



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนของปั๊มที่นำยาออกนอกเซลล์ใน
เชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ต้านต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์
Investigation of nucleotide sequencing and gene expression of drug
efflux pumps in aminoglycosides-resistant *Mycobacterium tuberculosis*
clinical isolates

ผศ.ดร.สร้อยญา พันธุ์พฤกษ์
รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ
ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์

b00270388
RC00190

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณ 2558

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนของบีมพ์ที่นำยาออกนอกเซลล์ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ต้านต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

แหล่งเงิน ทุนสนับสนุนงานวิจัยเงินงบประมาณรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สจล

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุหน่วยงานต้นสังกัด

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร.เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อร้ายแรงในระบบทางเดินหายใจของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในปัจจุบัน มีการเพิ่มขึ้นของประชากรผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) และวัณโรคดื้อยาเกือบทุกขนาน (Extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) ดังนั้น การพัฒนาวิธีใหม่ๆ ในการต่อสู้และป้องกันวัณโรคดื้อยาจึงมีความสำคัญและควรทำอย่างเร่งด่วน การศึกษากลไกการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรค จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนายาต้านวัณโรคชนิดใหม่ ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) จำนวน 16 ยีนในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและดื้อยากานามัยซิน ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดลองพบว่า มีเพียงยีน Rv1250 ที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง 502 จากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสไทมีน แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีผลต่อลำดับของกรดอะมิโน แสดงให้เห็นว่าการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่ได้เป็นผลมาจากการเกิดกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ ยังศึกษาระดับการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาออกนอกเซลล์ทั้ง 16 ยีน ด้วยวิธี Real-time quantitative reverse transcription PCR (Real-time qRT-PCR) จากการทดลองพบว่าภายใต้สภาวะการกีดกันของเชื้อดื้อยากานามัยซิน นอกจากยีน Rv3917A (*whiB7*) และยีน Rv1258c (*eis*) ซึ่งมีระดับการแสดงออกที่สูงมากแล้ว ยังมียีนเกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาออกนอกเซลล์อีก 3 ยีน คือ Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่มีระดับการแสดงออกสูง อย่างไรก็ตาม ไม่พบการดื้อยากานามัยซิน เมื่อทำการ Overexpression ยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra

คำสำคัญ : วัณโรค, *M. tuberculosis*, อะมิโนไกลโคไซด์, การดื้อยา, บีมพ์ที่นำยาออกนอกเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Investigation of nucleotide sequencing and gene expression of drug efflux pumps in aminoglycosides-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

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 a respiratory infectious disease of human and animals that is caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Nowadays, there is an increase of TB population patients with Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). Thus, the development of new ways for fighting and protection of drug-resistant TB is important and should be done urgently. The study of drug resistance mechanisms of TB is another way to develop new anti-tuberculosis drugs. In this study, 16 genes conferring aminoglycoside (AGs) efflux pumps in kanamycin-resistant clinical isolate *M. tuberculosis* 24433 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced. There was only Rv1259 found a point mutation in nucleotide position at C502T in *M. tuberculosis* 24433 but this nucleotide change did not affect the amino acid sequences. It is indicated that AGs resistance in *M. tuberculosis* 24433 does not involved in the nucleotide sequences of 16 aminoglycoside efflux pump genes. In addition, the expression level of 16 efflux pump genes was investigated by Real-time quantitative reverse transcription-PCR (Real-time qRT-PCR). Upon kanamycin exposure, other than Rv3917A (*whiB7*) and Rv1258c (*eis*) that were found extremely overexpressed, 3 drugs efflux pump genes, Rv1819c, Rv1877 and Rv2846c showed high level of expression in *M. tuberculosis* 24433. However, direct effect of overexpressed Rv1819c, Rv1877 and Rv2846c could not be demonstrated in *M. tuberculosis* H37Ra overexpressed strain.

Keywords : Tuberculosis, *M. tuberculosis*, Aminoglycoside, drug resistance, efflux pump

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกของยีนของปัมพ์ที่นำยาออกนอกเซลล์ในเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ต้านต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ดำเนินงานจนสามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับทุนสนับสนุนจากบรายนได้คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี ๒๕๕๘ ถึง ๒๕๕๙ คณะผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการทุนวิจัยวัณโรคตื้อยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และขอขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทและเอกในกลุ่มวิจัยที่ได้ทุ่มเทกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์

รศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ

ดร.เทอดศักดิ์ พราหมณะนันท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 วัณโรค	5
2.1.1 การแพร่เชื้อและพยาธิสภาพของการเกิดวัณโรค	5
2.1.2 อาการของวัณโรค	8
2.1.3 การวินิจฉัยวัณโรค	9
2.1.4 ยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคและชนิดของเชื้อวัณโรคดื้อยา	11
2.2 เชื้อมัยโคแบคทีเรีย	17
2.3 ยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์	22
2.4 กลไกการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค	29
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	34
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	34
3.2 พลาสมิดดีเอ็นเอ	34
3.3 สารเคมี	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	34
3.3.2 ยาปฏิชีวนะ.....	35
3.3.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	35
3.3.4 เอนไซม์.....	35
3.3.5 ชุดทดสอบ (Kit).....	35
3.3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอ.....	36
3.4 อุปกรณ์.....	36
3.5 วิธีการทดลอง.....	37
3.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	37
3.5.2 วิธีการทางชีวโมเลกุล.....	38
3.5.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซิน.....	43
3.5.4 วิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มี ความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	44
3.5.5 วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถ ในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธี Real-time Quantitative Reverse Transcription-PCR (Real-time qRT-PCR).....	46
3.5.6 วิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่ม กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	48
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	56
4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถ ในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	56
4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> 24433.....	56
4.1.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อ ยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	59
4.1.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์	61
4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์	63
4.2.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ 24433	63
4.2.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA และสำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วย Real time PCR	64
4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธี Real-time quantitative reverse transcription PCR (Real-time qRT-PCR)	68
4.3 การศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่มีระดับการแสดงออกสูงเมื่อบ่มเซลล์ในยาปฏิชีวนะกานามัยซิน	70
4.3.1 การโคลนยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c เข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive. 70	
4.3.2 การโคลนยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c เข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 76	
4.3.3 ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ต่อการดื้อยากานามัยซินด้วยวิธีการหาค่า Minimal Inhibitor concentrations (MICs)	82
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	84
5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump)	84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) ด้วยวิธี Quantitative Reverse Transcription Real-time PCR (qRT-PCR) 86

5.3 การศึกษาหน้าที่ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c กับการดื้อยากานามัยซินและยาอะมิกาซิน 87

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 88

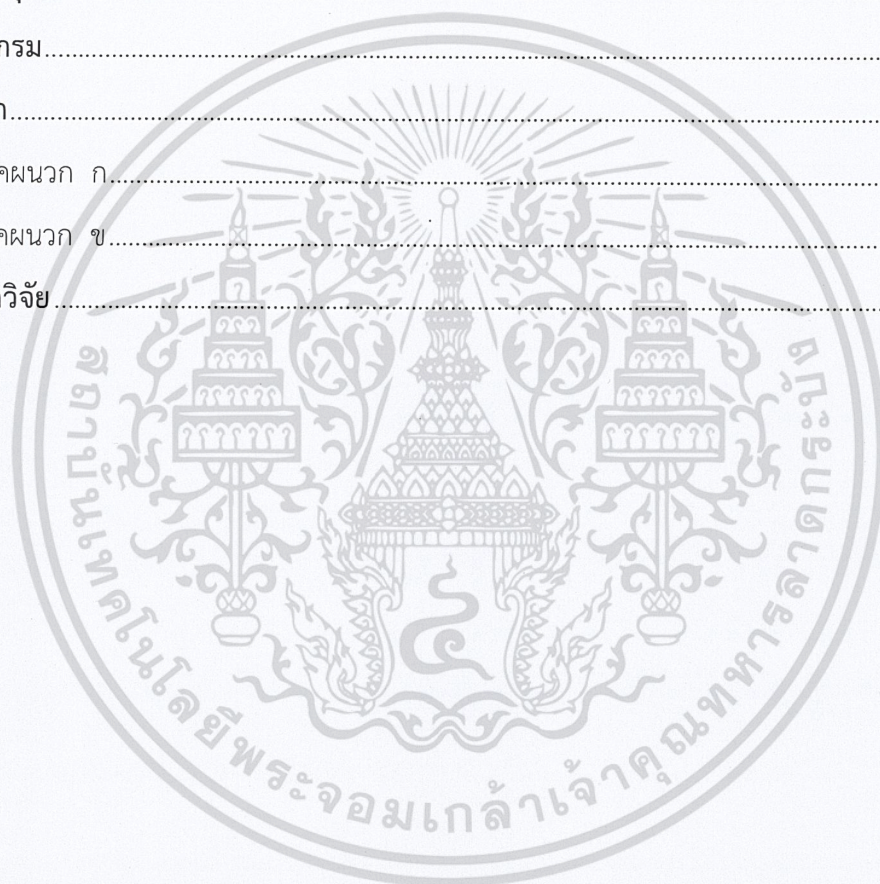
บรรณานุกรม 90

ภาคผนวก 97

 ภาคผนวก ก 97

 ภาคผนวก ข 98

ประวัตินักวิจัย 99



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สมบัติต่างๆ ที่ใช้สำหรับแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ (NTM).....	11
2.2 กลุ่ม Runyon ของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย.....	20
2.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำลายฤทธิ์ของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	27
2.4 โปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาหรือสารพิษออกจากเซลล์ หรือ Drug efflux pump ที่มีรายงานในเชื้อวัณโรค.....	31
3.1 ปริมาตรของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA.....	42
3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive.....	49
3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	50
3.4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i>	51
3.5 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Dephosphorylation ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i>	52
3.6 องค์ประกอบการใช้ในการทำ Ligation.....	53
3.7 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ด้วยเอนไซม์ <i>NruI</i>	54
4.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการ ขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	58
4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ 24433.....	62
4.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA (ไพรเมอร์ RT) ของยีนที่ใช้ในการศึกษา.....	65
4.4 ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	66
4.5 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจาก เซลล์ที่ดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์.....	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.6	
ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ยีนทั้ง 3 ชนิด.....	71
4.7	
ค่า MICs ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> H37Ra ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ที่มียีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ต่อยากานามัยซิน	83



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การเกิด Caseous necrosis	8
2.2 โครงสร้างทางเคมีของยาไอโซไนอะซิด (INH)	12
2.3 โครงสร้างทางเคมีของยาไรแฟมพิซิน (RIF).....	13
2.4 โครงสร้างทางเคมีของยาไพราซิनाไมด์ (PZA).....	14
2.5 โครงสร้างทางเคมีของยาอีแทมบูทอล (EMB).....	15
2.6 ยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (FQs).....	16
2.7 ลักษณะของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	21
2.8 โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	22
2.9 โครงสร้างทางเคมีของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์.....	23
2.10 กลไกการทำงานของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์.....	24
2.11 กลไกการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์.....	25
3.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถ ในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์.....	45
3.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Real-time qRT PCR	46
3.3 PikoReal 24-well real-time PCR system mechine	47
3.4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน.....	48
3.5 รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ได้ของแลบตีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NruI</i>	54
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> 24433 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากานามัยซิน.....	57
4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความ สามารถในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	60
4.3 อาร์เอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์ MT433.....	63
4.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Efflux pump Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c.....	73
4.5 โคลนเชื้อ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive.....	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.6 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pDrive กับยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c	75
4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	76
4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c	77
4.9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>BamHI</i>	78
4.10 โคลนีนีของเชื้อ <i>E. coli</i> DH5 α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน Rv1819c Rv1877 และ Rv2846c	79
4.11 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c.....	80
4.12 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ที่มียีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>NruI</i>	81
4.13 โคลนีนีของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> H37Ra ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมระหว่างพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c	82

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดต่อร้ายแรงในระบบทางเดินหายใจทั้งของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมนุษย์ที่สำคัญและยังเป็นปัญหาสาธารณสุข รวมทั้งยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการป่วยและเสียชีวิตของผู้คนในหลายๆ ประเทศทั่วโลก วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ที่ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2425 โดยนายแพทย์ชาวเยอรมันที่ชื่อ Robert Koch วัณโรคสามารถเข้าไปในร่างกายของมนุษย์ได้โดยแพร่ทางลมหายใจจากคนที่ติดเชื้อวัณโรคคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง โดยส่วนใหญ่แล้ว เชื้อวัณโรคที่ได้รับจะเข้าไปอีกปอดข้างใดข้างหนึ่งก่อน จากนั้น ถึงจะลามไปยังอวัยวะส่วนอื่นๆ ในร่างกายต่อไป อาการของวัณโรคสามารถสังเกตได้ยากมากในผู้ป่วยรายใหม่ๆ แต่เมื่อแสดงอาการ จะมีอาการที่พบได้ทั่วไป ได้แก่ ไอมีเลือดติดออกมา มีเสมหะ ร่างกายอ่อนเพลีย ผอม ผิวดำ ซอบเป็นไข หัวใจและชีพจรผิดปกติ ในปี พ.ศ. 2558 องค์การอนามัยโลกได้รายงานจำนวนผู้ติดเชื้อวัณโรคว่ามีประมาณ 1 ใน 10 ของประชากรโลกทั้งหมด โดยเฉพาะประชากรในทวีปแอฟริกา เอเชีย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในแต่ละปีจะมีรายงานจำนวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรคประมาณ 1.5 ล้านคน โดยแบ่งเป็นผู้ป่วยวัณโรคที่มีเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) ประมาณ 0.4 ล้านคนของจำนวนประชากรโลกทั้งหมด นอกจากนี้ จะมีผู้ป่วยรายใหม่ที่ติดเชื้อวัณโรคเพิ่มขึ้น 8.8 ล้านคนต่อปี

ประเทศไทยเป็นประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่มีการระบาดของวัณโรคมากที่สุดในโลกประเทศหนึ่ง ซึ่งจะพบทั้งวัณโรคในผู้ติดเชื้อ HIV และการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาที่ใช้รักษา โดยจากการคาดการณ์ ประเทศไทยมีการอุบัติของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่สูงถึง 117,000 คนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรค 10,000 คนต่อปี โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยมักจะเป็นวัณโรคปอด จากการรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่า วัณโรคยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญและเป็นภัยคุกคามต่อความมั่นคงทางด้านสุขภาพของประชาชนในประเทศไทย อีกปัญหาหนึ่งที่พบในปัจจุบันของการควบคุมการระบาดของวัณโรค คือ (1) การเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยารักษาอันดับแรกหรือการเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) เชื้อวัณโรคในกลุ่มนี้คือยาในกลุ่มยาหลักอย่างน้อย 2 เภสัชกรณีนี้นับเป็นเภสัชกรณีสองวันสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (Isoniazid) และยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) (2) การเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยา
 อันดับสองหรือเชื้อวัณโรคดื้อยาเกือบทุกขนาน (Extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)
 เชื้อวัณโรคในกลุ่มนี้เป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิด MDR ที่ดื้อยาในกลุ่มยาสำรองฟลูออโรควิโนโลน
 (Fluoroquinolone) ควบคู่กับการดื้อยาสำรองที่เป็นยาฉีดอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) อย่าง
 น้อย 1 ชนิด นอกจากนี้ ยังมีการค้นพบเชื้อที่ดื้อยาทั้งสองกลุ่ม โดยเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า Totally
 drug-resistant tuberculosis (ดื้อต่อยารักษาวัณโรคทุกชนิด) เชื้อดื้อยาเหล่านี้พบเพิ่มขึ้นทั้งใน
 ประเทศและต่างประเทศทั่วโลก จากปัญหาดังกล่าว ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของข้อมูลและองค์ความรู้
 เกี่ยวกับเชื้อวัณโรค ทั้งความรู้เกี่ยวกับกลไกการดื้อยา กลไกพยาธิกำเนิดโรค พันธุศาสตร์ของเชื้อ การ
 ควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ ของแต่ละกลไก หรือแม้กระทั่งความรู้เกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลทำ
 ให้เชื้อเข้าสู่ภาวะแฝง (Persistence) องค์ความรู้เหล่านี้จะสามารถนำมาใช้เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์
 สูงสุดในการรักษาวัณโรคได้ โดยสามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาโรคที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์
 กับเชื้อวัณโรคดื้อยาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำจัดวัณโรคในระยะยาว

