garfein, R.S., Catanzaro, D.G., Catanzaro, A. and Rodwell, T.C. 2012. “Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: A systematic review.” **PLoS ONE.** 7: e33275.
- Gilkalo, M.B., Nosova, E.Y., Krylova, L.Y. and Moroz, A.M. 2012. “The role of eis mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region.” **J. Antimicrob. Chemother.** 67: 2107-2109.
- Johnson, R., Streicher, E.M., Louw, G.E., Warren, R.M., van Helden, P.D. and Victor, T.C. 2006. “Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.” **Mol. Biol.** 8: 97-111.
- Jugheli, L., Bzekalava, N., Rijk, P.D., Fissette, K., Portaels, F. and Rigouts, L. 2009. “High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene.” **Antimicrob. Agents Chemother.** 53: 5054-5068.
- Kiet, V.S., Lan, N.T.N., An, D.D., Dung, N.H., Hoa, D.V., Chau, N.V., Chinh, N.T., Caws, N.T., Farrar, J. and Caws, M. 2010. “Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.” **J. Clin. Microbiol.** 48: 2934-2939.
- Louw, G.E., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R.E., Van Helden, P.D. and Victor, T.C. 2009. “A balancing act: Efflux/influx in Mycobacterial drug resistance.” **Antimicrob. Agents Chemother.** 53: 3181-3189.
- McClure, W.R. and Cech, C.L. 1978. “On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis.” **J. Biol. Chem.** 253: 8949-8956.
- Morris, R.P., Nguyen, L., Gatfield, J., Visconti, K., Nguyen, K., Schnappinger, D., Ehrt, S., Liu, Y., Heifets, L., Piters, J., Schoolnik, G. and Thompson, C.J. 2005. “Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.” **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 102: 12200-12205.

- Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimaru, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y. and Ochi, K. 2007. "Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria." *Mol. Microbiol.* 63: 1096-1106.
- Portugal, I., Barreiro, L., Pereira, J.M. and Brum, L. 2004. "pncA mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal." *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 636-640.
- Ramaswamy, S.V., Amin, A.G., Góksel, S., Stager, C.E., Dou, S.J., Sahly, H.E., Moghazeh, S.L., Kreiswirth, B.N. and Musser, J.M. 2000. "Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 326-336.
- Rattan, A., Kalia, A. and Ahmad, N. 1998. "Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives." *Emerg. Infect. Dis.* 4: 195-209.
- Reeves, A.Z., Campbell, P.J., Sultana, R., Malik, S., Murray, M., Plikaytis, B.B., Shinnick, T.M. and Posey, J.E. 2013. "Aminoglycoside cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* due to mutations in the 5' untranslated region of *whiB7*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 1857-1865.
- Runyon, E.H. 1959. "Anonymous mycobacteria in pulmonary disease." *Med. Clin. North Am.* 43: 273-290.
- Siddiqi, N., Das, R., Pathak, N., Banerjee, S., Ahmed, N., Katoch, V.M. and Hasnain, S.E. 2004. "*Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity over-expresses a Tap-like efflux pump." *Infection.* 32: 109-111.
- Sirgel, F.A., Tait, M., Warren, R.M., Streicher, E.M., Böttger, E.C., Van Helden, P.D., Gey Van Pittius, N.C., Coetzee, G., Hoosain, E.Y., Chabula-Nxiweni, M., Hayes, C., Victor, T.C. and Trollip, A. 2012. "Mutations in the *rrs* A1401G gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*." *Microb. Drug Resist.* 18: 193-197.
- Snewin, V.A., Gares, M., Gaora, P.O., Hasan, Z., Brown, I.N. and Young, D.B. 1999. "Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs." *Infect. Immun.* 67: 4586-4593.
- Spies, F.S., Ribeiro, A.W., Ramos, R.D.F., Ribeiro, M.O., Martin, A., Palomino, J.C., Rossetti, M.L.R., Silva, P.E.A.D. and Zaha, A. 2011. "Streptomycin resistance and lineage-specific polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* *gidB* gene." *J. Clin. Microbiol.* 49: 2625-2630.

- Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y. and Taniguchi, H. 1998. "Detection of kanamycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene." **J. clin. Microbiol.** 36: 1220-1225.
- Takayama, K. and Kilburn, J.O. 1989. "Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*." **Antimicrob. Agents Chemother.** 33: 1493-1499.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." **Nucl. Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Velayati, A.A., Masjedi, M.R., Farnia, P., Ghanavi, J., Ziazarifi, A.H. and Hoffner, S.E. 2009. "Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran." **Chest.** 136: 420-425.
- Vetting, M.W., De Carvalho, L.P., Yu, M., Hegde, S.S., Magnt, S., Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. 2005. "Structure and function of the GNAT superfamily of acetyltransferases." **Arch. Biochem Biophys.** 433: 212-226.
- WHO. 2009. **Global tuberculosis control.** [Online]. Available : http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563802_eng_doc.pdf.
- WHO. 2010. **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB).** [Online]. Available : http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf.
- Wong, S.Y., Lee, J.S., Kwak, H.K., Via, L.E., Boshoff, H.I.M. and BarryIII, C.E. 2011. "Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **Antimicrob. Agents Chemother.** 55: 2515-2522.
- Woods, G.L., Barbara, C., Elliott, B., Desmond, E.P., Hall, G.S., Heifets, L., Pfyffer, G.E., Ridderhof, J.C., Wallace, R.J.Jr., Warren, N.G. and Witebsky, F.G. 2003. "Susceptibility testing of mycobacteria, norcardiae, and other aerobic actinomycetes." **NCCLS.** 23: 5-11.
- Zaunbrcher, M.A., Slkes, R.D. Jr., Metchock, B., Shinnick, T.M. and Posey, J.E. 2009. "Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 106: 20004-20009.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. and Cole, S. 1992. "The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*." **Nature.** 358: 591-593.
[Online].Available : <http://www.flickr.com/photos/flickrsy/6936515861/>
[Online].Available : <http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/Tuberculosis.html>

ภาคผนวก ก

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Löwenstein-Jensen (LJ)

1.1 Salt solution:

Monopotassium phosphate	2.4	กรัม
Magnesium sulphate (7H ₂ O)	0.24	กรัม
Magnesium citrate	0.6	กรัม
Asparagine	3.6	กรัม
Glycerol	12.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร

นำสารละลายที่ได้ไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Homogenized whole eggs (1 ลิตร)

เตรียมโดยล้างไข่ไก่ในน้ำสบู่ 5% โดยแช่ทิ้งไว้ 30 นาที นำมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วไปแช่ใน 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 15 นาที นำมาตอຍใส่ภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ตีให้เข้ากันและระวังอย่าให้เกิดฟอง กรองผ่านผ้าก๊อซที่ปราศจากเชื้อ (หนาประมาณ 4 ชั้น) ลงในสารละลาย salt solution (ข้อ 1.1) เติม malachite green 2% ลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทใส่ขวดฝาเกลียวที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปวางเอียงในตู้หนึ่ง 85 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อก็จะสุกแข็งตัว ปิดฝาให้สนิท และเก็บไว้ในตู้เย็นไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน

2. OADC (Oleic acid-albumin-dextrose-catalase)

ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Bovine albumin fraction V	50.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Sodium chloride	8.5	กรัม
Oleic acid	0.5	กรัม
Catalase	0.04	กรัม

จากนั้นจะนำส่วนผสมที่ได้มาทำการกรองเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ

ภาคผนวก ก (ต่อ)

3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 และ 7H10

ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Ammonium sulfate	0.50	กรัม
L-Glutamic acid	0.50	กรัม
Monopotassium phosphate	1.50	กรัม
Disodium phosphate	1.50	กรัม
Sodium citrate	0.40	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.40	กรัม
Magnesium sulfate	0.025	กรัม
Calcium chloride	0.0005	กรัม
Zinc sulfate	0.001	กรัม
Copper sulfate	0.001	กรัม
Pyridoxine hydrochloride	0.001	กรัม
Biotin	0.0005	กรัม
Malachite green	0.00025	กรัม

อาหาร Middlebrook 7H10 จะมีองค์ประกอบของสารต่างๆ เช่นเดียวกับอาหาร Middlebrook 7H9 แต่จะมีการเติมวุ้น ปริมาณ 15 กรัมต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร ลงไป โดยสารละลายที่ได้ไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

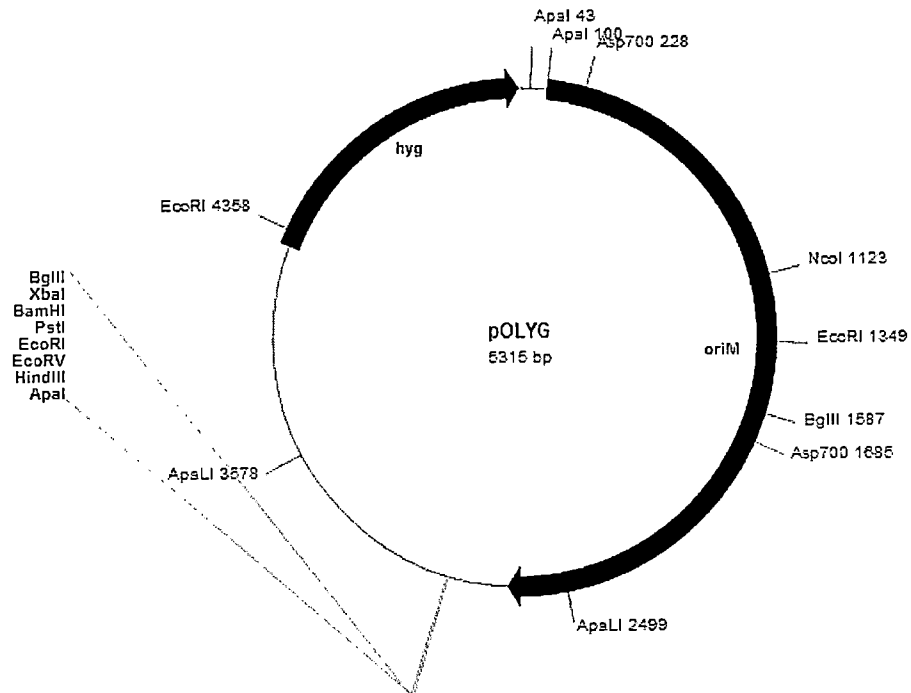
ส่วนประกอบ (1 ลิตร)

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม

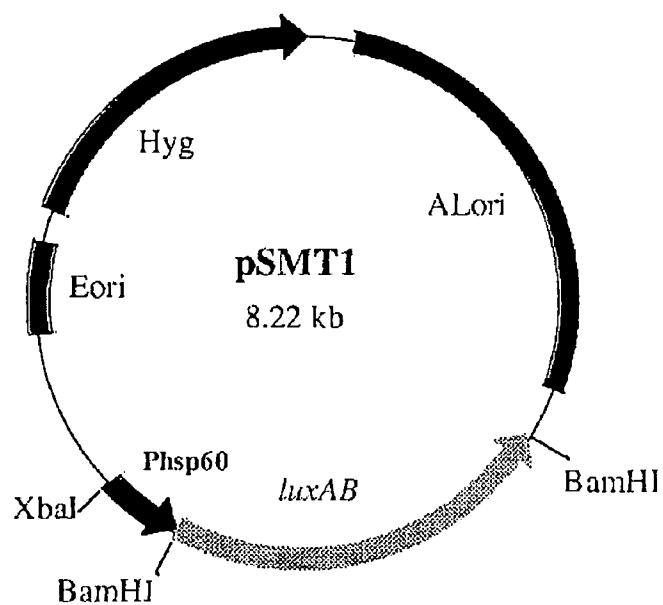
จากนั้นต้องทำการปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH โดยอาหารแข็ง LB จะมีองค์ประกอบของสารต่างๆ เช่นเดียวกับอาหารเหลว LB แต่จะมีการเติมวุ้น ปริมาณ 15 กรัมต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร ลงไป ซึ่งสารละลายที่ได้ไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