ยารักษาวัณโรคที่นิยมใช้กันในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มยาหลัก ได้แก่
 ยาไอโซไนอะซิด (Isoniazid) ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) ไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide) และ อีแทม
 บูทอล (Ethambutol) และ (2) ยาสำรอง ยาสำรองนี้จะนำมาใช้ในกรณีเชื้อวัณโรคดื้อยาหลัก
 แล้ว ตัวอย่างของกลุ่มยาสำรอง ได้แก่ ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Fluoroquinolone) ยากลุ่มอะมิโน
 ไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) และพวกยาฉีดคาพรีโอมายซิน (Capreomycin) เป็นต้น ยาทั้งสอง
 กลุ่มที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ได้ถูกค้นพบมาเป็นระยะเวลาอันยาวนานแล้ว และเนื่องจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อ
 ยาเกือบทุกขนาน (XDR-TB) มีจำนวนเพิ่มขึ้น กลุ่มยาสำรองจึงได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาวัณโรคมากขึ้น
 นอกจากนี้ ได้มีการค้นพบเชื้อดื้อยาชนิด Totally drug-resistant tuberculosis ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อ
 ต่อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคทั้งหมด (ทั้งกลุ่มยาหลักและยาสำรองทั้งหมด) จึงได้มีความพยายามใน
 การพัฒนาปรับปรุงโครงสร้างของยาหรือวิจัยหาตัวยาใหม่ๆ ที่จะช่วยในการกำจัดเชื้อวัณโรคได้ดียิ่งขึ้น
 ดังนั้น การศึกษาและวิจัยเพื่อหาคำตอบใหม่ๆ เกี่ยวกับเชื้อวัณโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง

ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ถือว่าเป็นยาชนิดหนึ่งในกลุ่มยาสำรอง ที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อ
 ยาหลายขนาน (MDR-TB) ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่ใช้รักษาวัณโรคในปัจจุบัน ได้แก่ กานามัยซิน
 (Kanamycin, KM) และ อะมิกาซิน (Amikacin, AK) ยากลุ่มนี้จะสามารถทำการออกฤทธิ์ได้โดยการ
 เข้าไปจับกับไรโบโซมที่บริเวณยีน 16S rRNA ของหน่วยย่อยเล็กที่มีขนาด 30S (30S small subunit)
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อวัณโรค นอกจากนี้ มีการค้นพบกลไกต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค ได้แก่ กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของเป้าหมายยา (Alternative of drug target structure) กลไกการทำลายฤทธิ์ของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ (Aminoglycoside modifying-enzyme) และกลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจากเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ส่วนใหญ่เชื้อวัณโรคชนิด MDR- และ XDR-TB ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์นั้น จะมีการเกิดการดื้อยา เนื่องจากกลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของเป้าหมายยาและการทำลายฤทธิ์ของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์

กลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือกลไกขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) เป็นกลไกหนึ่งในการต้านทานการนำสารพิษต่างๆ หรือยาปฏิชีวนะเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นการทำให้ความสามารถในการนำสารเข้าออกนอกเซลล์ลดลง โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนหรือปั๊มในการขับออก โปรตีนเหล่านี้จะใช้พลังงานต่างๆ เป็นแรงขับเคลื่อนในการทำงาน เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ใช้โปรตีนที่จำเพาะในการนำยาโอมิเพเนม (Imipenem) เข้าสู่เซลล์ เมื่อเชื้อ *P. aeruginosa* เกิดการพัฒนาทำให้โปรตีนชนิดนี้ไม่สามารถทำงานได้ จึงทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาเกิดขึ้น สำหรับในเชื้อวัณโรค ได้มีรายงานมากมายในการศึกษากลไกการดื้อยาต่างๆ แต่การศึกษากลไกการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับกลไกการขับยาอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) นั้น ยังมีอยู่น้อยและไม่ค่อยชัดเจน จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์นี้ในเชื้อ MDR- หรือ XDR-TB ที่ไม่พบกลไกการดื้อยาอื่นๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ งานวิจัยนี้สนใจศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) ของยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค และตรวจสอบระดับการแสดงออกและผลของยีนเหล่านี้ต่อการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนายาและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในประเทศไทย

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) ของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค โดยทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ และศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วยเทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชัน-พีซีอาร์ (RT-Real-time PCR) จากนั้น จะทำการคัดเลือกยีนที่มีระดับการแสดงออกสูง ไปทำการศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra โดยโคลนยีนที่สนใจกับพลาสมิด psMT1 ซึ่งสามารถต้านทานยาไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) ที่จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งในเชื้อ *E. coli* และเชื้อมัคโคแบคทีเรีย จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra H37Ra และศึกษาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ใช้ต้านยา (Minimal inhibition concentration, MIC) ต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้องค์ความรู้ใหม่และเข้าใจกลไกการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของเชื้อวัณโรคมากขึ้น ความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนายาและวิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคในประเทศไทยในอนาคตต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัณโรค

วัณโรคหรือที่ชาวบ้านเรียกว่า “โรคฝีในท้อง” เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า วัณโรค “*Mycobacterium tuberculosis*” ในระยะแรกของการติดเชื้อวัณโรค อาการของวัณโรคจะสังเกตได้ยากมาก เนื่องจากเชื้อวัณโรคเป็นเชื้อแฝงที่ชอบออกอาการเมื่อร่างกายของผู้ป่วยอ่อนแอหรือมีภูมิคุ้มกันต่ำ โดยส่วนมาก ผู้ป่วยวัณโรคจะพบได้ในเด็กเล็กๆ ผู้สูงอายุ และผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV) เมื่อเวลาผ่านไป อาการของวัณโรคจะปรากฏออกมา ได้แก่ อาการคล้ายคนเป็นหวัด แต่จะมีการไอแห้งๆ ไอโพลๆ รวมทั้งมีเสมหะออกมาเป็นจำนวนมาก เมื่อผู้ป่วยมีอาการหนักขึ้น จะมีเลือดปนออกมากับเสมหะและเสมหะมีกลิ่นเหม็นแรง เจ็บหน้าอก ผู้ป่วยจะผอมเนื่องจากไม่ยอมอาหาร ผิวหนึ่งซิด ไม่สดใส ถึงแม้ว่าจะมีอายุน้อยก็ตาม หัวใจและชีพจรจะเต้นเร็วมากผิดปกติ และมีเหงื่อออกมากในเวลากลางคืน อาการที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นอาการของวัณโรคปอด ซึ่งส่วนใหญ่แล้ว เชื้อวัณโรคจะเข้าไปติดเชื้อในบริเวณปอดของผู้ป่วยก่อนเป็นอันดับแรก เนื่องจากเชื้อวัณโรคสามารถติดต่อได้จากระบบทางเดินลมหายใจ จึงทำให้เกิดเป็นวัณโรคปอด (Pulmonary tuberculosis) จากนั้น เชื้อก่อวัณโรคจะลามไปยังบริเวณอื่นๆ ของร่างกาย เกิดเป็นวัณโรคที่อวัยวะอื่น (Extrapulmonary tuberculosis) เช่น ลำไส้ ตับ ม้าม ต่อม้ำเหลือง สมอง กระดูกและไขสันหลัง เป็นต้น ดังนั้น การแก้ปัญหาของการระบาดของวัณโรคจึงจัดว่าเป็นหนทางในการป้องกันการเจ็บไข้ได้ป่วยและสูญเสียชีวิตของมนุษย์ที่ต้องเร่งวิจัยและพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเป็นลำดับต้นๆ

2.1.1 การแพร่เชื้อและพยาธิสภาพของการเกิดวัณโรค

การติดต่อและการแพร่เชื้อวัณโรคระหว่างมนุษย์สามารถเกิดขึ้นได้โดยผ่านทางระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากมนุษย์ต้องหายใจเพื่อนำออกซิเจนไปใช้ในการเผาผลาญอาหาร อาจได้รับเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วย ผ่านการไอหรือการจาม ทำให้เชื้อที่อยู่ภายในทางเดินหายใจของผู้ป่วยกระจายออกสู่ภายนอก โดยจะมีลักษณะเป็นละอองเสมหะ การไอหนึ่งครั้งจะก่อให้เกิดละอองเสมหะในบรรยากาศถึง 3,000 เซลล์เชื้อวัณโรคต่อ 1 อนุภาคของละอองอากาศ หากเทียบกับคนพูดจะต้องพูดนานถึง 5 นาที จึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเกิดละอองเสมหะในปริมาณใกล้เคียงกัน ถ้าเป็นการจาม จะเกิดละอองเสมหะมากกว่าการไอหลายเท่า ละอองเสมหะที่มีขนาดใหญ่จะตกลงพื้น เมื่อเสมหะแห้งแล้ว อาจเกิดละอองของเชื้อขนาดเล็กและมีโอกาสฟุ้งกระจายจากพื้นได้อีกครั้ง ละอองเสมหะที่สามารถลงสู่ถุงลมปอดได้คือ ละอองเสมหะที่มีขนาดเล็กกว่า 4 ไมโครเมตร การติดต่อแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคทางการหายใจเอาละอองเชื้อเข้าไป นับเป็นทางติดต่อที่สำคัญที่สุด ส่วนทางอื่นๆ เช่น ทางผิวหนังจากแผลที่เกิดจากเชื้อวัณโรค การสัมผัสสิ่งของเครื่องใช้ของผู้ป่วย หรือทางอาหารนั้นเกิดขึ้นได้เช่นกัน แต่โอกาสมีเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการติดต่อทางระบบทางเดินหายใจ ดังนั้น จึงเชื่อว่า เชื้อวัณโรคที่ติดอยู่ตามเสื้อผ้า เครื่องเรือน หนังสือ และพื้นดิน จึงไม่ใช่แหล่งการติดเชื้อที่สำคัญ เนื่องจากเชื้อโรคจะถูกทำลายอย่างรวดเร็วด้วยความร้อน แสงแดด และความแห้ง ผู้ที่อยู่ใกล้ชิดผู้ป่วยที่แพร่เชื้อวัณโรคมีโอกาสจะได้รับเชื้อวัณโรคเข้าไปบ่อยจะมีโอกาสติดเชื้อและเป็นโรคมามากกว่าผู้ที่ไม่ได้อยู่ใกล้ชิดผู้ป่วย

เมื่อเชื้อแบคทีเรียก่อวัณโรคแบ่งตัวภายในเนื้อเยื่อปอด แมคโครฟาจ (Macrophage) ที่อยู่ในถุงลมจะเข้าไปทำลายเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นหรือเชื้อแบคทีเรียอาจจะแฝงตัวและเจริญอยู่ในแมคโครฟาจได้ พยาธิสภาพของวัณโรคแบ่งเป็น 4 ระยะ โดยระยะที่ 1-3 เป็นการเกิดพยาธิสภาพสำหรับ Primary tuberculosis ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ ซึ่งรอยโรคจะไม่รุนแรง เชื้อวัณโรคอาจจะถูกทำลายหรือแฝงตัวในแมคโครฟาจเพื่อรอโอกาสในการเจริญและแสดงอาการของโรคในระยะที่ 4 หรือระยะ Postprimary tuberculosis การเกิดพยาธิสภาพของวัณโรคสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

2.1.1.1 ระยะที่ 1

ในสัปดาห์แรกที่เกิดการติดเชื้อ *M. tuberculosis* แมคโครฟาจจะถูกกระตุ้นให้ไปจับกินเชื้อโรค ในกรณีนี้แมคโครฟาจสามารถทำลายเชื้อวัณโรคได้ จะทำให้เชื้อวัณโรคหยุดการเจริญเติบโต แต่ถ้าเชื้อวัณโรคไม่ถูกทำลาย เชื้อโรคจะแบ่งตัวมากขึ้นภายในแมคโครฟาจ เมื่อแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก จะทำให้เซลล์แมคโครฟาจแตก

2.1.1.2 ระยะที่ 2

ในระหว่างการติดเชื้อวัณโรควันที่ 7 ถึง 21 เมื่อเชื้อแบ่งตัวภายในแมคโครฟาจจนแตกแล้ว เชื้อที่ถูกกปลดปล่อยออกมาจะไปกระตุ้นโมโนไซต์ (Monocyte) ของระบบภูมิคุ้มกันที่เหนียวในเซลล์ (Cell-mediated immunity, CMI) ทำให้เกิดแกรนูโลมา (Granuloma) ซึ่งเป็นลักษณะการ

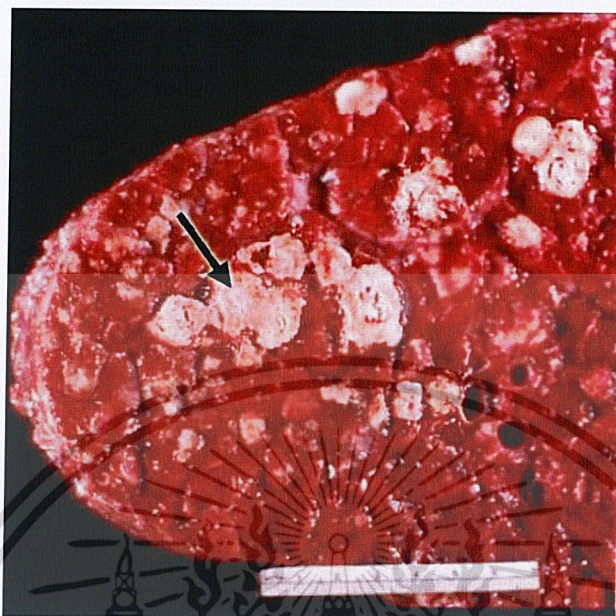
เกิดการอักเสบแบบเรื้อรังหรือเป็นลักษณะของการรวมตัวกันของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แมคโครฟาจ ฯลฯ เนื่องจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันพยายามที่จะห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

2.1.1.3 ระยะที่ 3

ในระยะนี้ เชื้อวัณโรคเพิ่มจำนวนถึง 10^3 - 10^4 เซลล์ โดยจะไปกระตุ้น CMI และภาวะภูมิไวเกินชนิด Delayed-type hypersensitivity (DTH) จนทำให้เกิดรอยโรคแบบ Caseous necrosis การเกิดรอยโรคแบบนี้เกิดจากการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อวัณโรคอย่างจำเพาะเจาะจง เซลล์ที่ตายตรงกลางของแกรนูโลมา เรียกว่า Caseous necrosis (รูปที่ 2.1) โดยเชื้อวัณโรคจะหยุดเจริญเติบโตตรงบริเวณนี้ (Solid caseous material) แต่เชื้อวัณโรคจะยังไม่ตายและสามารถอยู่ในบริเวณนี้ได้อีกนาน

2.1.1.4 ระยะที่ 4

ในระยะนี้ เนื้อเยื่อบริเวณที่ติดเชื้อจะตาย มีลักษณะนุ่ม เหลว เนื่องจากเซลล์ในบริเวณนี้ไม่เหลือลักษณะโครงสร้างเดิมไว้แล้ว (Liquefaction necrosis) การเกิด Liquefaction มีผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้อยู่ (Hydrolytic enzyme) จากแมคโครฟาจไปย่อยเนื้อที่ตาย Caseous ในบริเวณนี้ จะพบปริมาณของสารอาหารจำนวนมากที่ใช้สำหรับการเจริญของเชื้อวัณโรค เชื้อวัณโรคที่ออกมาจะไปกระตุ้นการทำงานของ DTH ให้ทำลายเนื้อเยื่อและผนังหลอดเลือดใกล้เคียง ทำให้บริเวณนี้เกิดลักษณะเป็นโพรง (Cavity) ขึ้น อากาศจึงสามารถผ่านเข้าบริเวณนี้ได้ (Air-fluid level) ทำให้เชื้อโรคแบ่งตัวได้ดี โดยมักจะพบในบริเวณกลีบบน (Upper lobe) ของปอด



รูปที่ 2.1 การเกิด Caseous necrosis

ที่มา : http://kobiljak.msu.edu/cai/HM561_Pathology/Images-Injury/Lab1-Image17.jpg

2.1.2 อาการของวัณโรค

ผู้ป่วยวัณโรคทุกชนิดจะมีอาการเบื้องต้นเหมือนกัน คือ มีอาการไข้เรื้อรัง ไม่อยากอาหารจนผอมลง อ่อนเพลีย เหงื่อออกตอนกลางคืน ไอแห้งๆ ไอเรื้อรัง หอบเหนื่อย มีเสมหะจำนวนมาก ในกรณีที่เป็นวัณโรคปอดจะมีอาการเพิ่มเติม คือ เสมหะจะมีสีเขียวหรือเหลือง มีกลิ่นเหม็นและจะมีเลือดปนออกมากับเสมหะ มักครั่นเนื้อครั่นตัว เจ็บหน้าอกมาก และหายใจติดขัด โดยจะมีอาการต่อเนื่องนาน 2-3 สัปดาห์ ช่วงหลังๆ น้ำหนักตัวจะลดลงอย่างรวดเร็ว