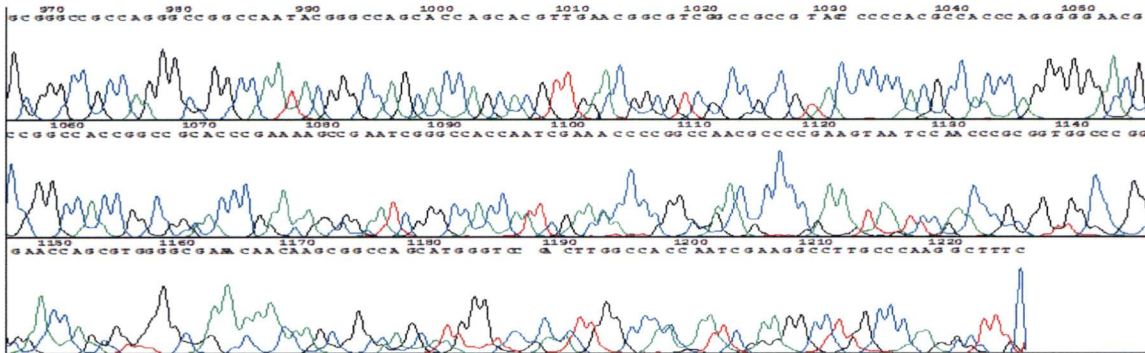
1. แผนที่ยีนของพลาสมิดดีเอ็นเอ pOLYG (Gaora et al., 1997)



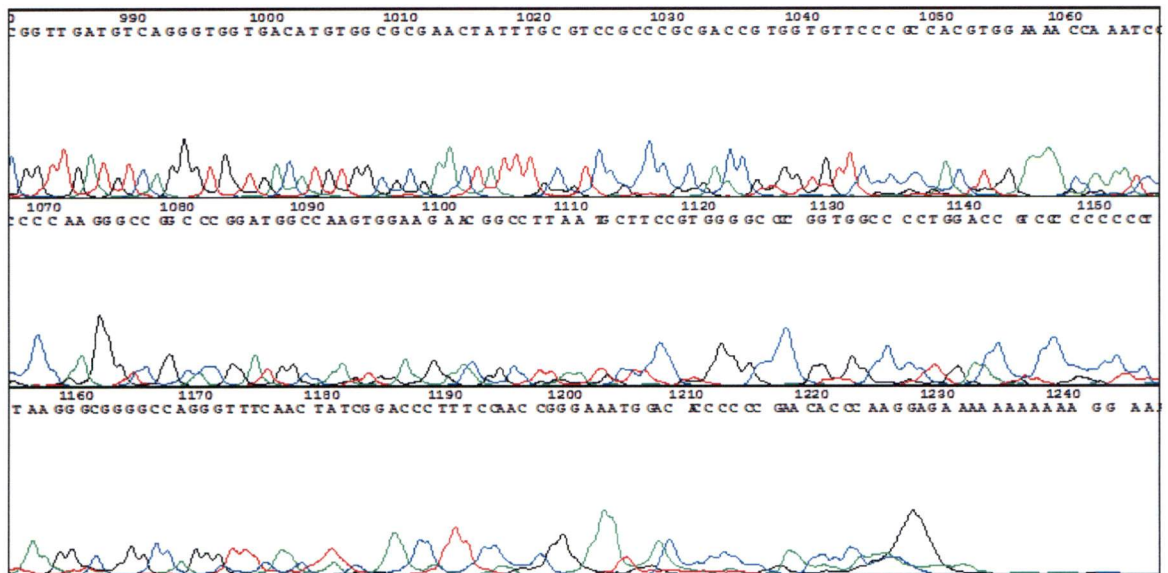
2. แผนที่ยีนของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 (Snewin et al., 1999)



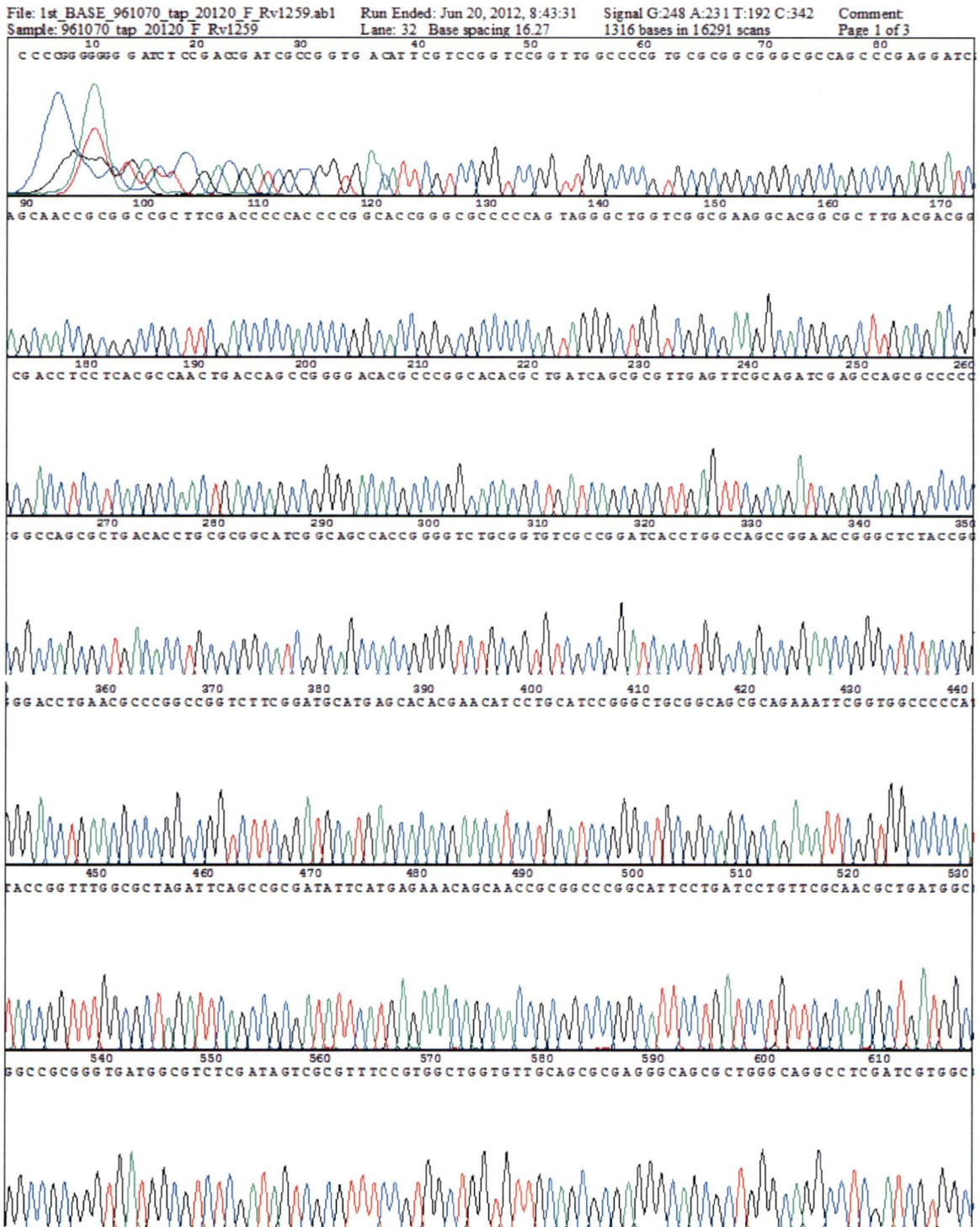
ภาคผนวก ค (ต่อ)

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* (ต่อ)

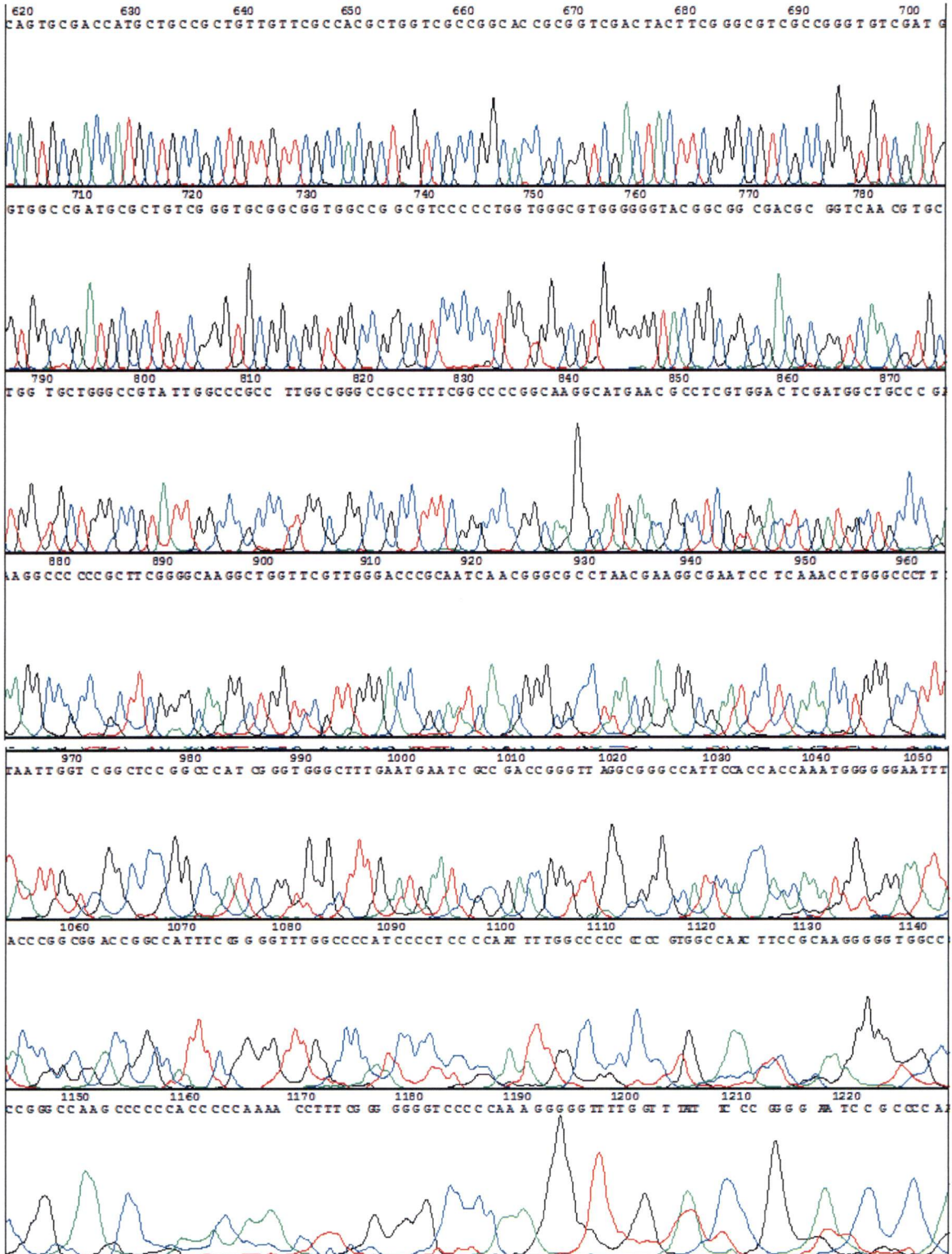
ภาคผนวก ค (ต่อ)

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gidB*

ภาคผนวก ค (ต่อ)