อาการของวัณโรคนอกปอด (Extrapulmonary TB) แต่ละชนิดจะแสดงอาการที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอวัยวะที่เชื้อวัณโรคเข้าไปอาศัยอยู่ ยกตัวอย่าง เช่น วัณโรคต่อมน้ำเหลืองที่จะทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตหรือคอโต วัณโรคเยื่อหุ้มสมองที่มักพบในเด็กเล็กๆ และวัณโรคกระดูกและข้อ เป็นต้น โดยการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคสามารถทำได้หลายวิธีแล้วแต่อาการของโรค

2.1.3 การวินิจฉัยวัณโรค

การวินิจฉัยของการติดเชื้อวัณโรคนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งวิธีการตรวจสอบเชื้อและวิธีการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล โดยวิธีที่นิยมในการวินิจฉัยวัณโรคมี 4 วิธี ดังนี้

2.1.3.1 วิธีดั้งเดิม

วิธีดั้งเดิมนี่จะเป็นการวินิจฉัยเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีของเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญเติบโต การผลิตเม็ดสี (Pigmentation) และลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี คุณสมบัติทางกายภาพเหล่านี้สามารถทดสอบควบคู่ไปกับการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบไนอะซิน (Niacin test) การเกิดปฏิกิริยาอะตาเลส (Catalase) การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรท (Nitrate reduction) การเกิดปฏิกิริยายูรีเอส (Urease) การส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสม รวมถึงการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีต่างๆ วิธีดั้งเดิมนี่เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัด แต่มีข้อจำกัด คือ มีความจำเพาะเจาะจงต่ำและไม่สามารถจำแนกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ

2.1.3.2 วิธีการย้อมสีและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการย้อมสีและส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Sputum smear microscopy) นี้เป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นสำหรับการจัดจำแนกเชื้อวัณโรคในปอด เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้จำนวนเชื้อไม่เยอะสำหรับการวินิจฉัย แต่มีความจำเพาะเจาะจงต่ำ วิธีการย้อมสีเชื้อวัณโรคที่นิยมใช้ คือ วิธี Ziehl-Neelsen ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการย้อมสีเชื้อจำพวกทนกรดได้ดี (เนื่องจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียมีชั้นไขมันที่ผนังเซลล์จำนวนมาก) วิธีนี้ทำให้สามารถนับจำนวนของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ ถ้ามีจำนวนของเซลล์ประมาณ 5,000-10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีการย้อมแบบ Ziehl-Neelsen จะใช้สีคาร์บอนฟุคซิน (Carbon fuchsin) เป็นสีหลัก เนื่องจากสีชนิดนี้มีสีแดงที่สามารถในการเข้าไปจับกับสารประกอบจำพวกไขมันหรือกรดมัยโคลิก (Mycolic acid) ภายในผนังเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย นอกจากนี้ ยังมีสีชนิดอื่นๆ ที่มีความสามารถในการย้อมเชื้อเช่นเดียวกับสีคาร์บอนฟุคซิน เช่น ออรามิน-โอ (Auramine-O) และโรดามิน (Rhodamine) เป็นต้น ในขั้นตอนการย้อมเชื้อ สีแดงจะถูกชะออกด้วยเอซิดแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรือกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 20

เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น สีน้ำเงินของเมทิลีนบลู (Methylene blue) จะถูกนำมาใช้ย้อมสีของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกจากเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรีย

2.1.3.3 วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Cultivation method) เป็นวิธีพื้นฐานที่เป็นมาตรฐานวิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้กันโดยทั่วไป ข้อดีของวิธีนี้ คือ มีความจำเพาะเจาะจงสูงและถูกต้อง แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนาน วิธีนี้จะใช้อาหารเพาะเลี้ยง 2 ประเภท คือ อาหารประเภทไม่ใช่ไข่ (Non egg-based medium) เช่น อาหารเหลว Middlebrook 7H9 อาหารแข็ง Middlebrook 7H10 อาหาร Middlebrook 7H11 และอาหารประเภทไข่ (Egg-based medium) เช่น อาหาร Löwenstein-Jensen และ อาหาร Ogawa เป็นต้น

2.1.3.4 วิธีการจัดจำแนกเชื้อวัณโรคตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะของโคโลนี

การจัดจำแนกเชื้อวัณโรคสามารถทำได้โดยดูจากคุณสมบัติทางชีวเคมีและลักษณะของโคโลนี ได้แก่ อุณหภูมิในการเจริญเติบโต การสร้างเม็ดสี ลักษณะของ Serpentine cord การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ (1) การทดสอบไนอะซิน (Niacin test) เชื้อ *M. tuberculosis* ไม่มีความสามารถในการเปลี่ยนไนอะซินอิสระให้กลายเป็นไนอะซินไรโบนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เกิดการสะสมของสารนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (2) การทดสอบปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรท เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถผลิตเอนไซม์เพอร์ริดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ และ (3) การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาคะตะเลสที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ แต่เอนไซม์ชนิดนี้ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะไม่สามารถทนความร้อนที่ 68 องศาเซลเซียสขึ้นไปได้ ดังนั้น เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่ 68 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายไป ผลของการทดสอบวิธีต่างๆ จะแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สมบัติต่างๆ ที่ใช้สำหรับแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ (NTM)

สมบัติ	<i>M. tuberculosis</i>	NTM
การทดสอบไนอะซิน (Niacin test)	+	-
การทดสอบปฏิกิริยารีดักชันของไนเตรท (Nitrate reduction test)	+	+/-
การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาอะตะเลสที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส (68 °C Catalase test)	-	+

2.1.3.5 วิธีการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบด้วยการติดฉลากสารกัมมันตรังสีเพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค

วิธีนี้จะตรวจหาสารพันธุกรรมที่บ่งชี้ความจำเพาะเจาะจงของเชื้อวัณโรค เช่น ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ เป็นต้น วิธีนี้จะทำให้ได้ผลที่เร็วและมีความจำเพาะสูง สารที่ใช้ติดฉลากกัมมันตรังสีที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวติดตาม ได้แก่ สารอะคริดิเนียมเอสเทอร์ (Acridinium ester) และสารอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (Alkaline phosphatase) นอกจากนี้ ยังมีวิธีตรวจสอบอื่นๆ ที่ถูกนำมาใช้ เช่น วิธี High performance liquid chromatography หรือ HPLC วิธี Arbitrariness-primed PCR (AP-PCR) วิธี Variable number of tandem repeat typing (VNTR) เป็นต้น

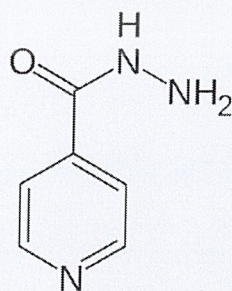
2.1.4 ยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคและชนิดของเชื้อวัณโรคคือยา

ยาที่ใช้รักษาวัณโรคสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ยาอันดับแรก (First-line antituberculosis drugs) และยาอันดับสอง (Second-line antituberculosis drugs) ยาทั้ง 2 ประเภทนี้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการรักษาวัณโรค โดยเฉพาะยาอันดับแรก ยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคนอกจากจะต้องมีประสิทธิภาพสูงแล้ว ควรมีราคาไม่แพงและมีผลข้างเคียงน้อย การใช้ยารักษาวัณโรคจะแยกเป็น 2 ระยะ คือ ชั้นเริ่มต้นและชั้นต่อเนื่อง สาเหตุที่ต้องมีการรักษา 2 ระยะคือ เพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อวัณโรคจะถูกกำจัดได้หมด

2.1.4.1 ยารักษาวัณโรคอันดับแรก

ยารักษาวัณโรคอันดับแรก (First-line antituberculosis drugs) เป็นยาที่ใช้รับประทาน มีทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ไอโซไนอะซิด (Isoniazid) ไรแฟมพิซิน (Rifampicin) อีแทมบูทอล (Ethambutol) และไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide) ยาชนิดนี้จะเป็นยากลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงที่เหมาะสมกับการรักษาวัณโรคมาก ซึ่งยารักษาวัณโรคอันดับแรกแต่ละชนิดจะมีผลข้างเคียงและกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน ดังนี้

ยาไอโซไนอะซิด (Isoniazid) เป็นยาที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1951 โดยพบว่าเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการรักษาวัณโรค ยาชนิดนี้จะมีผลข้างเคียง ถ้ารับประทานมากๆ จะทำให้เกิดอาการของตับอักเสบ ชาที่ปลายประสาท บางทีจะมีผื่นขึ้น ทำให้ปวดหัว อาเจียน และท้องเสียได้ โครงสร้างของยาชนิดนี้ประกอบด้วยวงแหวนไพริมิดีนและหมูไฮดราซีน (รูปที่ 2.2) ยาไอโซไนอะซิดทำหน้าที่ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันโคลิก ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรค ในปี ค.ศ. 1992 Zhang และคณะพบว่า การทำงานของยาชนิดนี้จะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์คะตาเลสและเพอรอกซิเดส (KatG) เพื่อเปลี่ยนยาไอโซไนอะซิดให้อยู่ในรูปของ Active form ซึ่งยาในรูปนี้จะสามารถเข้าจับกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับผลิตผนังเซลล์ คือ โปรตีน Acyl carriers (InhA) โดยจะจับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ ดังนั้น การกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ *inhA* จะมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์กรดไขมันโคลิกหรืออาจจะกล่าวได้ว่าเกิดการยับยั้งผนังเซลล์นั่นเอง ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับตัวยานี้ ไอโซไนอะซิด เช่น การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของยีน *katG* จากเซอรีนเปลี่ยนไปเป็นทรีโอนีนที่ตำแหน่งโคดอน 315 และการเปลี่ยนแปลงของบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *inhA* จากเบสไซโทซีนเปลี่ยนไปเป็นเบสไทมีนที่ตำแหน่ง -8 ถึง -24 เป็นต้น

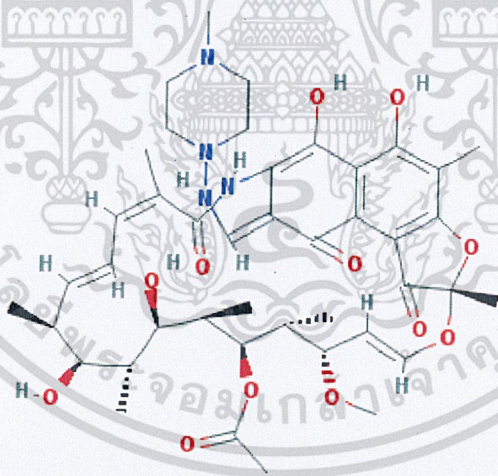


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของยาไอโซไนอะซิด (INH)

ที่มา : http://static.framar.bg/thumbs/6/atc/Isoniazid_11.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin) จัดเป็นยาประเภทกึ่งสังเคราะห์ ได้มากเชื้อ *Nocardia mediterranei* จากการค้นพบในปี ค.ศ. 1972 ยาไรแฟมพิซินถูกค้นพบครั้งแรกว่ามีฤทธิ์ในการรักษาวัณโรค (Sensi 1983) โดยยานี้มักจะใช้คู่กับยาไอโซไนอะซิด ยาไรแฟมพิซินมีผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร บางคนอาจจะมีอาการคล้ายกับเป็นหวัดได้ สูตรทางเคมีของยาไรแฟมพิซิน คือ $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ โดยมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.3 เป้าหมายการทำงานของยาชนิดนี้ คือ หน่วยย่อยเบต้า (β -subunit) ของ DNA-dependent RNA polymerase โดยการทำงานนี้จะทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการการสังเคราะห์โปรตีน การดื้อยาไรแฟมพิซินจะเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็น β -subunit ของ DNA-dependent RNA polymerase ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีรายงานพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาหลายตำแหน่ง เช่น การกลายพันธุ์ในบริเวณ hot-spot (81 นิวคลีโอไทด์ของโคดอน 507-533) และการกลายพันธุ์ที่โคดอน 531 เป็นต้น ซึ่งทั้งสองตำแหน่งการกลายพันธุ์นี้สามารถพบได้เป็นส่วนใหญ่ในเชื้อ *M. tuberculosis*

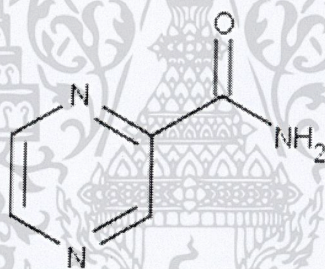


รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของยาไรแฟมพิซิน (RIF)

ที่มา : <https://www.drugbank.ca/structures/DB01045/image.svg>

ยาไพราซิनाไมด์ (Pyrazinamide) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1936 เป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาวัณโรค (Yeager et al. 1952) ยาชนิดนี้เป็นยาที่เกิดการดัดแปลงของโครงสร้างดั้งเดิม โครงสร้างของยาไพราซิनाไมด์มีลักษณะเป็น analog ของนิโคตินาไมด์ (Nicotinamide) (รูปที่ 2.4) รูปร่างของไพราซิनाไมด์จะมีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะอื่นๆ และมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและพวกเชื้อแบคทีเรียแฝง การทำงานของยาไพราซิโนไมด์ คือ ยาไพราซิโนไมด์จะมีลักษณะเป็น Prodrug ที่จะเข้าไปเปลี่ยนกรดไพราซิโนอิก (Pyrazinoic acid) ภายใต้การทำงานของเอนไซม์ไพราซินามิเดส (Pyrazinamidase) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ จะสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 5.5 หลังจากกระตุ้นสารตั้งต้นให้มีความสามารถในการทำงานได้ แล้ว กรดไพราซิโนอิกจะผ่านผนังเซลล์เข้าไปและทำให้เกิดสะสมของยาไพราซิโนไมด์ภายในเซลล์ ซึ่งการสะสมของยาจะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของผนังเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าออกของสารในเชื้อ *M. tuberculosis* การดื้อต่อยาไพราซิโนไมด์จะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ไพราซินามิเดสหรือ *pncA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยส่วนใหญ่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบในยีน *pncA* ของเชื้อ *M. Tuberculosis* คือ การขาดหาย (Deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 71 (Zhang and Mitchison 2003)

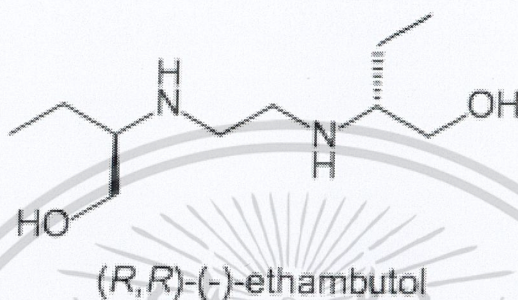


รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของยาไพราซิโนไมด์ (PZA)

ที่มา : <https://www.drugbank.ca/structures/DB00339/image.png>

ยาอีแทมบูทอล (Ethambutol) ถูกค้นพบว่าเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Karlson and Needham 1948) ในการรักษาวัณโรค จะใช้ยาอีแทมบูทอลร่วมกับยาอันดับแรกชนิดอื่นๆ สูตรทางเคมีของยาอีแทมบูทอล คือ $C_{10}H_{24}N_2O_2$ โดยมีโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2.5 ยาอีแทมบูทอลจะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยการยับยั้งการสร้างอะราบินแนน (Arabinan) และอะราบินอกาแลคแทน (Arabinogalactan) ที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* กระบวนการการสังเคราะห์ผนังเซลล์มีเอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องคือ เอนไซม์อะราบินโนซิลทรานสเฟอเรส (Arabinosyl transferase) เอนไซม์อะราบินโนซิลทรานสเฟอเรสเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อะราบินอกาแลคแทน โดยถอดและแปลรหัสมาจากโอเปอรอน *embCAB* การกลายพันธุ์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยีน *embCAB* จะส่งผลทำให้เกิดการดื้อยาอีแทมบูทอลในเชื้อ *M. tuberculosis* โดยเฉพาะการกลายพันธุ์ที่โคดอนตำแหน่ง 306 ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้พบว่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาอีแทมบูทอลในระดับสูง (Johnson et al. 2006; Telenti et al. 1997)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของยาอีแทมบูทอล (EMB)

ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Enantiopure_drug#/media/File:Negative_enantiomer_of_ethambutol.png

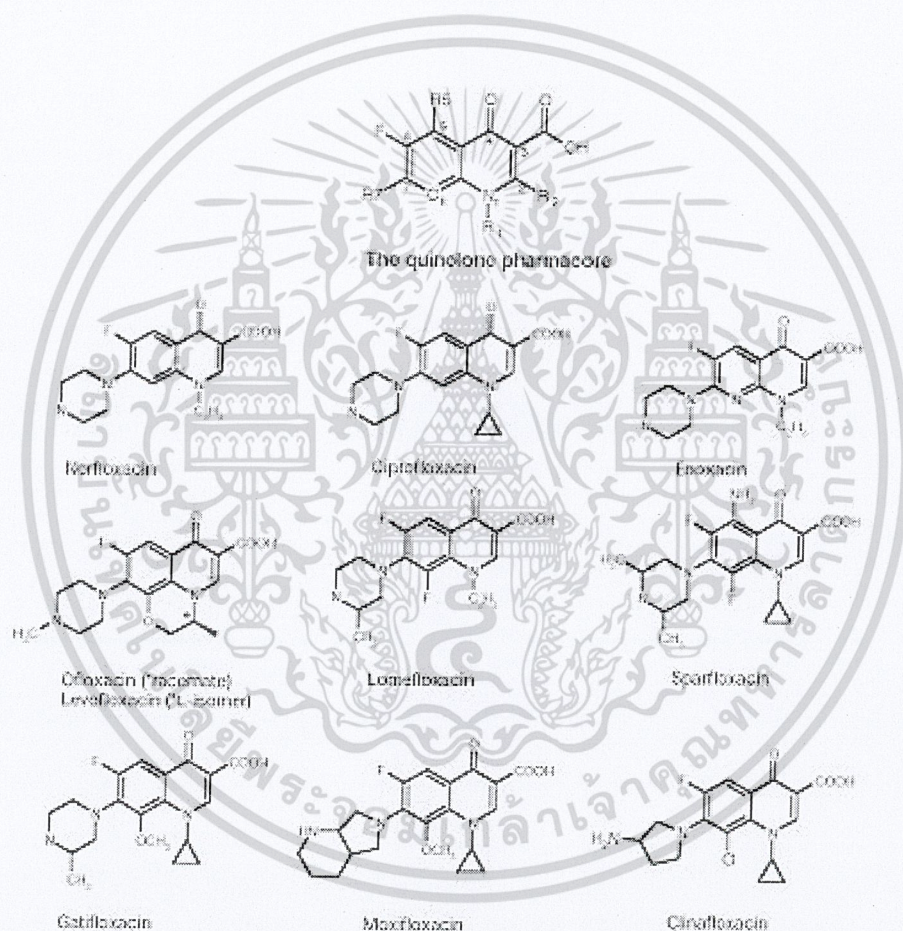
2.1.4.2 ยารักษาวัณโรคอันดับสอง

ยารักษาวัณโรคอันดับสอง (Second-line antituberculosis drugs) จัดเป็นยาทางเลือกที่จะถูกนำมาใช้ก็ต่อเมื่อยารักษาวัณโรคอันดับแรกใช้ไม่ได้ผล ยาในกลุ่มนี้มีทั้งแบบรับประทานและยาฉีด ซึ่งยาที่นิยมนำมาใช้รักษาเชื้อวัณโรคคือยาอันดับสอง ได้แก่ ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนและยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

ยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลนเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ยาในกลุ่มนี้มีหลายชนิด เช่น มอกซิฟลอกซาซิน (Moxifloxacin) เลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin) ออฟฟลอกซาซิน (Ofloxacin) และกาติฟลอกซาซิน (Gatifloxacin) เป็นต้น โครงสร้างจะประกอบด้วยฟลูออรีน (Fluorine) ควิโนโลน (Quinolone) นาลิดิซิก (Nalidixic) และกรดออกโซลินิก (Oxolinic acid) โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.6 กลไกการทำงานของของยากลุ่มนี้จะเกี่ยวข้องกับการจับบนบริเวณของเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II (Topoisomerase II) หรือเอนไซม์ดีเอ็นเอไจเรส (DNA gyrase) เอนไซม์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการแยกของดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยวในกระบวนการการจำลองดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(DNA replication) เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส II ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะมีลักษณะเป็นเตตระเมอร์ (Tetramer) มีทั้งหมด 2 หน่วยย่อย ได้แก่ หน่วยย่อย A และ B ซึ่งถอดและแปลรหัสมาจากยีน *gyrA* และ *gyrB* ตามลำดับ กลไกการดื้อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลนของเชื้อ *M. tuberculosis* เกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณ Conserved quinolone resistance determining region (QRDR) ของยีน *gyrA* และ *gyrB* โดยส่วนมากจะพบการกลายพันธุ์บริเวณ Ala-90 และ Asp-94 ของยีน *gyrA* (Cui et al. 2011)



รูปที่ 2.6 ยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (FQs)

ที่มา: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/410/202/u7284.fig1.jpg>

ปัญหาของวัณโรคที่กำลังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก คือ การติดเชื้อวัณโรคดื้อยาเพียงชนิดเดียว (Mono-drug resistant tuberculosis) และการติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ เชื้อวัณโรคคือต่อยารักษาอันดับแรก (Multi-drug resistance tuberculosis (MDR-TB)) โดยคือต่อยารักษาอันดับแรกอย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ ยาไอโซไนอะซิดและยาไรแฟมพิซิน และเชื้อวัณโรคคือต่อยารักษาอันดับแรกและอันดับสอง (Extensively-drug resistance tuberculosis (XDR-TB)) โดยคือต่อยารักษาอันดับแรกและคือต่อยารักษาวัณโรคอันดับสอง ได้แก่ คือต่อยากลุ่มฟลูออโรควิโนโลน ร่วมกับยาฉีดกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์อย่างน้อยหนึ่งชนิด

2.2 เชื้อมัยโคแบคทีเรีย

เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรค บางครั้งอาจจะเรียกเชื้อนี้ว่า เชื้อเอเอฟบี (AFB/acid fast bacilli) — เชื้อ *M. tuberculosis* จัดอยู่ในวงศ์ Mycobacteriaceae พบมากกว่า 60 สปีชีส์ (รวมทั้งเชื้อมัยโคแบคทีเรียก่อโรคและไม่ก่อโรค) การตั้งชื่อของเชื้อมัยโคแบคทีเรียจะขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรม การเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา เชื้อมัยโคแบคทีเรียมีลักษณะเป็นรูปท่อน โค้งเล็กน้อย ขนาดยาวประมาณ 2-4 ไมครอน กว้างประมาณ 0.2-0.5 ไมครอน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการอากาศ มักพบได้ในที่แห้งแล้งและที่มึนน้ำมึนมาก นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียจะมีความสามารถในการทนกรดได้เป็นอย่างดี เนื่องจากลักษณะของผนังเซลล์ที่มีปริมาณของกรดไขมันจำนวนมาก เชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ *M. tuberculosis* จึงเรียกว่า เชื้อทนกรด (Acid-fast bacteria) จากการศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ก่อโรคพบว่า ประกอบด้วยเพปติโดไกลแคนและมีลิพิดเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 60 โดยลิพิดที่พบในบริเวณผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กรดมัยโคลิก (Mycolic acid) คอร์ดแฟกเตอร์ (Cord factor) และแว็กซ์-ดี (Wax-D) องค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการดำรงชีวิตของเชื้อวัณโรค กรดมัยโคลิกทำหน้าที่เป็นสารเลือกผ่านที่ผนังเซลล์เพื่อปกป้องเซลล์จากการทำลายของโปรตีนประจุบวก ไลโซไซม์และอนุมูลออกซิเจน (Oxygen radical) คอร์ดแฟกเตอร์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถยับยั้ง PMN migration เป็นต้น

เชื้อมัยโคแบคทีเรียสามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท ตามระบบาติวิทยา อัตราการเจริญเติบโต ปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส การผลิตไนอะซินและการสร้างสารสีในที่มีดหรือที่สว่าง คือ

(1) เชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่เชื้อก่อโรค (Nontuberculous mycobacteria; NTM)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคมักจะพบได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน น้ำ และฝุ่นละออง เป็นต้น โดยสามารถแบ่งเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคออกเป็น 4 รั้นยอน (Runyon) (ตารางที่ 2.2) ดังนี้

Runyon 1 – Photochromogen เป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ช้า ซึ่งจะสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าภายใน 2 อาทิตย์ของการเพาะเลี้ยง เชื้อกลุ่มนี้ไม่ผลิตสารสีในที่มืดแต่สามารถผลิตสารสีเหลืองส้ม (แคโรทีนอยด์) ในที่สว่าง เชื้อมัยโคแบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดจะสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium asiaticum* และ *Mycobacterium marinum* เป็นต้น

Runyon 2 – Scotochromogen เป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ช้าและสามารถผลิตสารสีเหลืองในที่มืด เชื้อมัยโคแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะไม่ปรากฏการก่อโรคในมนุษย์ แต่มักจะพบเชื้อกลุ่มนี้ในลำคอของมนุษย์ แห้งน้ำและดินทราย เช่น เชื้อ *Mycobacterium szulgai* และ *Mycobacterium scrofulaceum* เป็นต้น

Runyon 3 – Non photochromogen เป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ช้าและไม่สามารถผลิตสารสีได้ทั้งในที่มืดและที่สว่าง เชื้อกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ เช่น เชื้อ *M. intracellulare* ที่ทำให้เกิดโรคที่คล้ายกับวัณโรคปอดในมนุษย์

Runyon 4 – Rapid grower เป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยจะใช้เวลาในการเจริญประมาณ 2-5 วัน และบางชนิดจะสามารถผลิตสารสีได้ เช่น *Mycobacterium fortuitum* และ *Mycobacterium phlei* เป็นต้น

เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคบางชนิดจะทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคสามารถทำให้เกิดโรคที่ปอด ต่อมน้ำเหลือง เนื้อเยื่อ บางชนิด กระดูกและระบบปัสสาวะ พยาธิสภาพการเกิดโรคของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคจะคล้ายกับการเกิดโรคของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคและสามารถก่อโรคปอดในมนุษย์ ได้แก่ *M. fortuitum*, *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. xenopai* และ *M. malmoense*

(2) เชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียที่ก่อโรค (*M. tuberculosis* complex; MTB)

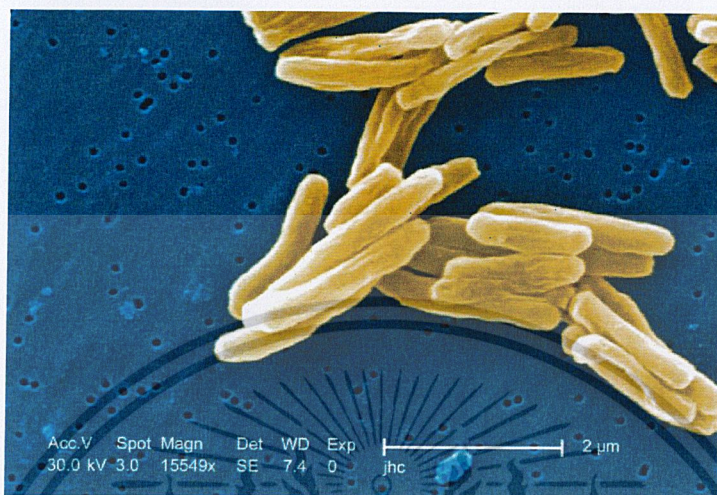
เชื้อมัคโคแบคทีเรียที่ก่อโรคประกอบด้วยเชื้อต่างๆ ได้แก่ เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* และ *Mycobacterium africanum* เชื้อ *M. tuberculosis* ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อยๆ คือ ชนิด Classical variant และชนิด Asian variant จากการทดสอบความไวต่อ Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide (TCH)

เชื้อ *M. tuberculosis* มีรูปร่างเป็นแท่ง มีขนาดประมาณ 0.2 ถึง 0.4 ไมครอน (รูปที่ 2.7) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน และหากมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จะช่วยเร่งการเจริญของเชื้ออีกด้วย แต่อัตราการเจริญของเชื้อจะช้ากว่าการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* ใช้เวลา 18 ชั่วโมงในการแบ่งตัว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงต้องใช้เวลายาวนานอย่างน้อย 10-14 วัน จึงจะเห็นเป็นโคโลนี โคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* มีขนาดเล็ก แห้ง และเป็นเกล็ด เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารหลายชนิด เช่น อาหาร Löwenstein Jensen อาหาร Ogawa อาหาร ATS และ อาหาร Petraghani เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis* จะต้องมีการเติมกรดไขมันโอเลอิกและทวิน 80 เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในอาหารเหลว เชื้อจะเจริญเป็นแผ่นอยู่บนผิวหน้าอาหาร เพราะเชื้อมีผิวเซลล์ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำ การให้อากาศโดยการเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญเร็วขึ้น และทำให้ระยะ Lag phase สั้นลง พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ พีเอช 7.0

ตารางที่ 2.2 กลุ่ม Rnyon ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Grange 1996)

กลุ่ม Rnyon	ชื่อกลุ่ม	ตัวอย่างเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย
Slow growing mycobacteria	Photochromogens	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> and <i>M. asiaticum</i>
	Scotochromogens	<i>M. goodii</i> , <i>M. scrofulaceum</i> and <i>M. szulgai</i>
	Non-chromogens	<i>M. avium</i> complex, <i>M. celatum</i> , <i>M. farcinogenes</i> , <i>M. gastri</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. lepraemurium</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. shimoidei</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i> and <i>M. terrae</i> complex
	Potential pathogens	<i>M. chelonae</i> and <i>M. fortuitum</i>
Rapidly growing mycobacteria	Thermophile	<i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> and <i>M. thermoresistibile</i>
	Others	<i>M. aurum</i> , <i>M. duvalii</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. gilvum</i> , <i>M. neoaurum</i> , <i>M. chitae</i> , <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. senegalense</i> and <i>M. vaccae</i>
Non cultivable mycobacteria		<i>M. leprae</i> , <i>M. genavense</i> , <i>M. confluentis</i> , <i>M. intermedium</i> and <i>M. interjectum</i>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



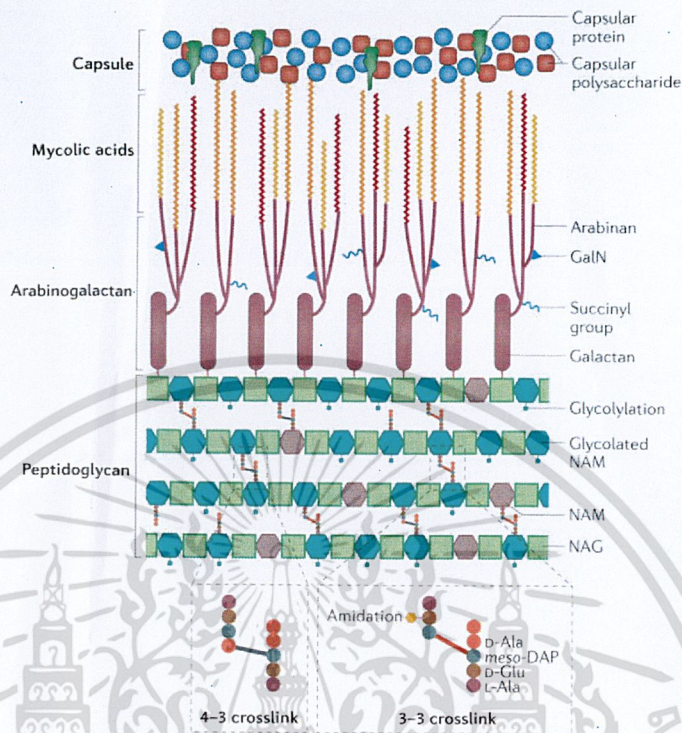
รูปที่ 2.7 ลักษณะของเชื้อ *M. tuberculosis*

ที่มา : <http://textbookofbacteriology.net/MTBCDC.jpg>

ผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีความสามารถในการป้องกันสารพิษต่างๆ ที่จะเข้ามาทำอันตรายต่อเซลล์ได้ เช่น โลหิโซไซม์และสารที่มีประจุบวกต่างๆ เป็นต้น ผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบด้วยองค์ประกอบ 3 ส่วนที่สำคัญ คือ เปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) อะราบิโนกาแลคแทน (Arabinogalactan) และกรดมัคโคลิก (Mycolic acid) การประกอบกันขององค์ประกอบทั้ง 3 ชนิดนี้ จะทำให้เกิดกลายเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า “Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex” ชั้นของเปปติโดไกลแคนจะอยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์และชั้นของอะราบิโนกาแลคแทน และชั้นของอะราบิโนกาแลคแทนจะอยู่ติดกับชั้นของกรดมัคโคลิก โครงสร้าง Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex นี้จะถูกห่อหุ้มด้วยลิปิดชนิดต่างๆ ซึ่งไลโปอะราบิโนแมนแนนจะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมโครงสร้างทั้งหมดนี้กับฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อีกที (รูปที่ 2.8)

หน้าที่อื่นๆ ของผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* คือ ทำหน้าที่คล้ายกับเป็นแอนติเจน อะราบิโนแมนแนนและไรบิโนกาแลคแทนจะเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นกลไกป้องกันการรุกรานการทำลายจากสิ่งแปลกปลอม และทำให้เกิดภาวะภูมิไวเกินภายในโฮสต์ นอกจากนี้สารประเภทไขมัน Wax-D จะอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* จะทำหน้าที่เป็นตัวส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของแอนติเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis*

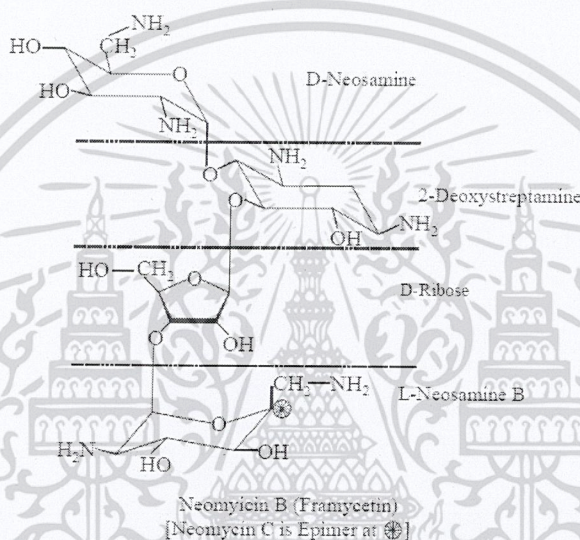
ที่มา : <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n8/images/nrmicro3299-i1.jpg>

2.3 ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ได้ดี ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์มีหลายชนิด เช่น อะมิกาซิน (Amikacin) กานามัยซิน (Kanamycin) สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) และเจนต้ามัยซิน (Gentamicin) เป็นต้น ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดแรก คือ สเตรปโตมัยซิน ซึ่งสกัดมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces griseus* การตั้งชื่อของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะลงท้ายด้วย “-micin” โดยปรกติ ยาชนิดนี้จะใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินปัสสาวะ โรคทางเดินหายใจและโรคในช่องท้อง แต่ยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะมีผลข้างเคียงต่อไตและหูชั้นใน โครงสร้างของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ประกอบด้วยอะมิโนซูการ์ (Amino sugar) ที่อยู่ตรงกลางของโครงสร้างหลักที่เชื่อมกับอะมิโนไซคลิทอล (Aminocyclitol) ด้วยพันธะโควาเลนต์ (รูปที่ 2.9) หมู่อะมิโนของอะมิโนซูการ์จะเข้าไปแทนที่หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl) ของน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้.