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tap*

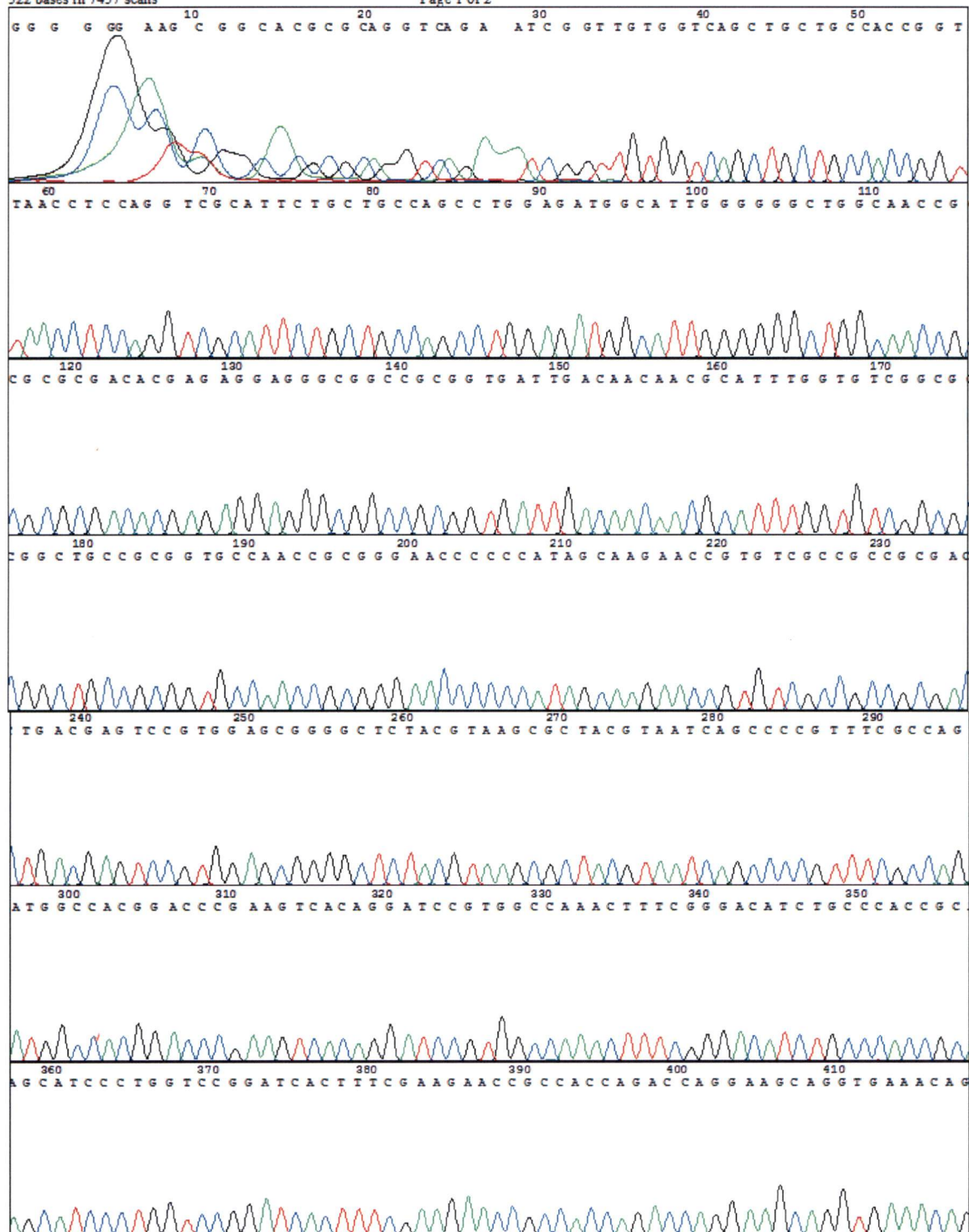
ภาคผนวก ค (ต่อ)

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tap* (ต่อ)

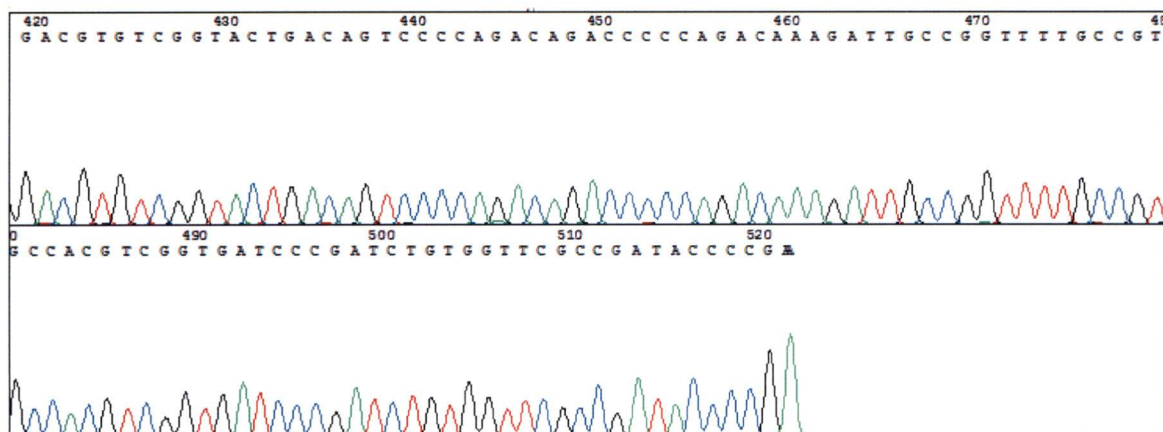
ภาคผนวก ค (ต่อ)

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 5' untranslated ของยีน *whiB7*

File: 1st_BASE_1180783_whiB7_15966_F_URT_whiB7.ab1 Run Ended: Mar 13, 2013, 2:36:16
 Signal G:383 A:348 T:240 C:437 Comment:
 Sample: 1180783_whiB7_15966_F_URT_whiB7 Lane: 19 Base spacing 14.76
 522 bases in 7457 scans Page 1 of 2



ภาคผนวก ค (ต่อ)

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 5' untranslated ของยีน *whiB7* (ต่อ)

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาวธัญญา พันธุ์พฤกษ์

เพศ ชาย หญิง วันเดือนปีเกิด 21 พฤศจิกายน 2512 อายุ 43 ปี

สถานภาพ โสด สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2534
วท.ม.	เทคโนโลยีทางชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2537
Dr. rer. nat	Biology/Botany	Philipps University, Marburg Germany	2542

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ชีววิทยาระดับโมเลกุลของมัยโคแบคทีเรียและไซยาโนแบคทีเรีย

เทคโนโลยีชีวภาพของสาหร่ายและไซยาโนแบคทีเรีย

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2537	รางวัลเรียนดี	มูลนิธิแถบনীลนิจิ

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2535-36	ทุนผลิตและพัฒนาอาจารย์	ทบวงมหาวิทยาลัย
2538-42	Deutscher Akademischer Austausch-Dienst (DAAD) Scholarship	DAAD, Germany
2544-45	Sustainable Use of Marine Microorganisms and Marine Natural Chemicals	JICA, Japan
2543-45	การศึกษายีน <i>betB</i> ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิด ทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	สวทช

2544-45	การค้นหายีนที่ผลิตไฮโดรจีเนสและการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสายยีสี่เขียวแกมน้ำเงิน โดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) และ Southern blot	คณะวิทย์ สจล.
2545-46	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hup</i> ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i>	คณะวิทย์ สจล.
2546-47	การตัดส่วนของยีน <i>hup</i> ในไซยาโนแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจน <i>Anabaena siamensis</i> เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2547-48	การศึกษาการส่งสัญญาณควอรัมเซนซิงจากแบคทีเรียในทะเล	คณะวิทย์ สจล.
2548-49	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไนโตรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i>	ส่งเสริมนักวิจัย คณะวิทย์ สจล.
2547-48	Cloning and functional characterization of squalene-hopene cyclase (SHC) from <i>M. tuberculosis</i>	Biotec
2549-50	การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนรีเวอร์สซิบิลไฮโดรจีเนสในไซยาโนแบคทีเรียชนิดทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	คณะวิทย์ สจล.
2549-50	การศึกษารีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอซิลโฮโมเซอรินแลคโตเนสของ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตและการส่งสัญญาณในแบคทีเรียแกรมลบ	บัณฑิตวิทยาลัย สจล.
2548-50	Molecular characterization of genes associated with resistant phenotype of Thai MDR-TB isolates	Drug resistant tuberculosis research fund, Siriraj Foundation
2550-51	การผลิตไบโอไฮโดรเจนพลังงานทดแทนแหล่งใหม่จากจุลสาหร่าย	คณะวิทย์ สจล.
2552-53	การคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพ	คณะวิทย์ สจล.
2553-54	สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายคลอเรลลาเพื่อผลิตไฮโดรเจน	คณะวิทย์ สจล.
2554-55	การประยุกต์ใช้น้ำทะเลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	คณะวิทย์ สจล.
2554-56	การตรวจหากลไกการดื้อยาในกลุ่ม Aminoglycoside ที่	งบรายได้ คณะวิทย์ สจล.

	ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค	
2555-56	การผลิตพลาสติกชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย	วช
2556-57	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i> โดยการตรึงเซลล์	คณะวิทย์ สจล.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

- Phunpruch S, Warit S, Suksamran R, Billamas P, Jaitrong S, Palittapongarnpim P, Prammananan T. 2013 A role for 16S rRNA dimethyltransferase (ksgA) in intrinsic clarithromycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 41: 548-551.
- Taikhao, S., Junyapoon S, Incharoensakdi A. and Phunpruch, S. 2013 Factors affecting biohydrogen production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology* 25(2):575-585.
- Prammananan T, Phunpruch S, Jaitrong S, Palittapongarnpim P. *Mycobacterium tuberculosis uvrC* essentiality in response to UV-induced cell damage. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2012; 43: 370-375.
- Nanasombat, S., Phunpruch, S. and Jaichalad, T. 2012 Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafood products for their potential use as starter cultures. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 34(3): 255-262.
- Junyapoon, S., Buala, W. and Phunpruch, S. 2011 Hydrogen production with *Escherichia coli* isolated from municipal sewage sludge. *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 16(1): 9-15.
- Nanasombat, S., Phunpruch, S., Sriwong, N., Jaichalad, T., Onnom, W. and Odthon, S. 2008 Characterization of the antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from raw fish and nham-plaa. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 42: 747-757.
- Prammananan, T., Cheunoy, W., Taechamahapun, D., Yorsangsukkamol, J., Phunpruch, S., Phdarat, P., Leechawengwong, M. and Chairprasert, A. 2008 "Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection." *Clin. Microbiol. Infect.* 14: 446-453.

- Phunpruch, S., Baebprasert, W., Thongpeng, C. and Incharoensakdi, A. 2006 "Nucleotide sequencing and transcriptional analysis of uptake hydrogenase genes in the filamentous N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" *Journal of Applied Phycology* 18: 713-722.
- Pramananan, T., Phunpruch, S., Tingtoy, N., Srimuang, S. and Chaiprasert, A. 2006 "Distribution of *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis patterns among *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand." *J. Clin. Microbiol.* 44(10): 3819-3821.
- Gutekunst, K., Phunpruch, S., Schwarz, C., Schuchart, S., Schulz-Friedrich, R. And Appel, J. 2005 "LexA regulates the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a transcription activator." *Mol. Microbiol.* 58(3): 810-823.
- Papsing, C. and Phunpruch, S. 2005 "Molecular cloning of the dinitrogenase genes in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" In : AgBiotech Graduate Conference II 16-17 May, 2005 Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand. p.131.
- Phunpruch, S., Thongpeng, C., Baebprasert, W. and Incharoensakdi, A. 2005 "Cloning, sequencing and expression of the uptake hydrogenase genes in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" In : 2nd National conference on algae and plankton, 23-25 March 2005, Holiday Garden hotel, Chaingmai, Thailand. p. OP1-12.
- Baebprasert, W. and Phunpruch, S. 2004 "The degradation of acyl homoserine lactone signal molecule of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27823 by the recombinant acyl homoserine lactonase enzyme." *Journal of Science Ladkrabang.* 13(2):22-37. (in Thai)
- Phunpruch, S. and Kamino, K. 2004 "Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*." *Kasetsart Journal (Nat. Sci.)* 38:21-28.
- Kutako, M., Powthongsook, S., and Phunpruch, S. 2004 "Batch and continuous cultivation of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 under heterotrophic condition." *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University (Section T)* 3:309-321. (in Thai)
- Phunpruch, S., and Baebprasert, W. 2003 "Isolation of quorum sensing-signal producing bacteria from seawater and artificial sponges collected at Laem Taen." *Suranaree J. Sci. Technol.* 10(4):307-316.