โดยหมู่แอมโมเนียมของโครงสร้างของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะทำให้ยากลุ่มนี้มีประจุเป็นบวกและมีความเป็นขั้วสูง ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะอาศัยคุณสมบัติของความมีขั้วสูงนี้ เพื่อให้ยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ การนำยากลุ่มนี้เข้าไปภายในเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานและสภาวะที่เหมาะสม อะมิโนไซคลิกทอลมิโครงสร้าง 3 รูปแบบ คือ (1) Streptidine (2) 2-deoxystreptamine และ (3) Spectinamide โครงสร้างของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์หลักจะเป็น 2-deoxystreptamine



ที่มา : http://4.bp.blogspot.com/-iPcDg7yVP8o/UGpXK9AleII/AAAAAAAAAFkk/h_BEg72JDIE/s524/08-Neomycin-B-%2528Framycetin%2529.jpg

ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะจับกับตำแหน่ง A ของ 30S rRNA ribosomal subunit ใน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่อยู่ไนไซโตพลาสซึม ผลของการทำงานของยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนหรือทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่ผิดปกติ จนเป็นผลทำให้เซลล์ไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ ในการเข้าจับของยากับเป้าหมายของยานั้น ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จะเข้าไปขัดขวางกระบวนการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Translation) หรือขัดขวางการเคลื่อนที่ของ tRNA ที่เคลื่อนที่เพื่อนำกรดอะมิโนตัวต่อไปเข้ามาต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 2.10)

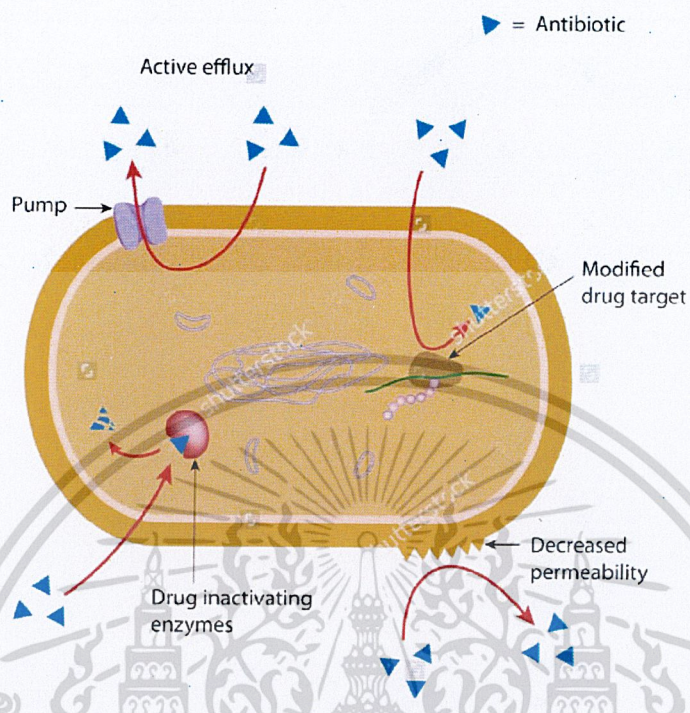
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบด้วย 3 กลไก คือ (1) การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา (The alteration of the ribosomal binding sites) (2) การสร้างเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายฤทธิ์ของยา (AGs-modifying enzymes) (3) การขับยาออกนอกเซลล์และลดการสะสมของยาภายในเซลล์โดยการทำงานของปั๊ม (Decrease in drug uptake and accumulation by AGs efflux pump) (รูปที่ 2.11) (Mingeot-Leclercq et al. 1999) การศึกษากลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์จึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนาแนวทางในการรักษาวัณโรคในอนาคต



รูปที่ 2.10 กลไกการทำงานของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

ที่มา : <http://www.cell.com/cms/attachment/2016508716/2037209025/fx1.jpg>



รูปที่ 2.11 กลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

ที่มา : <http://image.shutterstock.com/z/stock-photo-mechanism-of-antibiotic-resistance-in-bacteria-labeled-diagram-166170113.jpg>

กลไกการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยาจัดเป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการดื้อยาในกลุ่มนี้ ซึ่งจากการศึกษาการดื้อยาชนิดนี้พบว่า ส่วนใหญ่จะทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยดื้อต่อยากานามัยซินและอะมิคาซินในระดับสูง กลไกการดื้อยานี้จะเกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเป้าหมายของการจับของยา (การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์จากเบสอะดีนีนเป็นเบสกวานีนที่ตำแหน่ง 1401 ของยีน 16S rRNA (*rrs*) ซึ่งจะเข้าไปขัดขวางการจับของยาอะมิโนไกลโคไซด์กับเป้าหมาย กลไกการดื้อยาอะมิโนไกลโคไซด์นี้สามารถพบได้ทั้งในเชื้อชนิด MDR-TB และ XDR-TB

กลไกการสร้างเอนไซม์ที่มีความสามารถในการทำลายฤทธิ์ของยา เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าไปย่อยสลายส่วนของกรดอะมิโนหรือหมู่ไฮดรอกซิลของยา ยาที่เปลี่ยนแปลงนี้จะไม่สามารถจับกับไรโบโซมได้ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกนี้มีมากกว่า 50 ชนิด โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) เอนไซม์ Aminoglycoside acetyltransferase (AAC) ที่สามารถย่อยสลายยาในส่วนของกรดอะมิโน โดยอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการ Acetylation (2) เอนไซม์ Aminoglycoside phosphotransferase (APH) ที่สามารถย่อยสลายส่วนที่เป็นหมู่อะมิโนไซคล โดยอาศัยกระบวนการ Phosphorylation และ (3) เอนไซม์ Aminoglycoside nucleotidyltransferase (ANT) ที่สามารถย่อยสลายส่วนที่เป็นหมู่อะมิโนไซคล โดยอาศัยกระบวนการ Nucleotidylation (ตารางที่ 2.3) (Ramirez et al. 2010) ในเชื้อ *M. tuberculosis* จะสามารถพบเอนไซม์ AAC ได้เพียงชนิดเดียว โดยการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่ถอดและแปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ AAC ของเชื้อ *M. tuberculosis* (ยีน *eis*) จะทำให้เกิดการดื้อยากานามัยซินในระดับต่ำ (Zaunbrecher et al. 2009)

กลไกการขับยาออกนอกเซลล์และลดการสะสมของยาหรือสารพิษภายในเซลล์โดยการทำงานของปั๊มเป็นกลไกตามธรรมชาติที่พบได้ในเชื้อแบคทีเรีย กลไกนี้มักจะทำให้ยาเข้ามาในเซลล์ได้น้อยลง โปรตีนหรือปั๊มสามารถจำแนกเป็น 5 ประเภท ตามชนิดของพลังงานที่ใช้ ดังนี้ (1) Major facilitator (MFS) (2) ATP-binding cassette (ABC) (3) Small multidrug resistance (SMR) (4) Resistance-nodulation cell division (RND) (5) Multi-antimicrobial extension (MATE)

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำลายฤทธิ์ของยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis*

เอนไซม์	เชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์	ยาที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์
Acetyltransferases		
AAC(2')-Ia	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Providencia</i> spp.	Tobramycin, gentamicin, netilmicin, dibekacin, neomycin
AAC(3)-Ia, -Ib		Gentamicin, sisomicin
AAC(3)-IIa, -IIb, -IIc		Tobramycin, gentamicin, netilmicin, dibekacin, sisomicin
AAC(3)-IIIa, -IIIb, -IIIc		Tobramycin, gentamicin, dibekacin, sisomicin, kanamycin, neomycin,
AAC(6')-I	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>P. aeruginosa</i>	paromomycin
AAC(6')-II	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. marcescens</i>	Tobramycin, amikacin, netilmicin, dibekacin, sisomicin, kanamycin, isepamicin
Phosphotransferases		
APH(3')-I	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>C. jejuni</i>	Kanamycin, neomycin, paromomycin
APH(3')-III	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>C. jejuni</i>	Kanamycin, neomycin, paromomycin, amikacin, isepamicin
APH(3')-VI	<i>A. baumannii</i> , <i>C. jejuni</i>	Kanamycin, neomycin, paromomycin, amikacin, isepamicin
APH(3')-VII	<i>A. baumannii</i> , <i>C. jejuni</i>	Kanamycin, neomycin

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำลายฤทธิ์ของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* (ต่อ)

เอนไซม์	เชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์	ยาที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์
APH(2')-Ia (bifunctional enzyme)	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	Kanamycin, gentamicin, tobramycin, sisomicin, dibekacin
APH(2'')-Ib, -Ic	<i>Enterococcus</i> spp.	Kanamycin, gentamicin, tobramycin, netilmicin, dibekacin
Nucleotidyltransferases	<i>Enterococcus</i> spp.	Kanamycin, gentamicin, tobramycin
ANT(2')-I	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Tobramycin, gentamicin, dibekacin, sisomicin, kanamycin
ANT(3')-I	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>A. baumannii</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>V. cholerae</i>	Streptomycin, spectinomycin
ANT(4')-Ia	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>A. baumannii</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. aureus</i>	Tobramycin, amikacin, dibekacin, kanamycin, isepamicin
ANT(4')-Ila	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloaca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Tobramycin, amikacin, kanamycin, isepamicin
ANT(6')-I	<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Streptomycin
ANT(9')-I	<i>S. aureus</i>	Spectinomycin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อวัณโรค

จากการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ผ่านมานั้น พบว่า มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มนี้ถึง 3 กลไก โดยเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายยา และกลไกการทำลายฤทธิ์ของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ จึงคาดว่า เชื้อเหล่านี้ น่าจะมีการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยอาศัยกลไก efflux pump งานวิจัยจึงเน้นการศึกษาการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่มีความสำคัญและยังมีการศึกษาไม่มากนัก

จากการศึกษาเบื้องต้นของเชื้อวัณโรคชนิด MDR- และ XDR-TB ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่เคยมีรายงานมาแล้วในเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่า เชื้อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายของยา หรือเกิดการกลายพันธุ์ของยีน 16S rRNA (*rrs*) โดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 70 ของเชื้อที่ทำการศึกษาทั้งหมด (Via et al. 2010; Georghiou et al. 2012; Krüner et al. 2003) และพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ Aminoglycoside acetyltransferase หรือยีน *eis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการทำลายฤทธิ์ของยาโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ คิดเป็นประมาณร้อยละ 17 ของเชื้อทั้งหมด การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *eis* เพิ่มสูงขึ้น หรือสามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นนั่นเอง (Zaubrecher et al. 2009) นอกจากกลไกที่กล่าวมาในขั้นต้นนี้แล้ว ยังมีการศึกษาอื่นที่มีรายงานว่าสามารถควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยา คือ ยีน *whiB7* แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อที่ศึกษาทั้งหมด การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ 5' untranslated ของยีน *whiB7* จะมีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *eis* เพิ่มขึ้น (Reeves et al. 2013) นอกจากนี้ ยังสามารถพบเชื้อวัณโรคดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (ประมาณร้อยละ 11 ของเชื้อทั้งหมด) ที่ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาทั้ง 2 ชนิดดังที่กล่าวมานี้

โปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาหรือสารพิษออกจากเซลล์ (Drug efflux pump) สามารถพบได้ทั่วไปในแบคทีเรีย โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ATP-binding cassette (ABC), Major facilitator superfamily (MFS), Resistance nodulation division (RND), Small

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

multidrug resistance (SMR) และ Multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) ซึ่งโปรตีนชนิด MFS, SMR, RND และ MATE จะสามารถทำงานได้โดยอาศัยแรงผลักดันการเคลื่อนที่ของโปรตอน แต่โปรตีนชนิด ABC จะใช้พลังงาน ATP เป็นแหล่งพลังงาน (Tseng et al. 1999; Putman et al. 2000; Cattoir 2004; Li and Nikaido 2009; Saier et al. 2009) ในเชื้อ *M. tuberculosis* จะสามารถพบ Drug efflux pump ได้หลายชนิด (ตารางที่ 2.4) โปรตีนชนิด ABC มีประมาณร้อยละ 2.5 ของจีโนมทั้งหมด เช่น Rv1456c, Rv1457c และ Rv1458c เป็นต้น (Braibant et al. 2000) จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณ motif ของโปรตีนชนิด MFS ในเชื้อวัณโรค พบยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีน MFS อย่างน้อย 16 ยีน ยกตัวอย่าง เช่น Rv0783c, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1634, Rv1877, Rv2333c เป็นต้น (De Rossi et al. 2002) นอกจากนี้ ยังมีรายงานพบว่า โปรตีนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีน *tap* หรือ Rv1258c และยีน Rv1410c มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาเตตราไซคลิน (Tetracycline) และยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์บางชนิด (Aínsa et al. 1998; Silva et al. 2001) สำหรับโปรตีนชนิด SMR และ RND นั้น มีการค้นพบในเชื้อวัณโรคเช่นกัน ได้แก่ โปรตีน Mmr โปรตีน MmpL และโปรตีน MmpS เป็นต้น (De Rossi et al. 1998; Pasca et al. 2005) ส่วนโปรตีนชนิด MATE ไม่พบการรายงานในเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรีย แต่สามารถพบได้ในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Vibrio* sp. (Li et al. 2004)

งานวิจัยนี้ จะทำการคัดเลือกเฉพาะยีนที่สามารถถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ หรือ Aminoglycoside efflux pump ที่เคยมีรายงานมาแล้วในเชื้อวัณโรคและ Hypothetical protein ที่ยังไม่มีการรายงานถึงกลุ่มยาใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลไกนี้ ได้แก่ ยีน Rv0783c, Rv1145, Rv1146, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c, Rv3065 และ *whiB7* มาทำการศึกษาต่อไป (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบความสามารถในการขับยาหรือสารพิษออกจากเซลล์ หรือ Drug efflux pump ที่มีรายงานในเชื้อวัณโรค

ตำแหน่งโลเคัส	ยีน	การดื้อยา	อ้างอิง
Rv2936	<i>drxA</i>	doxorubicin	Choudhuri et al. 2002
Rv2937	<i>drxB</i>		
Rv2938	<i>drxC</i>		
Rv1634	Possible drug efflux pump	Increase acriflavine, fluoroquinolone and decrease rifampicin, isoniazid, chloramphenicol and erythromycin (Mutant-deletion of <i>efpA</i>)	Cole et al. 1998 Li et al. 2004
Rv2846c	<i>efpA</i>		
Rv2333c	Rv2333c	Spectinomycin, tetracycline	Ramón-García et al. 2007
Rv1819c	probable multidrug resistance pump		Cole et al. 1998
Rv0783c	<i>emrB</i> , probable multidrug resistance pump		Cole et al. 1998
Rv1258c	<i>tap</i> , multidrug resistance pump	Tetracycline, aminoglycoside	Ainsa et al. 1998
Rv1877	Probable drug efflux pump		Cole et al. 1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 โปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาหรือสารพิษออกจากเซลล์ หรือ Drug efflux pump ที่มีรายงานในเชื้อวัณโรค (ต่อ)

ตำแหน่งโปรตีน	ยีน	การดื้อยา	อ้างอิง
Rv2686c	Antibiotic-transport ATP-binding protein ABC transporter	Ciprofloxacin, norfloxacin, moxifloxacin and sparfloxacin	Pasca et al. 2004
Rv2687c	transporter	Ethidium bromide	Danilchanka et al. 2008
Rv2688c	Drugs-transport membrane ATP-binding protein ABC transporter	Tetraphenylphosphonium, erythromycin, ethidium bromide, acriflavine	Balganesh et al. 2012
Rv3065	<i>mmr</i> , multidrug resistance pump	Rifampin, isoniazid, streptomycin and ethambutol	Hao et al. 2011
Rv1456c	Antibiotic-transport membrane protein	Isoniazid, ethambutol	Cole et al. 1998
Rv1457c	Probable drug efflux pump	Aminoglycoside, tetracycline	Colangeli et al. 2005
Rv1458c	<i>iniB</i>		
Rv1250	<i>iniA</i>		
Rv0341	<i>iniC</i>		
Rv0342	<i>P55</i>		
Rv0343			
Rv1410c			

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) โปรตีนที่มีความสามารถในการขับยาหรือสารพิษออกจากเซลล์ หรือ Drug efflux pump ที่มีรายงานในเชื้อวัณโรค (ต่อ)

ตำแหน่งโลคัส	ยีน	การดื้อยา	อ้างอิง
Rv0849	multidrug resistance pump	quinolone	Balganesh et al. 2012
Rv1145	Probable drug transporter		Cole et al. 1998
Rv1146	Probable drug transporter		Cole et al. 1998
Rv2994	Probable efflux protein	isoniazid, ethambutol	Cole et al. 1998
Rv2459	<i>jeiA</i>		Gupta et al. 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 เชื้อ *M. tuberculosis* ต้อยยากานามัยซิน 29 สายพันธุ์ และ เชื้อ *M. tuberculosis* ไวต่อ ยากานามัยซิน 27 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากทุนวิจัยวัณโรคต้อยยา ศิริราชมูลนิธิ ในพระ อนุภัมภสมเด็จพะพี่นางเธอเจ้าฟ้ากัลยาณิวัฒนา กรมหลวงนราธิวาสราชนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

3.1.2 เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α (fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1hsdR17) (Biolabs, England)

3.1.3 เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25177, H37Rv ATCC 27294 และ H37Ra ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.2 พลาสมิดดีเอ็นเอ

3.2.1 พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive TA cloning (Appendix A) (Qiagen, Germany)

3.2.2 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 (Snewin et al. 1999) ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยวัณโรค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 อาหารสูตร Middlebrook 7H9 broth หรือ Middlebrook 7H10 agar (ภาคผนวก ข)

3.3.1.2 อาหารสูตร Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ข)

3.3.1.3 อาหารสูตร SOB

3.3.1.4 OADC (Oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (Becton Dickinson, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ยาปฏิชีวนะ

3.3.2.1 กานามัยซิน (Kanamycin) (Sigma Aldrich, Germany)

3.3.2.2 อะมิกาซิน (Amikacin) (Sigma Aldrich, Germany)

3.3.2.3 คาปริโอามัยซิน (Capreomycin) (PAA Laboratories, Austria)

3.3.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.3.1 แลมบ์ดา (λ) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (ขนาด 125, 564, 2,027, 2,322, 4,361, 6,557, 9,416 และ 23,130 คู่เบส) (Promega, USA)

3.3.3.2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Promega, USA)

3.3.3.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log (Biolabs, England)

3.3.4 เอนไซม์

3.3.4.1 *Taq* DNA polymerase (Promega, USA)

3.3.4.2 RNase A (Qiagen, Germany)

3.3.4.3 Dnase I (Invitrogen, USA)

3.3.4.4 Lysozyme (Amresco, USA)

3.3.4.5 Alkaline phosphatase, Calf intestinal (CIP) (Biolabs, England)

3.3.4.6 M-MuLV reverse transcriptase (Thermo Scientific, USA)

3.3.4.7 Premi Ex *Taq*TM DNA polymerase (Takara, Japan)

3.3.4.8 *Bam*HI (Biolabs, England)

3.3.4.9 *Eco*RI (Biolabs, England)

3.3.4.10 T4 DNA ligase (Takara, Japan)

3.3.5 ชุดทดสอบ (Kit)

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

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

3.3.5.3 ชุด PCR (Promega, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาดีเอ็นเอ

- 3.3.6.1 อะกาโรส (Agarose) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)
- 3.3.6.2 เจลสตาร์ (Gelstar) (Bio Whittaker Molecular Applications, USA)
- 3.3.6.3 สีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)
- 3.3.6.4 บัฟเฟอร์ Tris-EDTA (Tris 0.1 โมลาร์, EDTA 0.01 โมลาร์)
- 3.3.6.5 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate; SDS) เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)
- 3.3.6.6 ไลโซไซม์ (Lysozyme)
- 3.3.6.7 โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 3 โมลาร์ พีเอช 5.2
- 3.3.6.8 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด
- 3.3.6.9 เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ที่เย็นจัด
- 3.3.6.10 กลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 86
- 3.3.6.11 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 0.7 โมลาร์
- 3.3.6.12 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) 5 โมลาร์
- 3.3.6.13 Tween 80
- 3.3.6.14 CTAB; N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide
- 3.3.6.15 สารละลาย Tris-EDTE-Tween-Lysozyme; TETL (Tris 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์, Tween 80 0.5 เปอร์เซ็นต์, ไลโซไซม์ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
- 3.3.6.16 สารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) อัตราส่วน 24 ต่อ 1

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น autoclave-325 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.4.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Hermle-Labortechnik รุ่น Z383K ประเทศเยอรมนี
- 3.4.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) บริษัท Labnet รุ่น spectrafuge ประเทศเยอรมนี
- 3.4.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) บริษัท International Scientific Supply รุ่น HS123 ประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.5 เครื่องผสมสาร (Vortex) บริษัท Scientific Industries รุ่น Genie 2 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.4.6 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Incubator shaker) บริษัท New Brunswick Scientific รุ่น Innova 4,000 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.4.7 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (Incubator) บริษัท Scientific Promotion รุ่น Binder control ประเทศญี่ปุ่น
- 3.4.8 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (Electrophoresis equipments) บริษัท Amersham PharmaciaBiotech รุ่น GNA 100 ประเทศสวีเดน
- 3.4.9 ชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล (Documentation gel analysis) บริษัท Syngene รุ่น Bts-20.M ประเทศเยอรมนี
- 3.4.10 แหล่งกำเนิดไฟฟ้า (Power supply) บริษัท Amersham Pharmacia Biotech รุ่น EPS 301 ประเทศสวีเดน
- 3.4.11 เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument รุ่น 215 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.4.12 เครื่องแก้ว (Glasswares)
- 3.4.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.4.14 เครื่อง High-voltage electroporator (Bio-Rad, USA)
- 3.4.15 ห้องปฏิบัติการระดับ BSL3 พร้อมอุปกรณ์จำเป็น เช่น ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องปั่นเหวี่ยง หม้อ นึ่งอัตโนมัติ เป็นต้น

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis*

เชื้อ *M. tuberculosis* 24433 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและมีการติดต่อยากานามัยซิน แต่ไม่พบการกลายพันธุ์บริเวณของยีน *rrs* โปรโมเตอร์ของยีน *eis* ยีน *tap* และยีน *whiB7* นำเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มี OADC ร้อยละ 10 และยากานามัยซินที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ สำหรับเชื้อ *M. tuberculosis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

H37Rv (ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์เปรียบเทียบ) และ *M. tuberculosis* H37Ra (สำหรับการทำทรานสฟอร์มเมชัน) จะทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มี OADC เข้มข้นร้อยละ 10 นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

3.5.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* โคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง LB หรือฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมหรือไม่เติมยาปฏิชีวนะ นำจานอาหารแข็งไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หรือ นำฟลาสก์ไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.5.2 วิธีการทางชีวโมเลกุล

3.5.2.1 การสกัดกรดนิวคลีอิกทั้งหมด

นำเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 สายพันธุ์ที่ดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่เจริญบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 หรืออาหารเหลว Middlebrook 7H9 มากระจายในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีบัฟเฟอร์ TE พีเอช 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำตะกอนเซลล์มากระจายในสารละลาย Tris-EDTA-Tween-Lysozyme (TETL) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้น ย้ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มีเอนไซม์โปรตีนเนส เค (Proteinase K) ปริมาณ 0.44 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไดเดคซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มหลอดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติมสารละลาย CTAB ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ ร้อยละ 10 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร จากนั้น ใช้ปิเปตกระจายเซลล์อย่างเบาเมื่อจนเกิดสีขาวขุ่นคล้ายน้ำมัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น เติมสารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จึงย้ายส่วนใสลงหลอดใหม่และเติม

สารละลายคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Chloroform-isoamylalcohol) อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเก็บส่วนใสอีกครั้ง จากนั้น จึงตกตะกอนดีเอ็นเอใน ส่วนใสด้วยการเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 เท่าของส่วนใสที่ได้ และเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้น ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทั้งส่วนใสและระเหยแอลกอฮอล์ออกให้หมด จึงละลายดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ TE พีเอช 7.5 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.5.2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด

นำเซลล์ *M. tuberculosis* 24433 มากระจายในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ที่มีบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บเกี่ยวเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการกระจายเซลล์ในอาหาร Middlebrook 7H9 ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มสารละลายเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง นำเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยเติม TRIzol reagent (Invitrogen, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 15 วินาทีและบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 วินาที ทำซ้ำ 3 รอบ นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® RNA Mini Kit (Ambion, USA) เริ่มจากการตกตะกอนของอาร์เอ็นเอจากส่วนใส (Supernatant) โดยใช้เอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสทั้งหมด จากนั้น ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้น ย้ายตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทั้งส่วนใสใน Collection tube แล้วเติม Wash buffer I ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาทีและทั้งส่วนใสที่ได้ คอลัมน์ที่แห้งแล้วจะถูกนำไปวางบนหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม Wash buffer II ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตามด้วยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทั้งส่วนใสที่ได้และทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง แล้วจึงละลายอาร์เอ็นเอด้วย RNase-Free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร และบ่มเป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.2.3 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุด High-speed Plasmid Mini kit (Geneaid, Taiwan) โดยนำโคลนของ *E. coli* ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะ เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส หลังจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วกระจายเซลล์โดยการปิเปตขึ้นลง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และทำการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการเติมน้ำบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ลงใน PD column ที่วางลงใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน PD column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลาย เติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน PD column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารละลาย หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ทำการย้าย PD column แห่ง ไปวางลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับชะ (Elution buffer) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

3.5.2.4 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

วิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม และเติมน้ำบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายด้วยความร้อน รอให้อุ่น จึงเติมน้ำสารละลายเจลสตาร์ (Gelstar) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทใส่แม่พิมพ์ที่ประกอบด้วยถาดรองและหัว โดยต้องหลีกเลี่ยงการโดนแสง เมื่อเจลแข็งตัว จึงดึงหรือออกแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย้ายแผ่นเจลพร้อมภาครอบงล่าง (Gel chamber) ที่มีบัฟเฟอร์ TBE จากนั้น ทำการหยุดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา (ผสมสี่ย้อม) ลงไป แล้วทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้น นำเจลที่ได้ไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยชุดวิเคราะห์และถ่ายรูปอะกาโรสเจล

3.5.2.5 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

ทำการเปลี่ยน Total RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้ Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) ปฏิบัติการสังเคราะห์ cDNA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ 1 X Transcriptor reverse transcriptase ไพรเมอร์ RT (RT primer) (โดยออกแบบให้อยู่ปลายด้าน 3' ของยีนที่สนใจ) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครโมลาร์ อาร์เอ็นเอความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สาร dNTPs ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และ สาร Protector RNase inhibitor 10 ยูนิต (ตารางที่ 3.1) นำของผสมของปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เกิดการคลายโครงสร้างทุติยภูมิของอาร์เอ็นเอ จากนั้น ทำการ Preincubate ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการเติมเอนไซม์ Transcriptor reverse transcriptase 10 ยูนิตลงไป เพื่อทำปฏิกิริยาการเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที

ตารางที่ 3.1 ปริมาณของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์ 5 เท่า Transcriptor reverse transcriptase	1 เท่า	4
ไพรเมอร์ RT (10 ไมโครโมลาร์)	2 ไมโครโมลาร์	4
อาร์เอ็นเอ (1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	0.2 ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร	4
Protector RNase Inhibitor (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	10 ยูนิต	0.5
dNTPs (10 มิลลิโมลาร์)	1 มิลลิโมลาร์	2
เอนไซม์ Transcriptor reverse transcriptase (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	10 ยูนิต	0.5
น้ำ DI	-	5
ปริมาตรสุทธิ	-	20

3.5.2.6 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) โดยเติมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งหมด ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex ย้ายของผสมลงในคอลัมน์ที่วางอยู่บน Collection tube นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้น เทส่วนใสทิ้ง ปิดบัฟเฟอร์สำหรับล้าง (Wash buffer) ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง ทำการปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์สำหรับชะ (Elution buffer) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ วางทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

3.5.2.7 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยการตัดออกจากเจล

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) โดยตัดเจลที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ และย้ายเจลลงไปหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ หลังจากนั้น เติมน้ำบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีชิ้นส่วนเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือบ่มจนกระทั่ง เจลละลายหมด ปิดเตาแล้วปล่อยให้เย็นในคอลัมน์ นำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส เติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับล้างปริมาตร 400 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเติมน้ำบัฟเฟอร์สำหรับล้างปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ วางทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส ทำการปั่นแห้งด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม เป็น เวลา 3 นาที จากนั้น ทำการย้ายคอลัมน์ไปวางบนหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมน้ำบัฟเฟอร์ สำหรับชะปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 2 นาที

3.5.2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ PCR หรือพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Big-Dye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin Elmer, USA) ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyzer ที่ First BASE Laboratories (Malaysia) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv (Accession No. AL123456) ที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน (Genbank)

3.5.3 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซิน

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อวัณโรคคือยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ด้วย Agar dilution test (Woodruff and Foster 1946) เริ่มจากการปรับค่าความขุ่นของเชื้อตัวอย่างให้มีค่า เท่ากับค่ามาตรฐาน Mcfarland หมายเลข 1 (มีเซลล์ประมาณ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยนำ โคโลนีของเชื้อตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมากระจายในอาหารเหลว Middlebrook 7H9 ที่เติม OADC ความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 80 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปิดเตา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

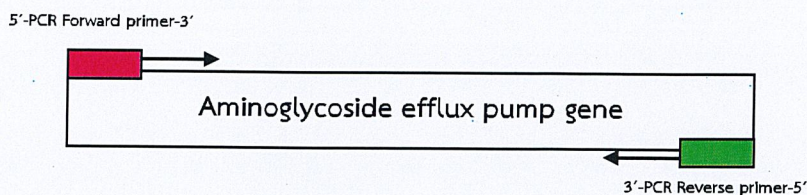
สารละลายเซลล์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มียาปฏิชีวนะอะมิกาซินหรือกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาปฏิชีวนะอะมิกาซินและกานามัยซินที่สามารถทำการยับยั้งการเจริญของเชื้อวัณโรค ต่อยาได้ถึงร้อยละ 99 (Minimum Inhibition Concentration; MIC) เปรียบเทียบกับค่า MIC ต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้กับค่า MIC ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv

3.5.4 วิธีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาคลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

จากการศึกษาข้อมูลจีโนมของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาคลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) ที่น่าสนใจทั้งหมด 16 ยีน ได้แก่ Rv0783c, Rv1145, Rv1146, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c, Rv3065 และยีนที่ควบคุม *whiB7* ออกแบบไพรเมอร์ของยีนเหล่านี้เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.6 แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.8

3.5.4.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาคลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยา Aminoglycoside efflux pump จากฐานข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank) มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 16 คู่ ได้แก่ ยีน Rv0783c, Rv1145, Rv1146, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c, Rv3065 และ *whiB7* ในการออกแบบไพรเมอร์ ทำการออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อการเพิ่มปริมาณของยีนที่ต้องการศึกษา 1 ยีน โดยออกแบบไพรเมอร์ Forward ให้อยู่ในบริเวณส่วนต้นของยีน และไพรเมอร์ Reverse ให้อยู่ในบริเวณส่วนท้ายของยีน เพื่อให้สามารถทำการเพิ่มปริมาณของยีนที่ต้องการศึกษาได้ครบทั้งยีน (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