- Phunpruch, S. 2003 "Signaling and Communication of Bacterial Cells." Journal of Science Ladkrabang 12(1):36-43. (in Thai)
- Phunpruch, S. 2002 "Osmoprotective Substances in Cyanobacteria." King Mongkut's Agricultural Journal 20(2): 73-79. (in Thai)
- Phunpruch, S., Yagop, B., Poempoonpattana, P., Rodbamreo, P., and Incharoensakdi, A. 2002 "Screening of hydrogenase gene in cyanobacteria by polymerase chain reaction." Journal of Science Ladkrabang 11(1):22-34. (in Thai)
- Phunpruch, S. 2001 "Hydrogen from Cyanobacteria : A New Alternative Energy Source." Suranaree J. Sci. Technol. 8(4):247-252. (in Thai)
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmueller, K., and Schulz, R. 2000 "The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 works as an electron valve during photosynthesis." Arch. Microbiol. 173(5-6):333-338.

การเสนอผลงานวิชาการ

- Rattana, S., Junyapoon, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. Hydrogen production of the green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-O1 under heterotrophic conditions. In: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.114-120.
- Ongmali, R., Thawornchaisit, U. and Phunpruch, S. Lipid-accumulating capacity of bacteria isolated from a poultry processing wastewater. In: The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. 4-6 October, 2010. Pattaya, Thailand. p.121-126.
- Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and Phunpruch, S. Effect of sulphate and nitrate limitations on hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Commission on Higher Education Congress III-University Staff Development Consortium. 9-11 September, 2010. Royal Cliff Grand Hotel and Spa, Pattaya, Thailand. p.364.PD-27
- Phunpruch, S., Taikhao, S. and Incharoensakdi, A. Hydrogen production of a halophilic unicellular cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: Cyanobacteria&Algae Biotechnology Symposium. 31 March, 2010. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. p.13
- Suksamran, R., Prammananan, T., Warit, S. and Phunpruch, S. Study of transposon localization on genome of macrolide-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mutants. In: The 11th Graduate Research Conference. 12 February 2010. Khon Kaen, Thailand. 907-915.

- Taikhao, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular halophilic cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.47.Hy3O1
- Rattana, S., Incharoensakdi, A. and **Phunpruch, S.** Hydrogen production of a unicellular green alga *Chlorella vulgaris var. vulgaris* TISTR8261. In: The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference on Lactic Acid Bacteria in Thai Food and Feed Industries and The 2009 Asian Bio-Hydrogen Symposium. 26-28 August, 2009 Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand. p.146.Hy3P1
- Phunpruch, S.**, Baebprasert, W., Ratanajaraya, C. and Thongpeng, C. 2004 "Use of the expression recombinant enzyme lactonase from *Agrobacterium tumefaciens* for the study of growth and signaling in gram-negative bacteria." In : "The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference", Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.143-151. (in Thai)
- Phunpruch, S.** and Kamino, K. 2004 "Study on the acyl-homoserine lactone production of a gram-negative bacterium *Sphingomonas xenophaga* by co-cultivation with *Variovorax paradoxus*." In : "The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference", Kasetsart University, Bangkok, 3-6 February 2004, p.332-341.
- Baebprasert, W., Thongpeng, C., and **Phunpruch, S.** 2003 "Quorum sensing signal producing bacteria isolated from seawater and artificial sponges collected in Thailand." In : "BioThailand2003", PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.244.
- Phunpruch, S.** and Kamino, K. 2003 "Utilization of quorum sensing signal degrading enzyme from *Variovorax paradoxus* in the gram-negative bacterial population control." In : "BioThailand2003", PEACH, Pattaya, 17-20 July 2003, p.212.
- Kutako, M., Powtongsook, S., **Phunpruch, S.** and Tantiwaranurak, C. 2002 "Heterotrophic Growth of a Marine Diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in Batch Cultivations." In : The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology 12-15 November, 2002 Hotel Sofitel Orchid, Khon Kaen, Thailand. p.42. (in Thai)
- Kutako, M., Powtongsook, S., and **Phunpruch, S.** 2002 "Effects of organic nutrient sources, glucose and aeration on heterotrophic growth of a marine diatom *Amphora delicatissima* AM9901 in dark cultivation" In : 28th Congress on Science and

Technology of Thailand 24-26 October 2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand. p.13-36-O (in Thai)

- Appel, J., **Phunpruch, S.**, Steinmueller, K., and Schulz, R. 1999 "The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 is functioning as an electron valve during photosynthesis." In : "IV European workshop on the molecular biology of cyanobacteria", Humbolt-University, Berlin, 15-17 September 1999
- Appel, J., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1998 "Hydrogenase(s) in *Synechocystis*: Tools for photohydrogen production?" In : "BioHydrogen Proceedings of the International Conference on Biological Hydrogen Production", Kona, Hawaii, USA, 23-26 July 1997, Zaborsky, O.R. (ed.), Plenum Press, New York, London, p.189-196.
- Schulz, R., Appel, J., **Phunpruch, S.**, Stangier, K., and Wuenschiers, R. 1998 "Biotechnological approach for future use of solar energy: Photohydrogen production by the green *alga Scenedesmus obliquus* and the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." In : "Hydrogen Energy Progress XII Proceeding of the 12th World Hydrogen Energy Conference", Buenos Aires, Argentina, 21-26 July 1998, Vol. III, Bolcich, J.C., and Veziroglu, T.N. (eds.), p.2069-2078.
- Wuenschiers, R., Appel, J., Stangier, K., **Phunpruch, S.**, and Schulz, R. 1996 "Investigations to apply biologically produced photohydrogen as a future energy source." In : "Biomass for energy and the environment Proceedings of the 9th European bioenergy conference", Vol. III, Chartier, P., Ferrero, G.L., Henius, U.M.m Hultberg, S., Sachau, J., and Winblad, M (eds), Pergamon, Elsevier Science, Oxford, New York, Tokyo, p.1668-1673.
- Incharoensakdi, A., and **Phunpruch, S.** 1996 "Environmental factors affecting the beta-carotene content in *Spirulina platensis*." In : "Proceedings of the 3rd Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology : Issues and Choices", Melia Hotel, Prachuabkhirikhan, 10-15 November 1996, p.587-592.

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางอังคณา ฉายประเสริฐ

เพศ ชาย หญิง วันเดือนปีเกิด 12 กันยายน 2495 อายุ 60 ปี

สถานภาพ โสด สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (เกียรตินิยม)	พฤกษศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2516
วท.ม.	พฤกษศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2519
Dr. rer. nat	Biology	Ruhr University, Bochum, Germany	2526

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) จุลชีววิทยาของราและมัยโคแบคทีเรีย

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2536	Excellent Preclinical Research on the title "Induction of zoospore formation in Thai isolates of <i>Pythium insidiosum</i> ."	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2543	Appreciate Prize in Medicine and Public Health, Thailand Research Council for the Invention of Detection of <i>M. tuberculosis</i> DNA by PCR-kit.	สภาวิจัยแห่งชาติ
2546	Received Excellent Prize in Medicine and Public Health, Thailand Research Council for the Invention of Identification kit for <i>M. tuberculosis</i> by Multiplex PCR.	สภาวิจัยแห่งชาติ
2546	รางวัลบุคลากรดีเด่นคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2551	ได้รับรางวัลจากทุนเจ้าพระยาพระเสด็จสุเรนทราธิบดี ประจำปีการศึกษา 2551 ภาควิชาจุลชีววิทยา	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

	อาจารย์ดีเด่นทางปรีคลินิก	
2552	ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นทางปรีคลินิก เรื่อง Molecular analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> from tuberculous meningitis patients in Thailand”	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2553	ได้รับรางวัลชมเชย ผลงานวิจัยดีเด่นทางปรีคลินิก เรื่อง Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multi-drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates from Siriraj Hospital, Thailand	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2522-26	Deutscher Akademischer Austausch-Dienst (DAAD) Scholarship	DAAD, Germany
2529-31	Preliminary investigation on evaluation the use of serological techniques as an aid in antemortem diagnosis of aspergillosis	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2531	Compare studies on mycobacterial DNA from strains which are sensitive and some which are resistant to antituberculosis drugs and construction of DNA-library of <i>M. tuberculosis</i>	มหาวิทยาลัยมหิดล
2532	Construction of DNA probes for detection of <i>M. tuberculosis</i> directly from clinical specimens and culture media	มหาวิทยาลัยมหิดล
2533-35	Development of a PCR technique for detection of <i>M. tuberculosis</i> DNA directly from clinical specimens	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2534-36	Biological and molecular characterization of <i>Pythium insidiosum</i> the etiologic agent of human pythiosis	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2537-38	PCR fingerprinting for strain typing of <i>Cryptococcus neoformans</i>	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

2537-39	Development and assessment of a diagnostic kit for direct detection of <i>M. tuberculosis</i> from clinical samples in clinical microbiology laboratory using the polymerase chain reaction (PCR) technique	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2538-40	Cutaneous mycobacterial infection: Molecular diagnosis and appropriate treatment regimens	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2538-39	Immunodiffusion test for diagnosing <i>Penicilliosis marseffei</i> and PCR fingerprinting for strain typing of <i>Penicillium marseffei</i>	องค์การอนามัยโลก
2539-40	Assessment of a PCR technique for diagnosing and monitoring cryptococcosis	Jansen Research Council Thailand
2539-40	Screening for antimycobacterial activity of natural substances	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2542-43	Clinical efficacy of lemon grass oil cream in treatment of ringworm	มหาวิทยาลัยมหิดล
2542-43	Development and assessment of rapid drug susceptibility test of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	มหาวิทยาลัยมหิดล
2540-43	Collection, phenotypic and genotypic characterization of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strains in Thailand	Thailand Tropical Disease Research (T-2)
2544-45	<i>In vitro</i> antifungal susceptibility and genotypes of clinical isolated <i>Candida</i> spp. from patients with candidemia, oral candidiasis and candida vaginitis	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2544-46	Identification of nontuberculous mycobacteria in AIDS patients: Molecular and phenotypic methods including drug susceptibility tests	ทบวงมหาวิทยาลัย
2546-48	Molecular typings and phylogeny of <i>Pythium insidiosum</i>	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2548	Assessment of WATERLIFE system in killing	LICC Co.,Ltd.

	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37Rv), <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus</i> sp. and <i>Candida albicans</i> in water	
2547-49	Tuberculosis susceptibility genes in Thai ethnics	TB/HIV Res. Center and from Thai NIH, Research Institute, International Medical Center of Japan
2547-48	การตรวจหา <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ในช้างเลี้ยงเอเชีย	สภาวิจัยแห่งชาติ
2547-48	Development of One-tube Multiplex PCR for detection of Rifampicin resistant <i>M. tuberculosis</i>	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2548-50	Drug tolerance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> from Northern Thailand	RIT, Japan
2547-50	Intracellular pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-tuberculous chemotherapy in relation to expression of human ABC transporters	Welcome Trust
2549-50	การติดเชื้อมากกว่า 1 สายพันธุ์ในผู้ป่วยวัณโรค (Multiple infection with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain in active tuberculosis patients)	คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี
2549-51	Molecular identification and phylogeny of rapid grower mycobacteria from Siriraj and Ramathibodi Hospitals	มหาวิทยาลัยมหิดล
2550-51	Surveillance of pyrazinamide susceptibility among <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates from Siriraj Hospital	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2549-52	Deciphering clarithromycin resistance mechanism in <i>M. tuberculosis</i>	มหาวิทยาลัยมหิดล
2551-52	Evaluation of macroarrays for identification of multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	วช.

2551-54	Determination of virulent-related <i>M. tuberculosis</i> strains isolated from cerebrospinal fluid	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2548-55	Molecular characterization of genes conferring resistance to antituberculous drugs of Thai MDR-TB isolates	Drug-Resistant Research Fund, Siriraj Foundation Under The Patronage To pass Her Royal Highness Princess Galyani Vadhana
2552-55	TMC 207 in subjects with sputum smear positive pulmonary infection with multi-drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	Janssen Cilag, Thailand
2553-55	Development of high throughput detection method of MDR & XDR-TB using DigiTag 2 assay	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2553-55	Identification adhesive material during encystment of zoospores and gene (s) conferring growth at 37 °C of <i>Pythium insidiosum</i> and determination of protease in <i>P. insidiosum</i> Thai isolates	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2553-55	Analysis of heterogeneity among <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing genotype isolated from CSF and development of tuberculous meningitis	มหาวิทยาลัยมหิดล
2553-55	Development multiplex allele-specific polymerase chain reaction for rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)	วช.
2553-57	MAS-PCR rapid screening test for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)	NIAID, NIH, USA
2555-57	Nucleic acid lateral flow test for point of care diagnosis of TB complex and multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-58	DNA chip for identification and typing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using DigiTag platform	NSTDA-JST

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

1. Imwidthya S, **Chaiprasert (Plangpatanapanichya) A**, Thasnakorn P. Antifungal activity of garlic extract. Bull Fac Med Tech, Mahidol Univ. 1978; 2: 68-78.
2. Imwidthya S, **Chaiprasert (Plangpatanapanichya) A**, Sripathomswat N. *Basidiobolus* in Toad's excreta in Thailand. J Med Ass Thailand 1982; 8: 420-5.
3. Bunnag C, Dhorrarintra B, **Chaiprasert (Plangpatanapanichya) A**. The incidence of airborne molds and the relationship with skin sensitivity test: Siriraj Hosp Gaz 1982; 34: 883-90. (Thai with English abstract).
4. Bunnag C, Dhorrarintra B, **Chaiprasert (Plangpatanapanichya) A**. A comparative study of the incidence of indoor and outdoor mold spores in Bangkok, Thailand. Annals of Allergy 1982; 48: 333-9.
5. **Chaiprasert A**, Skulchan V, Imwidthya S, Disthaprasop P. Oral-Yeasts' incidence of normal people and patients with oral carcinoma: Siriraj Hosp Gaz 1985; 37(6): 429-33.
6. Imwidthya S, Anukarahanonta T, Komolpis P, **Chaiprasert A**. Bacterial, fungal and Aflatoxin contamination of medicinal herbs, spices and curry in Bangkok. Siriraj Hosp Gaz 1987; 39: 27-36.
7. **Chaiprasert A**, Stahl U, Esser K. Life cycle, meiotic recombination and unilateral gene transfer in methanolotrophic yeast of the Genus *Pichia*. Appl Microbiol Biotechnol 1987; 27: 265-71.
8. Imwidthya S, Anukarahanonta T, Komolpis P, **Chaiprasert A**. Microbial contamination in some common fresh and preserved foods in Bangkok. J Med Ass Thailand 1987; 70: 464-7.
9. Chaisilwattana P, Roongpisuthipong A, Bhiraleus P, **Chaiprasert A**. Three-day therapy of vulvovaginal candidosis with econazole. J Med Ass Thailand 1987; 70: 498-500.
10. Voramist C, **Chaiprasert A**, Charoenratanakul S, Banchuin N, Thasnakorn P. Local-made ID-test set for detection of aspergillosis. J Infect Dis Antimicrob Agents 1989; 6: 136-43.
11. **Chaiprasert A**. Samerpitak K, Wanachiwanawin W, Thasnakorn P. Induction of zoospore formation in *Pythium insidiosum* sp. nov. de Cock Thai isolates. Mycoses 1990; 33: 317-23.
12. Tanphaichitr VS, **Chaiprasert A**, Suvatte V, Thasnakorn P. Subcutaneous mucormycosis caused by *Saksenaea vasiformis* in a thalassaemic child: first case report in Thailand. Mycoses 1990; 33: 303-9.
13. Triratana S, **Chaiprasert A**. Sexuality of *Ganoderma lucidum*. in Science and Cultivation of Edible Fungi. edited by Maher MJ. 1991: 57-63.

14. Charoenratanakul S, **Chaiprasert A**, Voramist C, Tripinyopap N, Bovornkitti S. Serum precipitins in pulmonary aspergillosis: preliminary results. *The Ceylon Medical J* 1992; 37: 81-2.
15. **Chaiprasert A**. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA probe and DNA amplification. *Siriraj Hosp Gaz* 1992; 44: 476-82. (review in Thai)
16. Chetchotisakd P, Pornaveevudhi O, Mairiang P, Patjanasoonorn B, **Chaiprasert A**, Pairojkul C, Sathapatayavongs B, Nuntirooj K, Saew OT, Haswell-Elkins MR. Human pythiosis in Srinagarind Hospital: One year's experience. *J Med Assoc Thai* 1992; 75(4): 248-54.
17. ไพบูลย์ สุริยวงษ์ไพศาล, อังคณา ฉายประเสริฐ, อมร ลีลารัศมี, การวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคเยื่อหุ้มสมองแบบใหม่. *คลินิก* 2535; 8(7): 456-60.
18. Charoenratanakul S, **Chaiprasert A**, Sero-diagnosis of pulmonary aspergillosis. *Ceylon Med J* 1992; 87-9.
19. Wanachiwanawin W, Thianprasit M, Funcharoen S, **Chaiprasert A**, Sudasna Na Ayudhya N, Sirithanaratkul N, Piankijagum A. Fatal arteritis due to *Pythium insidiosum* infection in patients with thalassemia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 87: 296-8. (Impact: 01.665)
20. Charoenratanakul S, Dejsomritrutai W, **Chaiprasert A**. Diagnostic role of fiberoptic bronchoscopy in suspected smear negative pulmonary tuberculosis. *Respiratory Medicine* 1995; 89: 621-3. (Impact: 01.663)
21. Prabhasawat P, Pornpanich K, Dulayajinda D, **Chaiprasert A**. *Nocardia asteroides* ulcerative keratitis in Siriraj Hospital. *Thai J Ophthalmol* 1995; 9: 31-42.
22. Wisuthsarewong W, Veerakul G, **Chaiprasert A**, Viravan S. Primary cutaneous *Rhizopus* infection in leukemic patient. *Siriraj Hosp Gaz* 1995; 47(S): 149-53.
23. Lapayawichit P, Rienthong S, Rienthong D, Chuchottaworn C, **Chaiprasert A**, Panbangred W, Saringcarinkul H, Palittapongarnpim P. Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77: 257-63.
24. Charoenratanakul S, **Chaiprasert A**, Yenchitsomanas P, Pattanakitsakul S, Jearanaisilavong J, Dejsomritrutai W. Clinical utility of the polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage in the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis. *Thai J Tuberc Chest Dis* 1996; 17: 1-9.
25. Pongrapeeporn KS, Jearanaisilavong J, **Chaiprasert A**, et al. Rapid growing mycobacteria possess at least two copies of rRNA gene. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 1996; 4: 43-7.
26. Thianprasit M, **Chaiprasert A**, Imwidthaya P. Human pythiosis. *Curr Top Med Mycol* 1996; 7: 43-54.

27. Pariyachatigul C, **Chaiprasert A**, Meevootisom V, Pattanakitsakul S. Assessment of a PCR technique for the detection and identification of *Cryptococcus neoformans*. J Med Vet Mycol 1996; 34: 251-8. (Correspondence)
28. **Chaiprasert A**, Prammananan T, Samerpitak K. *et al.* Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by reamplification with 16S rRNA-based primer. As Pac J Mol Biol Biotechnol 1996; 4: 250-9.
29. Tripinyopap N, **Chaiprasert A**. Home-made *Aspergillus* antigens and antisera for serodiagnosis of aspergillosis. Med J Srinakharinwirot 1996; 3: 67-74.
30. Wisuthsarewong W, **Chaiprasert A**, Viravan S. Outbreak of tinea capitis caused by *Microsporum ferrugineum* in Thailand. Mycopathologia 1996; 135: 157-61. (Impact: 1.05; 1994)
31. Tripinyopap N, **Chaiprasert A**, Charoenratanakul S. Diagnosis of aspergillosis by double immunodiffusion method with home-made *Aspergillus* antigens and antisera. Med J Srinakharinwirot 1997; 4: 7-11.
32. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Sivayathorn A, Suthipinittharm P, Boonchai W, Na-Ubol P. Etiologic agents of cutaneous infectious granulomas: 2 Year-experience from granuloma clinic, Siriraj Hospital. Siriraj Hosp Gaz 1997; 49: 980-7.
33. Imwidthaya P, Sethakorn C, **Chaiprasert A**, Sutthent R, Pongvarin N. *Cryptococcus neoformans* in Siriraj Hospital 1994-1995. Siriraj Hosp Gaz 1997; 49: 1145-52.
34. Promkiamon B, Chierakul N, Pushpakom R, Suttinont P, **Chaiprasert A**, Ong-ajyooth S. Comparison of various diagnostic tests in tuberculous pleuritis. Thai J Tuberc Chest Dis 1997; 19: 223-7.
35. Suwanagool S, Kolladarungkri T, Leelarasamee A, Chuenarom V, Jearanaisilavong J, **Chaiprasert A**. Prolonged fever due to *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease in advanced HIV infection: a public health concern. J Med Assoc Thai 1998; 81(11): 893-905.
36. **Chaiprasert A**, Leelarasamee A. Microbiology of clinically important environmental mycobacteria. J Infect Dis Antimicrob Agents 1999; 16: 29-40.
37. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Sivayathorn A, Khemgern S. Deep fungal and higher bacterial skin infections in Thai: clinical manifestations and treatment regimens. Int J Dermatol 1999; 38: 279-84. (Impact: 0.676; 1997)
38. Srimuang S, Prariyachatigul C, **Chaiprasert A**, Rungsipanurath W, Tanphaichitra D. *In vitro* activities of amphotericin B in combination with other antifungal agent or rifampin against yeast and yeast-like organisms. J Antimicrob Chemother 1999, 44 (Suppl A): 50. (Impact: 2.33; 1997)
39. Sitthiwong W, Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Manonukul J. Chronic subcutaneous zygomycosis: report of cases with good response to cotrimoxazole. Thai J Dermatol, 1999: 154-61.