3.5.4.2 การเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

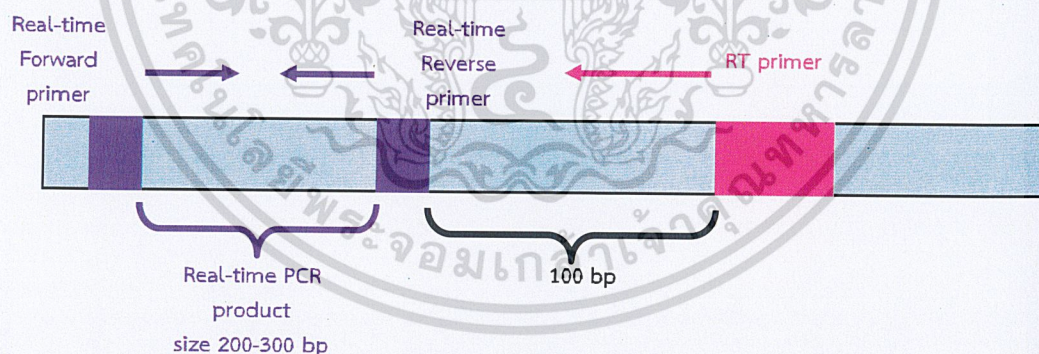
ทำการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจทำการศึกษาด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปฏิกริยา รวมสุดท้ายของ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.4 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ สาร KCl ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์ สาร $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 ยูนิต สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR มีดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย Cycle 35 รอบของ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 นาที และสุดท้าย Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing จะขึ้นอยู่กับการคำนวณค่า T_m ของไพรเมอร์ของแต่ละคู่ที่ใช้ในปฏิกิริยา รวมทั้งเวลาที่ใช้ในขั้นตอน Extension จะขึ้นกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วย เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.5.5 วิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต่อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธี Real-time Quantitative Reverse Transcription-PCR (Real-time qRT-PCR)

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต่อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์จำนวน 16 ยีนด้วยวิธี Real-time qRT-PCR โดยเริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3.5.2.2 และนำไปใช้ในการเตรียม cDNA ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.5 นำ cDNA ที่เตรียมได้มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต่อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธี Real-time qRT-PCR

3.5.5.1 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำ Real-time qRT-PCR

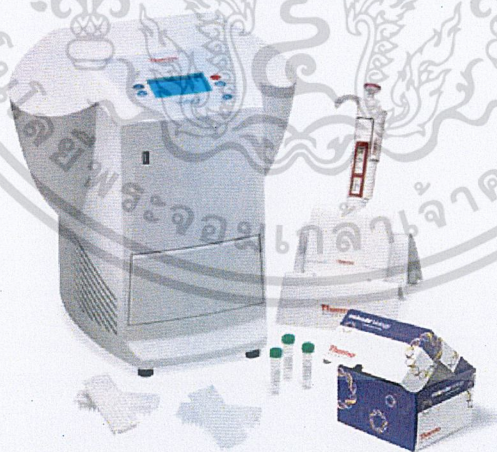
ออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Reverse transcription (RT primer) ที่ใช้เปลี่ยน Total RNA เป็น cDNA ให้ห่างจากไพรเมอร์ของ Reverse ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR ประมาณ 100 คู่เบสขึ้นไป และออกแบบไพรเมอร์ Forward และ Reverse ของการทำปฏิกิริยา PCR ให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดประมาณ 200-500 คู่เบส (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ Real-time qRT-PCR

3.5.5.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real-time qRT-PCR

นำ cDNA มาทำการเพิ่มปริมาณยีน Aminoglycoside efflux pump ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ชุด PrimeScript™ RT Master Mix (Takara, California, USA) ด้วยเครื่อง PikoReal™ 24-well Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA) (รูปที่ 3.3) ปฏิกริยา Real-time PCR ปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ที่มีไพรเมอร์ Forward และ Reverse ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 ไมโครโมลาร์และ cDNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกริยา คือ ขั้นตอน Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน Extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนตั้งแต่ Denaturation จนถึง Extension ทั้งหมด 45 รอบ ในการศึกษาการแสดงออก ใช้ยีน *sigA* เป็นยีนอ้างอิง (Housekeeping gene) และ จะทำการวิเคราะห์ melting curve เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ



รูปที่ 3.3 PikoReal 24-well real-time PCR system machine

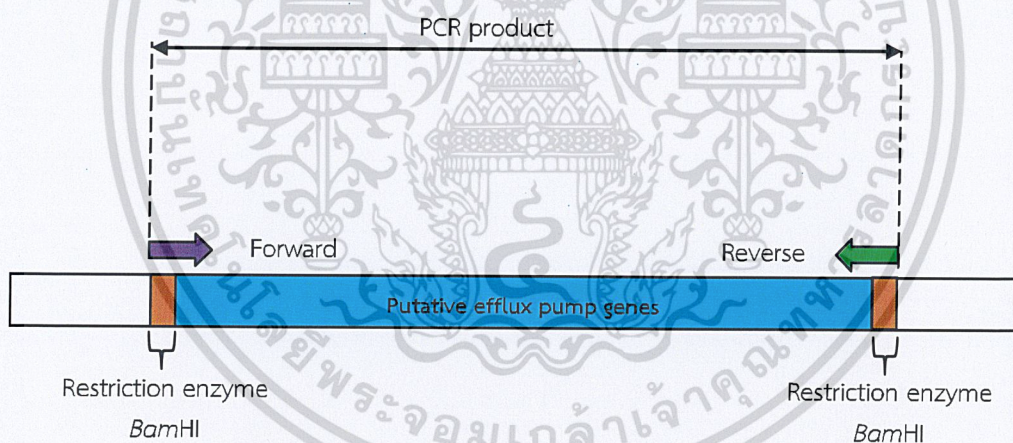
ที่มา: http://realtimepcr.dk/wp-content/uploads/2013/09/pikoReal_inst.png

3.5.6 วิธีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

คัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูง ในเซลล์ที่มีการบ่มในยาอะมิโนไกลโคไซด์ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มีการบ่มในยาอะมิโนไกลโคไซด์ โคลนยีนที่คัดเลือกและทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra และ ศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ต่อการดื้อยาอะมิโนไกลโคไซด์

3.5.6.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนเพื่อใช้ในการทำโคลนยีน

ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำโคลนยีนให้อยู่ที่ตำแหน่งด้านหน้าของ Start codon และหลัง Stop codon โดยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ด้วย (รูปที่ 3.4)



รูปที่ 3.4 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับโคลนยีน

3.5.6.2 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ปริมาตรสุทธิ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl พีเอช 8.4 ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ สาร KCl ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์ สาร $MgCl_2$ ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 ไมโครโมลาร์ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* MT433 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณ 50 นาโนกรัม และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 ยูนิต สภาวะสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ ขั้นที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 นาที เป็นจำนวนรอบทั้งสิ้น 35 รอบ และขั้นสุดท้าย Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ขั้นตอน 3.5.2.4)

3.5.6.3 การเชื่อมต่อพลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pDrive (Qiagen, Germany) โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอแสดงดังตารางที่ 3.2 จากนั้น นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับพลาสมิด pDrive

สารเคมี	ปริมาณ ไมโครลิตร)
ผลิตภัณฑ์ PCR (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
2X Ligation Master Mix	5
pDrive Cloning vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	1
ปริมาตรสุทธิ	10

3.5.6.4 การทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่ *E. coli*

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากปฏิกิริยาการทำ Ligation ในขั้นตอน 3.5.6.3 เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยทำการผสม Competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ (Ligation reaction) จากนั้น แช่น้ำแข็ง 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าไปเกาะกับผนังเซลล์ของเซลล์ให้อาศัย เมื่อครบเวลา นำส่วนผสมทั้งหมดมาบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไปวางบน น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตรลง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปในส่วนผสมทั้งหมด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกลับหลอดพลิกไปมาทุกๆ 10 นาที หลังจากนั้น เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ปิดเตส่วนใสออก ปิดเตอาหาร LB ลงไป 300 ไมโครลิตร กระจายเซลล์ นำสารละลายเซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะยากานามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลาข้ามคืน แล้วจึงทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวนำไปเพาะเลี้ยงตามวิธีการ 3.5.1.2 แล้วจึงนำไปสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามวิธีการ 3.5.2.3 ต่อไป

3.5.6.5 การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งองค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการตัดพลาสมิดแสดงดังตารางที่ 3.3 นำของผสมนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน วิเคราะห์ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการที่ 3.5.2.8

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
บัฟเฟอร์เอช (10 เท่า)	1
พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1
น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	3
ปริมาตรสุทธิ	10

3.5.6.6 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 กับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

นำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งสองมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยใช้ องค์ประกอบและปริมาณของสารดังแสดงในตารางที่ 3.4 นำสารผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ *Bam*HI และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction kit (Geneaid, Taiwan) โดยการตัดจากเจลตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.2.7

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 หรือและพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	80
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	12
บัฟเฟอร์ 10x NEB	12
สารละลาย BSA (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	12
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	4
ปริมาตรสุทธิ	120

3.5.6.7 การทำปฏิกิริยา Dephosphorylation

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มาทำ ปฏิกิริยา Dephosphorylation เพื่อกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ด้วยเอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) โดยใช้องค์ประกอบและปริมาณของสารดังแสดงในตารางที่ 3.5 นำ ส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น เติมเอนไซม์ CIAP เพิ่มอีก 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้น หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม บัฟเฟอร์สำหรับหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ CIAP (CIAP stop buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยตัวทำละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (Phenol-chloroform extraction) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมอะซีเตตปริมาตร 0.5 เท่า และเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด สุดท้าย ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE พีเอช 7.5 และวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ขั้นตอนที่ 3.5.2.4)

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Dephosphorylation ของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1/ <i>Bam</i> HI (24 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	18
เอนไซม์ Calf Intestinal Alkaline Phosphatase หรือ CIAP (0.01 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	4
บัฟเฟอร์ 10x CIAP	4
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	14
ปริมาตรสุทธิ	40

3.5.6.8 การทำปฏิกิริยา Ligation ระหว่างพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ผ่านการทำปฏิกิริยา Dephosphorylation และผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเชื่อมต่อ (Ligaton) กับดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้องค์ประกอบและปริมาตรของสารดังแสดงในตารางที่ 3.6 จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำผลิตภัณฑ์ Ligation ที่ได้ไปทำการทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* ตามวิธีการในหัวข้อ 3.5.6.4

คัดเลือกโคลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็งที่มียาไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB แล้วสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 3.6 องค์ประกอบของปฏิกิริยา Ligation

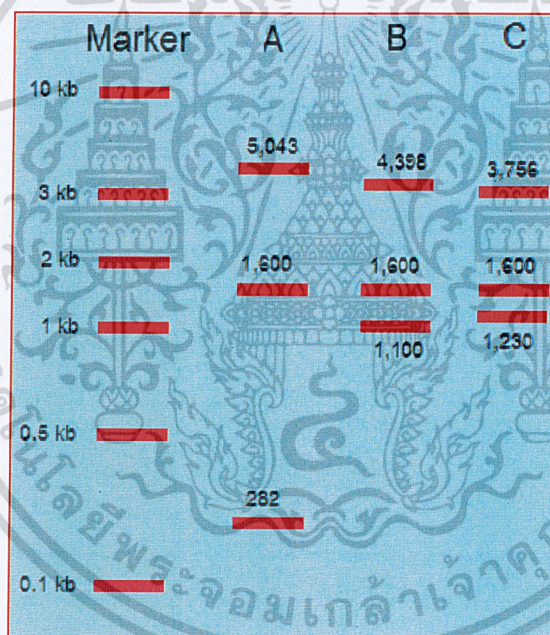
ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1/ <i>Bam</i> HI/CIAP/Purify (22.48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ/ <i>Bam</i> HI/Dephosphorylation/Purify (11.63 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4
บัฟเฟอร์ ligation 10X	1.5
เอนไซม์ T4 ligase (0.15 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.5
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6
ปริมาตรสุทธิ	15

3.5.6.9 การตรวจสอบทิศทางของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

การตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ทำได้โดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I โดยใช้องค์ประกอบและปริมาณของสารดังแสดงในตารางที่ 3.7 หลังจากนั้น บ่มสารผสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I จะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.5

ตารางที่ 3.7 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ด้วยเอนไซม์ *Nru*I

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 (40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10
บัฟเฟอร์ ligation 10X	2
เอนไซม์ <i>Nru</i> I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	6
ปริมาตรสุทธิ	20



รูปที่ 3.5 รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่ได้ของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

3.5.6.10 การทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis*

H37Ra ด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรเซชัน

นำพลาสมิดลูกผสมที่ได้จากการโคลนยีนเข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ด้วยวิธี

Electroporation โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาผสม

เอ็กสเตรนเป็นเอ็กสเตรนที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ไมออนูเอตเตนไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับ Competent cell ของเซลล์ให้อาศัย *M. tuberculosis* H37Ra ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น นำส่วนผสมทั้งหมดไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายลงในคิวเวต คิวเวตนี้จะถูกนำไปวางในช่อง ให้กระแสไฟฟ้า 2.5 กิโลโวลต์ จากนั้น นำคิวเวตไปวางบนน้ำแข็งทันที บ่มในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้ทั้งหมดปริมาตร 200 ไมโครลิตรจะถูกนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นำโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ที่มีฟลอสติดเอนเอลลูกผสมมาทดสอบความไวต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ตามวิธีการที่ 3.5.2.3



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

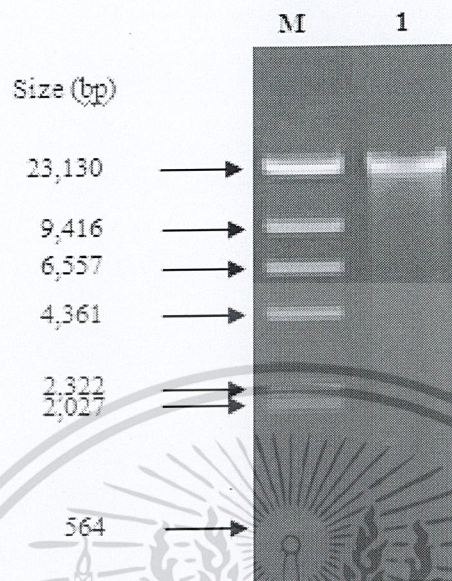
4.1 ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มี

ความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ เชื้อ *M. tuberculosis* 24433 ที่มีรายงานมาแล้วว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ดื้อยากานามัยซินแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis*, *tap* และ *whiB7* จากการนำ *M. tuberculosis* 24433 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 2 เดือน และนำเชื้อที่เจริญมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ หลังจากนั้น นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยา ที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์จำนวน 16 ยีน ได้แก่ Rv0783c, Rv1145, Rv1146, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c, Rv3065 และ Rv3197A (*whiB7*) ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านี้

4.1.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* 24433

จากการนำเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 ที่เจริญเติบโตบนอาหารแข็ง Middlebrook 7H10 มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 3.5.2.1 แล้วนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์จีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 ที่สกัดได้ 1 แถบ โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเออื่นๆ (รูปที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 กับขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* พบว่า จีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 23,130 คู่เบส (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* 24433 สายพันธุ์ที่ติดต่อยากานามัยซิน
เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
เลน 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433

4.1.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์จำนวนทั้งหมด 16 ยีนด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) พบว่าจะได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 คู่ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดีয়োที่มีความสามารถในการจับยากกลุ่มอะมิโนโกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

Genes	Primers	Annealing Temp (°C)	PCR Product Size (bp)
Rv0783c	5'-GGACCCTGACCAGCGCAGAA-3' 5'-GATCCCAACGCCCGGGCGAA-3'	60	1,851
Rv1145	5'-CGAGCGCCCGCATGCGTATC-3' 5'-AGTCGGCGCACGTCCAACGC-3'	60	1,154
Rv1146	5'-ATCCGGACCATGGCGCTTCG-3' 5'-CGTCGTTTCTCCGATGGGCG-5'	58	1,640
Rv1250	5'-GGTTCACCGCTCGAAGCGGA-5' 5'-GCAGGCACCGGTGGTCTTCA-5'	58	1,986
Rv1258c	5'-CAGGCCGGCCCTATGCAGTG-3' 5'-CGGTCTTGCCGGTAGCCGTC-3'	60	1,847
Rv1410c	5'-GGCACAGGCCAGTTGGACC-3' 5'-CGATGACGTCGGGGTGCCA-3'	60	1,761
Rv1456c	5'-CCCGGCTTCGCGACACTGCA-3' 5'-CTGGGCTGGCAGTGCTGGA-3'	60	1,105
Rv1457c	5'-CACCGCGTGGTGCGCAGAAA-3' 5'-CTGTAGTACGGGCGGACCGG-3'	60	989
Rv1458c	5'-CGCCGACGACGATGCAGAGC-3' 5'-TCCAGGCTGAACTGTGCGGC-3'	60	1,138