40. Srimuang S, Prariyachatikul C, **Chaiprasert A**, Rungsipanurath W, Tanphaichitra D. Antifungal drug combinations for *Cryptococcus neoformans* and *Prototheca* spp. J Med Assoc Thai 2000; 83: 57-60.
41. Chierakul N, **Chaiprasert A**, Arjratanakool W, Tingtoy N. Is it worth performing susceptibility tests in new pulmonary tuberculosis patients. Thai J Tuberc Chest Dis 2000; 22: 177-81.
42. Imwidthaya P, Thipsuvan K, **Chaiprasert A**, Danchaiwijitra S, Sutthent R, Jearanaisilavong J. *Penicillium marneffe*: types and drug susceptibility. Mycopathol 2001; 149: 109-15. (Impact: 0.364; 1999)
43. Chetchotisakd P, Mootsikapan P, Anunnatsiri S, Jirarattanapochai K, Choonhakarn C, **Chaiprasert A**, Na Ubol P, Wheat LJ, Davis TE. Disseminated infection due to rapidly growing mycobacteria in immunocompetent hosts presenting with chronic lymphadenopathy: a previously unrecognized clinical entity. Clin Infect Dis 2001; 30: 29-34. (Impact: 3.199; 1999)
44. Gengvinij N, Pattanakitsakul S, Chierakul N, **Chaiprasert A**. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens using one-tube nested PCR. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 2001; 32: 114-25.(Correspondence: Angkana Chaiprasert)
45. Choekhepaibulkit K, Veerakul G, Vanprapar N, **Chaiprasert A**, Tanphaichitr V, Chearskul S. Penicilliosis-associated hemophagocytic syndrome in a human immunodeficiency virus-infected child: The first case report in children. J Med Assoc Thai 2001; 84: 426-9.
46. Damrongchokpipat P, Chierakul N, **Chaiprasert A**, Thipsuvan K. Serological diagnosis of tuberculosis pleuritis. Thai J Tuberc Chest Dis 2001; 22: 82-7.
47. Chierakul N, Damrongchokpipat P, **Chaiprasert A**, Arjratanakul W. Antibody detection for the diagnosis of tuberculous pleuritis. Int J Tuberc Lung Dis. 2001; 5: 968-72. (Impact: 1.628; 1999)
48. Chierakul N, **Chaiprasert A**, Tingtoy N, Arjratanakul W, Pattanakitsakul S. Can serial qualitative polymerase chain reaction monitoring predict outcome of pulmonary tuberculosis treatment. Respirology 2001; 6: 305-9. (Impact: 01.264; 2005)
49. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Soontorntanasart T, Linpiyawan R, Muenprasat C, Hauhan P. Clinical efficiency of lemon grass oil cream in treatment of ring worm. Siriraj Hosp Gaz 2001; 53: 647-51.
50. Thamlikitkul V, Trakulsomboon S, Louisirotchanakul S, **Chaiprasert A**, Foongladda S, Thipsuvan K, Arjratanakool W, Kunyok R, Wasi C, Santiprasitkul S, Danchaiwijit S, Microbial killing activity of peracetic acid. J Med Assoc Thai 2001; 84: 1375-82.
51. Waywa D, Kongkriengdaj S, Chaidatch S, Tiengrim S, Kowadisaiburana B, Chaikachonpal S, Suwanagool S, **Chaiprasert A**, Curry A, Bailey W, Suputtamongkol

- V, Beeching NJ. Protozoan enteric infection in AIDS related diarrhea in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2001; 32 suppl 2: 151-5.
52. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Rongrungrung Y, Manonukul J, Churojana A, Senawong S, Sawadiampiraks P, Suthipinittharm P. Disseminated penicilliosis marneffei in immuno-competent hosts. Siriraj Med J 2001; 52(9): 608-12.
53. Chierakul N, **Chaiprasert A**, Arjatanakool W, Tingtoy N. How significant is the positive sputum smear during pulmonary tuberculosis treatment. Thai J Tuberc Chest Dis 2002; 23: 37-40.
54. Foongladda S, Haouharn P, Sakulmaiwatana P, **Chaiprasert A**. Comparative evaluation of Candi *Select* test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. Mycoses 2002; 45: 75-8. (Impact: 1.708; 2000)
55. Phongsamart W, Chokephaibulkit K, **Chaiprasert A**, Vanprapa N, Chearskul S, Lolekha R. *Mycobacterium avium* complex in HIV-infected Thai children. J Med Assoc Thai. 2002; 85 Suppl 2: S682-9.
56. Ratanasuwan W, Techasathit W, Chuenarom V, Suwanagool S, Anekthananont T, Jearanaisilavong J, **Chaiprasert A**. Infection due to nontuberculous *Mycobacterium* other than MAC in AIDS patients at Siriraj hospital during 1998-2000: saprophyte vs pathogen. J Med Assoc Thai. 2002; 85(8): 886-93.
57. Piyophiprapong S, Linpiyawan R, Mahaisavariya P, Muanprasart C, **Chaiprasert A**, Suthipinittharm P. Cutaneous protothecosis in an AIDS patient. Br J Dermatol 2002; 146: 713-5. (Impact: 2.214; 2000)
58. Keerasuntonpong A, Sitaposa P, **Chaiprasert A**, Thamlikitkul V. Efficiency of the glutaraldehyde test strip for monitoring the concentration of glutaraldehyde in reused solutions for disinfecting endoscopes. J Med Assoc Thai. 2002; 85: 1164-8.
59. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Manonukul J, Khemngern S. Scrofuloderma and Sweet's syndrome. Int J Dermatol 2002; 41: 28-31. (Impact: 0.0869; 2000)
60. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjatanakul W, Chuchottaworn C, **Chaiprasert A**, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2002; 6: 1118-22. (Impact: 2.011; 2000)
61. Srisaimanee N, **Chaiprasert A**, Gengvinij N, Kunakorn M, Prayoonwiwat N. Evaluation of in-house optimized semi-nested PCR and EIA for direct detection of mycobacterial DNA in CSF. Asian Pac J Allerg Immunol 2002; 20(4): 267-77. (Correspondence: Angkana Chaiprasert) (Impact: 0.381; 2001)
62. Lolekha R, Phongsamart W, Chokephaibulkit K, **Chaiprasert A**, Vanprapa N, Chearskul S. *Cryptococcus neoformans* infection in Thai children: Siriraj Hospital during 1996-2000. Thai J Pediatr 2002; 41: 16-24.

74. Prammananan T, Arjratanakool W, **Chaiprasert A**, Leechawengwong M, Asawapokee N, Leelarasamee A, Dhiraputra C. Second-line drug susceptibilities of Thai multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(2): 216-9. (Impact: 01.456,Correspondence: Angkana Chaiprasert) (Impact: 1.634; 2003)
75. Cheunoy W, Prammananan T, **Chaiprasert A**, Foongladda S. Comparative evaluation of PCR-restriction enzyme analysis: two amplified targets, *hsp65* and *rpoB*, for identification of cultured mycobacteria. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 165-71. (Impact: 02.032; 2003)
76. Rienthong D, Ajawatanawong P, Rienthong S, Smithtikarn S, Akarasewi P, **Chaiprasert A**, Palittapongarnpim P. Restriction fragment length polymorphism study of nationwide samples of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand, 1997-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9(5): 576-81. (Impact: 1.634; 2003)
77. Prammananan T, Cheunoy W, Na-Ubol P, Tingtoy N, Srimuang S, **Chaiprasert A**. Evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis for routine identification of mycobacteria: accuracy, rapidity, and cost analysis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2005; 36: 1252-60. (Correspondence: Angkana Chaiprasert)
78. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Manonukul J, Khemngern S, Tingtoy N. Detection and identification of *Mycobacterium* species by polymerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. *J Med Assoc Thai* 2005; 88(1): 108-13.
79. Wisuthsarewong W, **Chaiprasert A**. Treatment of tinea capitis caused by *Microsporum ferrugineum* with itraconazole. *J Med Assoc Thai* 2005; 88; Suppl 8: S72-9.
80. Ngamskulrunroj P, Boonruangsri P, **Chaiprasert A**. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to non-toxic level ozone. *Siriraj Med J* 2006; 58: 592-4.(Correspondence: Angkana Chaiprasert)
81. Krajaejun T, Kunakorn M, Prachartam R, Chongtrakool P, Sathapatayavongs B, **Chaiprasert A**, Vanittanakom N, Chindamporn A, Mootsikapun P. Identification of a novel 74-Kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5); 1674-80. (Impact: 3.445; 2006)
82. **Chaiprasert A**, Yorsangsukkamol J, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C. Intact *pks 15/1* in Non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 772-4. (Impact: 05.643; 2004, 50%,Correspondence: Angkana Chaiprasert)
83. **Chaiprasert A**, Prammananan T, Tingtoy N, Na-Ubol P, Srimuang S, Samerpitak K, Rangspanurath W. One-tube multiplex PCR method for rapid identification of

- Mycobacterium tuberculosis*. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 2006; 37: 494– 502. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
84. Prammananan T, Phunpruch S, Tingtoy N, Srimuang S, **Chaiprasert A**. Distribution of *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis patterns among *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand. J Clin Microbiol 2006; 44: 3819-21. (Impact: 03.439; 2004, 50%, Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 85. Wanachiwawin D, Piankijagum A, **Chaiprasert A**, Lertlaituan P, Tungtrongchitr A, Chinabutr P. Case report *Ganoderma lucidum*: A cause of pseudoparasitosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37; 1099-102.
 86. Pumpradit W, Ariyoshi K, Petkanchanapong W, Wichukchinda N, **Chaiprasert A**, Rojanawat A, Sawanpanyalert P, Pathipranich P. *Mycobacterium avium* and *Burkholderia pseudomallei* (Meliodosis) coinfection in and HIV-positive patient. Asian Pac J Allergy Immunol 2006 Dec; 24(4): 239-43. (Impact: 0.277; 2003)
 87. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwawin W, **Chaiprasert A**, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, Somkaew S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006; 43(5): 569-76. (Impact: 5.594; 2004)
 88. Pannanusorn S, **Chaiprasert A**, Prariyachatigul C, Krajaejun T, Vanittanakom N, Chindamporn A, Wanachiwawin W, Satapatayavong B. Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; 38(2); 383-91.(Correspondence: Angkana Chaiprasert)
 89. Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, Yorsangsukkamol J, Phunpruch S, Phdarat P, Leechawengwong M, **Chaiprasert A**. Distribution of *rpoB* mutations among MDRTB strains from Thailand and development of a rapid method for detection mutation. Clin Microbiol Infec Dis 2008; 14: 446-53. (Impact factor 3.257; 2006) (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 90. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, **Chaiprasert A**, Srimuang S. Do you know human pythiosis?. J Infect Dis Antimicrob Agent 2008; 25: 45-51.
 91. Ngamskulrungraj P, Sorrell TC, Chindamporn A, **Chaiprasert A**, Poonwan N, Meyer W. Association between fertility and molecular sub-type of global isolates for *Cryptococcus gattii* molecular type VGII. Med Mycol 2008; 46: 665-73.(Impact factor 2.005; 2006)
 92. Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summananpan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, **Chaiprasert A**, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K,

- Sawanpanyalert P, Keicho N. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun* 2008; 1: 1-7.
93. Prammananan T, **Chaiprasert A**, Leechawengwongs M. *In vitro* activity of linezolid against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant (XDR-TB) isolates. *Intern J Antimicrobial Agents* 2009; 33: 190-191 (Impact factor 2.221; 2006) (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 94. Chaiprasert A. Future Trend in Laboratory Diagnosis of Tuberculosis. *Siriraj Med J*. Jan-Feb 2009; 61(1): 45-8.
 95. Yorsangsukkamol J, **Chaiprasert A**, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Limsoontarakul S, Prayoonwiwat N. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculous meningitis patients in Thailand. *Tuberculosis* 2009; 89: 304-9. (impact factor 1.758; 2008) (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 96. Cheunoy W, Haile M, **Chaiprasert A**, Prammananan T, Cristea-FernstrÖm M, Vondracek M, Chryssanthou E, Hoffner S, Petrini B. Drug resistance and genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Thai Tuberculosis patients. *APMIS* 2009; 117: 286-290. (impact factor 1.316 :2008)
 97. **Chaiprasert A**, Krajaejun T, Pannanusorn S, Prariyachatigul C, Wanachiwanawin W, Sathapatayavong B, Juthayothin T, Smittipat N, Vanittanakom N, Chindamporn A. *Pythium insidiosum* Thai isolates: molecular phylogenetic analysis. *Asian Biomedicine* 2009; 623-33. (Impact Factor 0.872; 2008) (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 98. Boonaiam S, **Chaiprasert A**, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 396-9. (impact factor 4.014; 2009) (Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
 99. Thong-On A, Smittipat N, Juthayothin T, Yanai H, Yamada N, Yorsangsukkamol J, **Chaiprasert A**, Rienthong D, Billamas P, Palittapongarnpim P. Variable-number tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 in Thailand. *Tuberculosis* 2010; 90: 9-15. (Journal Impact Factor 1.758; 2008)
 100. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, **Chaiprasert A**. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol* 2010, 10: 233-8. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 2.89; 2009)
 101. Prammananan T, **Chaiprasert A**, Leechawengwongs M. 8-years experience of fluoroquinolone susceptibility testing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *Intern J Antimicrob Agent* 2011,

- 37; 84-5. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 3.01; 2009)
102. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N, **Chaiprasert A**. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11: 1142-9. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 3.223; 2009)
103. Faksri K, Drobniewski F, Nikolayevskyy V, Brown T, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N, **Chaiprasert A**. Epidemiological trends and clinical comparisons of *M. tuberculosis* lineages in Thai TB meningitis. *Tuberculosis* 2011; 91: 594-600. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 2.678; 2011)
104. Yorsangsukkamol J, **Chaiprasert A**, Palaga T, Prammananan T, Faksri K, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N. Apoptosis, production of MMP9, VEGF, TNF- α and intracellular growth of *M. tuberculosis* different genotypes and different *pks15/1* genes. *APJAI* September 2011; 29(3): 240-251 (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 0.762; 2010)
105. Pitaksajakul P., Worakhunpiset S., Chaiprasert A., Boonyasopun J., Ramasoota P. *gyrA* and *gyrB* mutations in Ofloxacin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Thailand. *southeast asian J trop Med public health*. Vol 42 No. 5 Sep 2011; p1163-1167.
106. Thongsri Y, Aromdee C, Yenjai C, Kanokmedhakul S, Chaiprasert A, Hamal P, Prariyachatigul C. Detection of diketopiperazine and pyrrolnitrin, compounds with anti-*Pythium insidiosum* activity, in a *Pseudomonas stutzeri* environmental strain. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012 Nov 13. doi: 10.5507/bp.2012.090.
107. Tumtip Sangruchi, Panitta Sithinamsuwan, Jane Manonukul, Suteekanit Hahtapornsawan, Nattawut Sermsathanasawadi, Methee Chayakulkeeree, Teerapong Krajaejun, Angkana Chaiprasert, Wanchai Wanachiwanawin. The Pathological study of Amputated limbs infected by *Pythium insidiosum*: To Propose adequacy of surgical margins. *Siriraj Med J*. 2013; 65: 1-5.
108. Takol Chareonsirisuthigul, Rommanee Khositnithikul, Akarin Intaramat, Ruchuros Inkomlue, Kanchana Sriwanichrak, Savittree Piromsontikorn, Sureewan Kitiwanwanich, Tassanee Lowhnoo, Wanta Yingyong, Angkana Chaiprasert, Ramrada Banyong, Kavi Ratanabanangkoon, Tristan T. Brandhorst, Theerapong Krajaejun. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for

serodiagnosis of human pythiosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013; 76: 42-45.

109. Nicha Keoprasom, Leena Chularojanamontri, Methee Chayakulkeeree, Angkana Chaiprasert, Wanchai Wanachiwanawin, Chanean Ruangsetakit. Vascular pythiosis in a thalassmic patient presenting as bilateral leg ulcers. *Medical Mycology Case Reports*. 2013; 2: 25-8.

Book Chapter

1. **Chaiprasert A** : Chapter 26 Rare and unusual mycoses in : *Antifungal Drug Therapy : A Complete Guide for the Practitioners*. edited by Paul H. Jacobs and Lexie Nall 1990. Marcel Dekker, inc. New York (pp. 279-296).
2. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, วันฉัตร บพที่ 6 ในตำรา PCR ในโรคติดต่อ รายงานของคณะผู้เชี่ยวชาญเพื่อพัฒนาและนำเอาวิธีการของ PCR มาใช้ในงานควบคุมโรคติดต่อ 2537; บรรณาธิการ อังคณา ฉายประเสริฐ, สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการและ โกวิท คัมภีรภาพ. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, หน้า 50-64.(100%)
3. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. Clinical use of laboratory tests in infectious diseases ในตำรา *An update on infectious diseases IV* 2540; บรรณาธิการ บุญมี สถาปัตยกรรมศาสตร์ อัญญาวิภากุล, สมาคมโรคติดต่อแห่งประเทศไทย, สหวิทยาการพิมพ์ ,กรุงเทพฯ (หน้า 67-86).(100%)
4. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. Clinical use of laboratory tests in infectious diseases : Mycobacteriology & Mycology. ในตำรา *An update on infectiuous diseases V* 2541, บรรณาธิการ บุญมี สถาปัตยกรรมศาสตร์ อัญญาวิภากุล, สมาคมโรคติดต่อแห่งประเทศไทย, สหวิทยาการพิมพ์, กรุงเทพฯ (หน้า 335-55).(100%)
5. สมณีย์ สุขรุ่งเรือง, **อังคณา ฉายประเสริฐ**, "ราฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์" : *Cryptococcus neoformans* บทที่ 14 ใน *เอชไอวีและจุลชีพฉวยโอกาส* 2541; บรรณาธิการ พิไลพันธ์ พุฒวัฒน์และคณะ อักษรสมัย กรุงเทพฯ หน้า 14.1-14.17. (50%)
6. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, อมร สีสารศรี, จุลชีววิทยาของมัยโคแบคทีเรียสิ่งแวดล้อม บทที่ 11 ในตำรา *เวชศาสตร์สิ่งแวดล้อม ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา มหาราช* 2542; บรรณาธิการ สมชัย บวรภิตติ, จอห์น พี ลอฟท์ส และ กฤษดา ศรีสำราญ. เรือนแก้วการแพทย์ กรุงเทพฯ หน้า 193-210. (80%)
7. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, การทดสอบความไวของเชื้อมัยโคแบคทีเรียต่อยาจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ในหนังสือ *การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค ; การประยุกต์ทางคลินิกและเพื่อการพัฒนา ยาใหม่*; Edited by Prasit Palittapongpim. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Mahidol University ISBN 974-87703-9-7; 2543 ; หน้า 49-54. (100%)
8. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการปัจจุบันและอนาคต ในรายงานการประชุม "วิชาการวัณโรคและโรคระบบการหายใจระดับชาติ" ครั้งที่ 5 จัดโดยสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร สมาคม

- อูรเวซซ์แห่งประเทศไทยและสถาบันวิจัยวัณโรค สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยปี 2545; หน้า 9-31. (100%)
9. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, วิธีการใหม่ในการวินิจฉัยวัณโรค ใน "วัณโรค" พิมพ์ครั้งที่ 5 พ.ศ. 2546; บรรณาธิการ บัญญัติ ปรีชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 197-223. (100%)
 10. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, วัณโรคที่ติดต่อระหว่างสัตว์และคน: สถานการณ์วัณโรคในปัจจุบัน ในเอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ "มิติใหม่ของการควบคุมโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน" 2546; หน้า 166-170. (100%)
 11. **อังคณา ฉายประเสริฐ**, การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการปัจจุบันและอนาคต ในหนังสือประกอบการฝึกอบรม Zoonosis โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN: 974-682-109-1. 2546; หน้า 201-221. (100%)
 12. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A.** Chapter 1. Dermatophytoses, some subcutaneous fungal infections : chromoblastomycosis, mycetoma, entomophthoromycosis and dimorphic fungal skin infections. In : *Fungi in human and animal health*. Edited by R.K.S. Kushwaha 2004; Scientific Publishers (India) pp 1-28. **40%**
 13. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. Laboratory Diagnosis of Mycobacterial Intections (การตรวจหาเชื้อมัคโคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ) ในการจัดอบรมระยะสั้นของสมาคมโรคติดต่อในเด็กแห่งประเทศไทย เรื่อง Update On Pediatric Infectious Diseases 2004; หน้า 153-64. (100%)
 14. **Chaiprasert A.** Dermatophytes and Pythiosis. In Thai Fungal Diversity. Edited by Jones EBG, Tanticharoen M, Hyde K.D. Published by Biotec, Thailand, 2004; 213-225. (100%)
 15. **Chaiprasert A**, Prariyachatikul C, Srimuang S. *Penicillium marneffeii* in Online Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics 2006; หน้า 1-6 (**50%**)
 16. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. Rapid Diagnosis of Infectious Diseases: Visual Diagnosis of Mycoses. ในหนังสือการจัดอบรมระยะสั้นของสมาคมโรคติดต่อแห่งประเทศไทย เรื่อง An Update on Infectious Diseases 2007; pp 120-129.
 17. Kiatichai Faksri, Therdsak Prammananan, Manoon Leechawengwongs, Angkana Chaiprasert. Molecular Epidemiology and Drug Resistance of Tuberculous Meningitis. In Meningitis Edited by George Wireko-Brobby 2012, pp 85-112.

การเสนอผลงานวิชาการ

- ได้รับรางวัล Outstanding Poster Award ในการประชุมวิชาการ In recognition of excellent achievement in poster presentation at 7th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance (ISAAR 2009) เมื่อวันที่ 18-20 มีนาคม พ.ศ. 2552 ณ กรุงเทพฯ เรื่อง "MDR-TB and XDR-TB; data analysis from 8-year service"

- ได้รับรางวัลโปสเตอร์ดีเด่น ในการประชุมวิชาการโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ครั้งที่ 11 ระหว่างวันที่ 1-3 เมษายน พ.ศ. 2553 ณ โรงแรมจอมเทียน ปาล์ม บีช รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี ในหัวข้อเรื่อง “Subtyping of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family and clinical correlations from tuberculous meningitis and pulmonary tuberculosis patients”

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

1. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ดิ่งต้อย, นางสาวสมบุญ ศรีม่วง, นายเทอดศักดิ์ พรหมณะ นันทน์, นางสาววิยะดา อาจารย์ตฤณกุล, นางสาวปรียวิศว์ ณ อุบล, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นางสาววัชรินทร์ รังสีภาณรัตน์, นายสง่า พัฒนากิจสกุลและนายเพทาย เย็นจิตโสมนัส เรื่อง “ชุดจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์” ให้ไว้ ณ วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2546 (รางวัล ดีเยี่ยม) ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2544 เลขที่คำขอ 066671 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 28130
2. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ดิ่งต้อย, นางสาววิยะดา อาจารย์ตฤณกุล, นายสง่า พัฒนากิจสกุล, นายสุชัย เจริญรัตน์, นายนิธิพัฒน์ เจียรกุล, นายเพทาย เย็นจิตโสมนัส, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นายเทอดศักดิ์ พรหมณะนันทน์และนางสาวสมบุญ ศรีม่วง เรื่อง “ชุดตรวจสอบสำเร็จเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจโดยวิธีพีซีอาร์” ให้ไว้ ณ วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2543 (รางวัล ชมเชย) ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2544 เลขที่คำขอ 066670 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 8 มกราคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 27265
3. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ดิ่งต้อย, นางสาวสมบุญ ศรีม่วง, นางพรรณแข มไหสวริยะและนายอภิชาติ ศิวาธร เรื่อง “การตรวจหา DNA ของเชื้อ *M. marinum* และ *M. fortuitum* complex” ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 5 เมษายน 2544 เลขที่คำขอ 064843 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 28129

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นายเทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์

เพศ ชาย หญิง วันเดือนปีเกิด 15 กุมภาพันธ์ 2512 อายุ 44 ปี

สถานภาพ โสด สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัยอาวุโส

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2533
วท.ม.	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	2537
Dr. rer. biol. hum.	Microbiology	Hannover Medical School	2543

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

อณูชีววิทยาของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย โดยเฉพาะทางด้านกลไกการดื้อยา และจุลชีววิทยาของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2543	รางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่นประจำปี 2543	Hannover Medical School, Hannover, Germany
2543	รางวัลวิทยานิพนธ์ดีเด่นประจำปี 2543	German Society for Hygiene and Microbiology, Germany
2546	รางวัลดีเยี่ยมผลงานประดิษฐ์คิดค้นสาขา วิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่อง “ชุดจำแนกชนิดเชื้อ กลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์”	สภาวิจัยแห่งชาติ
2554	รางวัลการได้รับคุ้มครองสิทธิบัตรเรื่องชุดตรวจสอบ เชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี One-tube nested PCR และเรื่องการ จำแนกชนิดเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> และ nontuberculous mycobacteria โดยวิธี One-tube multiplex PCR	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งชาติ

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2538-42	Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) Scholarship	DAAD, Germany
2544-46	การโคลนและการศึกษาคุณสมบัติของยีนที่สร้างโปรตีนควบคุมการกำจัด macrolide ออกจากเซลล์ของเชื้อวัณโรค	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช)
2544-45	Evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PCR-REA) for identification of mycobacterium species	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2547-48	Cloning and functional characterization of squalene-hopene cyclase (SHC) from <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2547-48	Development of one-tube multiplex PCR for detection of rifampicin-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2548-50	Molecular characterization of genes conferring resistance to antituberculous drugs of Thai MDR-TB isolates	ทุนวิจัยวัณโรคดี้อย่าในศิริราชมูลนิธิ
2549-50	Computational identification of non-coding RNAs in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2550-52	Investigation of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>uvrC</i> gene	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2550-52	Molecular identification and phylogeny of rapid grower mycobacteria from Siriraj and Ramathibodi Hospitals	มหาวิทยาลัยมหิดล
2550-51	Surveillance of pyrazinamide susceptibility among <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates from Siriraj Hospital	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2551-52	Evaluation of macroarrays for identification of multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	สภวิจัยแห่งชาติ
2551-53	Determination of virulent-related <i>M.</i>	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

	<i>tuberculosis</i> strains isolated from cerebrospinal fluid	เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2550-53	Deciphering clarithromycin resistance mechanism in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	มหาวิทยาลัยมหิดล
2553-55	Identification of a novel mechanism conferring clarithromycin resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2553-57	MAS-PCR Rapid screening test for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)	NIAID, NIH, USA
2554-56	Identification of a novel mechanism conferring aminoglycoside resistance in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2554-56	Analysis of heterogeneity among <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing genotype isolated from cerebrospinal fluid (CSF) and development of tuberculous meningitis	มหาวิทยาลัยมหิดล
2554-57	Development of a novel serological assay to detect LTBI and a drug to eradicate LTBI or prevent development of tuberculosis	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-57	Nucleic acid lateral flow test for point of care diagnosis of TB complex and multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDRTB)	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-58	DNA chip for identification and typing <i>Mycobacterium tuberculosis</i> using DigiTag platform	NSTDA-JST

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

1. Phunpruch S, Warit S, Suksamran R, Billamas P, Jaitrong S, Palittapongarnpim P, Prammananan T. A role for 16S rRNA dimethyltransferase (ksgA) in intrinsic clarithromycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Antimicrob Agents 2013; 41: 548-551.

2. **Prammananan T**, Phunpruch S, Jaitrong S, Palittapongarnpim P. *Mycobacterium tuberculosis uvrC* essentiality in response to UV-induced cell damage. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2012; 43: 370-375.
3. Faksri K, Drobniowski F, Nikolayevskyy V, Brown T, **Prammananan T**, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N, Chaiprasert A. Epidemiological trends and clinical comparisons of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in Thai TB meningitis. *Tuberculosis* 2011; 91: 594-600.
4. Yorsangsukkamol J, Chaiprasert A, Palaga T, **Prammananan T**, Faksri K, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N. Apoptosis, production of MMP9, VEGF, TNF-alpha and intracellular growth of *M. tuberculosis* for different genotypes and different pks5/1 genes. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2011; 29: 240-51.
5. **Prammananan T**. Distribution of drug-resistant genes among Thai multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) clinical isolates. *Siriraj Med J* 2011; 63: 102-105.
6. Faksri K, Drobniowski F, Nikolayevskyy V, Brown T, **Prammananan T**, Palittapongarnpim P, Prayoonwiwat N, Chaiprasert A. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1142-1149.
7. **Prammananan T**, Chaiprasert A, Leechawengwongs M. 8-years experience of fluoroquinolone susceptibility testing of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 37: 84-85.
8. Jonmalung J, **Prammananan T**, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiology* 2010; 10: 223.
9. Iamsawat S, Surawut S, **Prammananan T**, Leelaporn A, Jearanaisilavong J. Multiplex PCR for detection of clarithromycin resistance and simultaneous species identification of *Mycobacterium avium* complex. *Asian J Trop Med Pub Health* 2010; 41: 590-601.
10. Boonaiam S, Chaiprasert A, **Prammananan T**, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microb Infect* 2010; 16: 396-399.
11. Yorsangsukkamol J, Chaiprasert A, **Prammananan T**, Palittapongarnpim P, Limsoontarakul S, Prayoonwiwat N. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculous meningitis patients in Thailand. *Tuberculosis* 2009; 89: 304-9.
12. Cheunoy W, Haile M, Chaiprasert A, **Prammananan T**, Cristea-Fernström M, Vondracek M, Chryssanthou E, Hoffner S, Petrini B. Drug resistance and genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Thai tuberculosis patients. *APMIS* 2009; 117: 286-90.

13. Samosorn S, Tanwirat B, Muhamad N, Casadei G, Tomkiewicz D, Lewis K, Suksamrarn A, **Prammananan T**, Gornall K, Beck JL, Bremner JB. Antibacterial activity of berberine-NorA pump inhibitor hybrids with a methylene ether linking group. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 3866-72.
14. **Prammananan T**, Chaiprasert A, Leechawengwongs M. *In vitro* activity of linezolid against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant (XDR)-TB isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 190-1.
15. **Prammananan T**, Cheunoy W, Taechamahapun D, Yorsangsukkamol J, Phunpruch S, Phdarat P, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 446-53.
16. **Prammananan T**, Phunpruch S, Tingtoy N, Srimuang S, Chaiprasert A. Distribution of *hsp65* PCR-Restriction Enzyme Analysis Patterns among *Mycobacterium avium* Complex Isolates in Thailand. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3819-21.
17. Chaiprasert A, Yorsangsukkamol J, **Prammananan T**, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhirabuttra C. Intact *pks15/1* in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 772-4.
18. Chaiprasert A, **Prammananan T**, Tingtoy N, Na-Ubol P, Srimuang S, Samerpitak K, Rangsipanuratn W. One-tube multiplex PCR provides an alternative, inexpensive method for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian J Trop Med Pub Health* 2006; 37: 494-502.
19. **Prammananan T**, Cheunoy W, Na-Ubol P, Tingtoy N, Srimuang S, Chaiprasert A. Evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis for Routine Identification of mycobacteria: Accuracy, Rapidity, and Cost Analysis. *Asia Pac J Trop Med Pub Health* 2005; 36: 1252-60.
20. Cheunoy W, **Prammananan T**, Chaiprasert A, Foongladda S. Comparative evaluation of PCR-restriction enzyme analysis: two amplified targets, *hsp65* and *rpoB*, for identification of cultured mycobacteria. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 165-71.
21. **Prammananan T**, Arjratanakool W, Chaiprasert A, Leechawengwong M, Asawapokee N, Leelarasamee A, Dhiraputra C. Second-line drug susceptibilities of Thai multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 216-19.
22. **Prammananan T**. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): molecular mechanism of resistance. *Siriraj Hosp Gaz* 2004; 56: 595-606.
23. Chaiprasert A, **Prammananan T**, Tingtoy N, Srimuang S, Arjratanakool W, Jearanaisilavong J, Srifeungfung S, Dhiraputra C. Six-year report of mycobacteria recovered from hemocultures at Siriraj Hospital. *Siriraj Hosp Gaz* 2004; 56: 477-84.

24. Sander P, Springer B, **Prammananan T**, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, Boettger EC. Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1204-11.
25. Springer B, Kidan YG, **Prammananan T**, Ellrott K, Boettger EC, Sander P. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2877-84.
26. Boettger EC, Springer B, **Prammananan T**, Kidan Y, Sander P. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO rep* 2001; 2: 318-23.
27. **เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์**, Antituberculous drug resistance: genetic and physiologic mechanisms. ใน: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, บรรณาธิการ. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค: การประยุกต์ทางคลินิกและเพื่อพัฒนายาใหม่. กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ; 2543. หน้า 55-69.
28. **Prammananan T**, Sander P, Springer B, Boettger EC. RecA-mediated gene conversion and aminoglycoside resistance in strains heterozygous for rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 447-53.
29. **Prammananan T**, Sander P, Brown BA, Frischkorn K, Onyi GO, Zhang Y, Boettger EC, Wallace RJ. A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis* 1998; 177: 1573-81.
30. Frischkorn K, Sander P, Scholz M, Teschner K, **Prammananan T**, Boettger EC. Investigation of mycobacterial *recA* function: protein introns in the RecA of pathogenic mycobacteria do not affect competency for homologous recombination. *Mol Microbiol* 1998; 29: 1203-14.
31. Sander P, **Prammananan T**, Meier A, Frischkorn K, Boettger EC. The role of ribosomal RNAs in macrolide resistance. *Mol Microbiol* 1997; 26: 469-80.
32. Sander P, **Prammananan T**, Boettger EC. Introducing mutations into a chromosomal rRNA gene using a genetically modified eubacterial host with a single rRNA operon. *Mol Microbiol* 1996; 22: 841-48.
33. Chaiprasert A, **Prammananan T**, Samerpitak S, Pattanakitsakul S, Yenjitsomanus P, Jearanaisilawong J, Charoenratanakul S. Direct detection of *M. tuberculosis* in sputum by reamplification with 16S rRNA-based primer. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 1996; 4: 250-9.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

1. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ตังต้อย, นางสาวสมบุญ ศรีม่วง, นายเทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์, นางสาววิยะดา อจารัตนกุล, นางสาวปรียวิศว์ ณ อุบล, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นางสาววัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, นายสง่า พัฒนากิจสกุลและนายเพทาย เย็นจิตโสมนัส เรื่อง “ชุดจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์” ให้ไว้ ณ วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2546 (รางวัล ดี

เยี่ยม) ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2544 เลขที่คำขอ 066671 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 28130

2. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ดิ่งด้อย, นางสาววิยะดา อัจฉิตนกุล, นายสง่า พัฒนากิจสกุล, นายสุชัย เจริญรัตนกุล, นายนิธิพัฒน์ เจียรกุล, นายเพทาย เย็นจิตโสมนัส, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นายเทอดศักดิ์ พรหมณะนนท์และนางสาวสมบุญ ศรีม่วง เรื่อง “ชุดตรวจสอบสำเร็จเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสโคโรนาซึ่งส่งตรวจโดยวิธีพีซีอาร์” ให้ไว้ ณ วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2543 (รางวัล ชมเชย) ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2544 เลขที่คำขอ 066670 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 8 มกราคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 27265