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

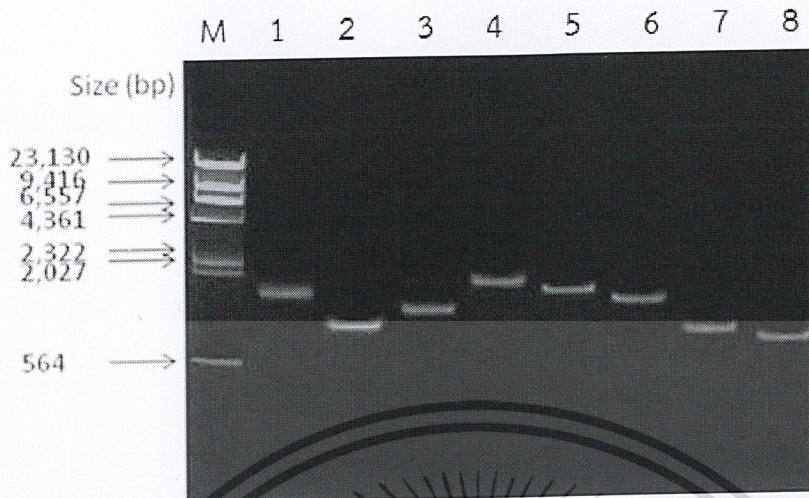
ตารางที่ 4.1 (ต่อ) โพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (ต่อ)

Genes	Primers	Annealing Temp	PCR Product
		(°C)	Size (bp)
Rv1634	5'-GCACAGATGATGGCGGCCGC-3' 5'-CGGGAACAGGCTTCGGGCGC-3'	62	1,629
Rv1819c	5'-ATGGTCTGGGCCGGGCGGT-3' 5'-GTCAACACCCTGTGGCCCCG-3'	62	2,146
Rv1877	5'-TCTCTCGCCACCGACCTGA-3' 5'-CGACGCCCTCTGCCTCCAAT-3'	58	2,280
Rv2333c	5'-ATCGACCGAAGCGGTGACG-3' 5'-TCCCGGAGACTCGCTGTTGC-3'	58	1,820
Rv2846c	5'-GCCGACACGCCGAGAAGGT-3' 5'-TCCGGGTGATCACAGGCGGC-3'	60	1,824
Rv3065	5'-TTAGGCGGGTTCGCAAGCGCG-3' 5'-GCTCAGCCCGCCAAGGCCCT-3'	62	540
Rv3197A (<i>whiB7</i>)	5'-GCTGGTTCGCGGTCGACCT-3' 5'-CGGGTATCGGCGAACCACA-3'	60	550

4.1.3 ผลการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ปริมาณของสารเคมีและสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนแสดงดังวิธีการในหัวข้อ 3.5.4.2 จากการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ของทุกยีนมีขนาดตรงกับขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้ (รูปที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลิตรหัส PCR ของยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มี
ความสามารถในการขับยาอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิริยาถูกโซ่พอลิเมอเรส

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 1 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv0783c (*emrB*) ขนาด 1,851 bp

เลน 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1145 (*mmpL13a*) ขนาด 1,154 bp

เลน 3 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1146 (*mmpL13b*) ขนาด 1,640 bp

เลน 4 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1250 ขนาด 1,986 bp

เลน 5 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1258c (*tap*) ขนาด 1,847 bp

เลน 6 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1410c ขนาด 1,761 bp

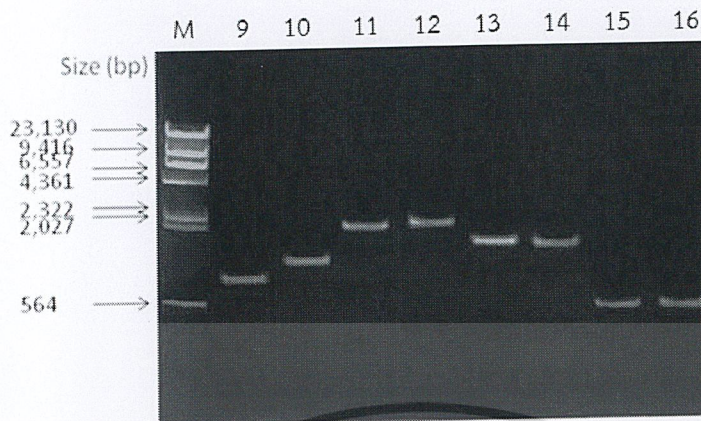
เลน 7 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1456c ขนาด 1,105 bp

เลน 8 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1457c ขนาด 989 bp

เลน 9 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1458c ขนาด 1,138 bp

เลน 10 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1634 ขนาด 1,629 bp

เลน 11 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1819c ขนาด 2,146 bp



รูปที่ 4.2 (ต่อ) ผลิตรหัส PCR ของยีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มี
ความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 9 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1458c ขนาด 1,138 bp

เลน 10 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1634 ขนาด 1,629 bp

เลน 11 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1819c ขนาด 2,146 bp

เลน 12 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv1877 ขนาด 2,280 bp

เลน 13 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv2333c (*tap*) ขนาด 1,820 bp

เลน 14 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv2846c ขนาด 1,824 bp

เลน 15 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv3065 ขนาด 540 bp

เลน 16 คือ ผลิตรหัส PCR ของ Rv3197A ขนาด 550 bp

4.1.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มี
ความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

จากการนำผลิตรหัส PCR ที่ได้ทั้งหมดทุกยีนมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GeV/PCR DNA
Fragments Extraction Kit ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.6 จากนั้น นำผลิตรหัส PCR ที่ผ่านการทำให้
บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามวิธีการในข้อ 3.5.2.8 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ยีนทั้งหมดเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ที่ได้รายงานไว้ใน
ธนาคารยีน พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนใหญ่ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv แต่จะแตกต่างที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Rv1250 ที่พบเบสไซโตซีนที่ตำแหน่ง 502 แทนที่จะเป็นไทมีน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433

Genes	Nucleotide change	Amino acid change	Synonymous or non-synonymous
Rv0783c	wt	wt	wt
Rv1145	wt	wt	wt
Rv1146	wt	wt	wt
Rv1250	C502T	wt	Syn
Rv1258c	wt	wt	wt
Rv1410c	wt	wt	wt
Rv1456c	wt	wt	wt
Rv1457c	wt	wt	wt
Rv1458c	wt	wt	wt
Rv1634	wt	wt	wt
Rv1819c	wt	wt	wt
Rv1877	wt	wt	wt
Rv2333c	wt	wt	wt
Rv2846c	wt	wt	wt
Rv3065	wt	wt	wt
Rv3197A	wt	wt	wt

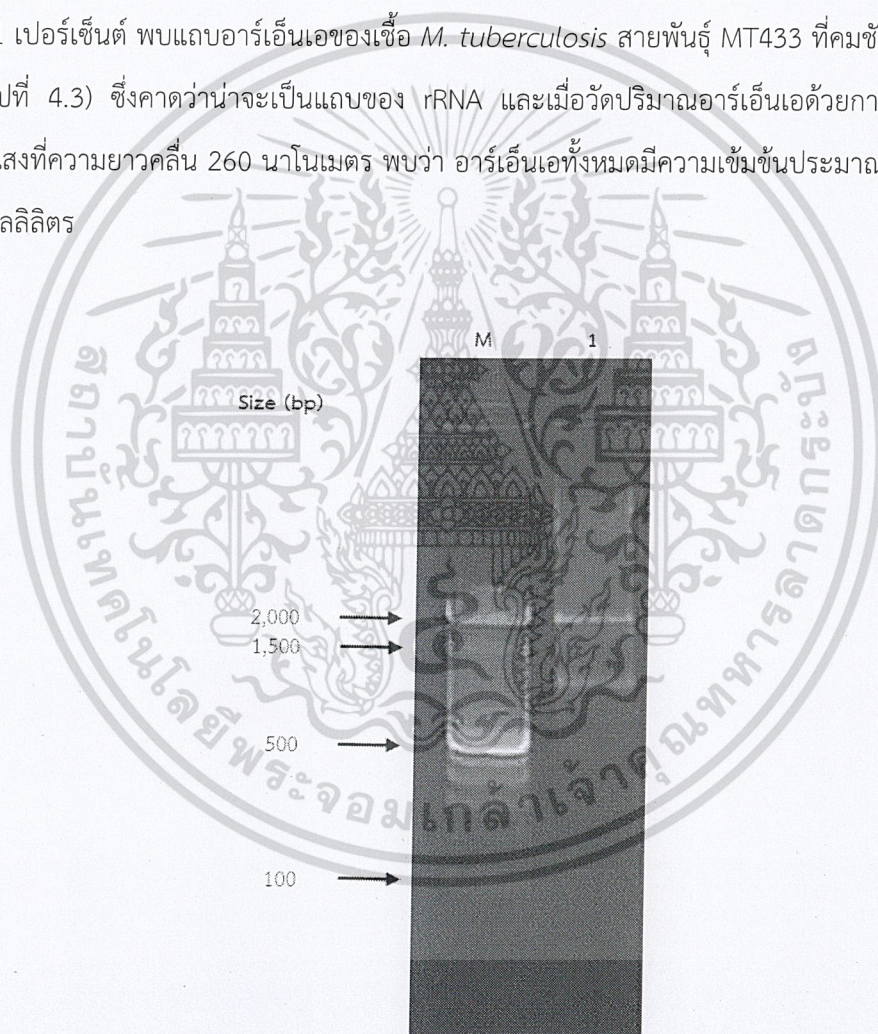
wt = wildtype

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการติดยาที่มีความสามารถในการยับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

4.2.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433

จากการสกัดอาร์เอ็นเอและทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion, USA) ตามวิธีในข้อ 3.5.2.2 และนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบอาร์เอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ MT433 ที่คมชัดจำนวน 2 แถบ (รูปที่ 4.3) ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นแถบของ rRNA และเมื่อวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่า อาร์เอ็นเอทั้งหมดมีความเข้มข้นประมาณ 40 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.3 อาร์เอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ MT433

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เลน 1 คือ อาร์เอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ MT433

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA และสำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการติดยาที่มีความสามารถในการจับยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วย Real time PCR

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA หรือเรียกว่า ไพรเมอร์ RT จากบริเวณที่มีความจำเพาะสูงกับยีนที่จะทำการศึกษา และให้อยู่ในบริเวณช่วงท้าย (C-terminal) ของทุกยีน โดยให้มีความอุณหภูมิของการหลอมตัว (T_m) ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.3) และออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค Real time PCR เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน โดยออกแบบ Reverse primer ให้ห่างจากไพรเมอร์ RT ประมาณ 100 คู่เบส มีความอุณหภูมิของการหลอมตัวใกล้เคียงกัน และให้ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 200-300 คู่เบส (ตารางที่ 4.4)



ตารางที่ 4.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA (ไพรเมอร์ RT) ของยีนที่ใช้ในการศึกษา

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิของการหลอมตัว (°C)
Rv0783c	RT-Rv0783c	5'-GAATGCCGGGGGATCAGCG-3'	60
Rv1145	RT-Rv1145	5'-TCGGGAACAGCGCAGTCGCC-3'	61
Rv1146	RT-Rv1146	5'-CCATTGCCGCTCAGCGAGGC-3'	62
Rv1250	RT-Rv1250	5'-GCGGCTGGGTGTCGCAATCC-3'	59
Rv1258c	RT-Rv1258c	5'-GAGCCGATCCTACGGGCCGA-3'	59
Rv1410c	RT-Rv1410c	5'-ACAGACCTAGCACCCGCCG-3'	61
Rv1456c	RT-Rv1456c	5'-GGCACCGCCACGTGAATGG-3'	58
Rv1457c	RT-Rv1457c	5'-GCCCCACACCGCTAGGACGA-3'	58
Rv1458c	RT-Rv1458c	5'-CTGCCGCAACTTCCTGCCGG-3'	60
Rv1634	RT-Rv1634	5'-CAACGGGTAAGCCCGGTC-3'	60
Rv1819c	RT-Rv1819c	5'-TTACACTTCGGGGGCCCGC-3'	61
Rv1877	RT-Rv1877	5'-GAACGAGCACCGCTCGGTG-3'	60
Rv2333c	RT-Rv2333c	5'-GCGCACTCGACGGTCATCGC-3'	61
Rv2846c	RT-Rv2846c	5'-ACAGCTGCCGGCGTCGATC-3'	62
Rv3065	RT-Rv3065	5'-GGCACCGCCAGGTTCAACG-3'	58
Rv3917A	RT-Rv3917A	5'-GCATCCTTGGGGGACGTCC-3'	60

ตารางที่ 4.4 โพรเบอส์สำหรับปฏิบัติการเพิ่มปริมาณยีนที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค Real time PCR

ยีน	โพรเบอส์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิของการหลอมตัว (°C)
Rv0783c	F Rv0783c	5'-TGGGCATGGGCATGGGCTGC-3'	60
	R Rv0783c	5'-CGAGGAAGGTCAACCGCCG-3'	59
Rv1145	F Rv1145	5'-GGCGGCTCGCGGATGGAGTA-3'	60
	R Rv1145	5'-CGATAGCCAACGGAGGCC-3'	60
Rv1146	F Rv1146	5'-GCCGCCAACGAGAGCGT-3'	61
	R Rv1146	5'-GCTCATGCAGCCACGCCAGG-3'	61
Rv1250	F Rv1250	5'-ACCTGGCCGGTGGAGCTCA-3'	61
	R Rv1250	5'-AGGGGACGAAAGCGGGCAA-3'	61
Rv1258c	F Rv1258c	5'-GGTCATCGCGTTCCTGCCGC-3'	60
	R Rv1258c	5'-GGCATGCAGTCCAGCGGCGT-3'	61
Rv1410c	F Rv1410c	5'-TGCCGGCGATGCACACCGAC-3'	60
	R Rv1410c	5'-AGGCTGGCGTTGGCGGGAT-3'	61
Rv1456c	F Rv1456c	5'-ACGGGCACGCTAGTCACGGC-3'	60
	R Rv1456c	5'-AACCTGGCCGGGTGCTGGT-3'	61
Rv1457c	F Rv1457c	5'-TCGGCTTTGGCTCGGCTGG-3'	62
	R Rv1457c	5'-CGCCGTCGGGATCACGTTCCG-3'	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณยีนที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค Real time PCR (ต่อ)

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	อุณหภูมิของการหลอมตัว (°C)
Rv1458c	F Rv1458c	5'-GCGATGGCGTGACCGTGGTG-3'	59
	R Rv1458c	5'-ACCTGGGGTCAACCGGACC-3'	60
Rv1634	F Rv1634	5'-GGTGATGGCGTCGGGGTTGG-3'	58
	R Rv1634	5'-TGACCACACACCGGCCAGC-3'	58
Rv1819c	F Rv1819c	5'-CACGCTGACCAAGGTGGCGC-3'	60
	R Rv1819c	5'-TGCAGTCCGGCAGCTCGCTG-3'	62
Rv1877	F Rv1877	5'-TGCCGAACGGGGTCCGACTG-3'	60
	R Rv1877	5'-GGGAGTCGACCTGACGGTGC-3'	57
Rv2333c	F Rv2333c	5'-CCGCCCTGGCTTTCGGCCACA-3'	61
	R Rv2333c	5'-CAGTGGCGACGAGCAACGCC-3'	61
Rv2846c	F Rv2846c	5'-TGGCCGTCGTCCCGTGACT-3'	60
	R Rv2846c	5'-CCCACAGAGGCCGTAGGTG-3'	59
Rv3065	F Rv3065	5'-CTCTTGTGGCGGATCTTCGGGG-3'	63
	R Rv3065	5'-GGCGACCAGCACAATGGCGG-3'	60
Rv3917A	F Rv3917A	5'-CTGACAGTCCCCAGACAGACCC-3'	57
	R Rv3917A	5'-CACCCACCCAAACGCCCCAG-3'	57

4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ด้วยวิธี Real-time quantitative reverse transcription PCR (Real-time qRT-PCR)

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์ cDNA ในหัวข้อ 4.2.2 มาใช้สร้าง cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 (หัวข้อ 4.2.1) ที่บ่มภายใต้สภาวะที่มีและไม่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำ cDNA ที่ได้ไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับการศึกษา ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real-time qRT-PCR ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จะทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกยีนกับยีน *sigA* (Housekeeping gene) ซึ่งใช้เป็นยีนอ้างอิง และเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกับเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการดื้อยากานามัยซินและมีการกลายพันธุ์ของยีน *rrs* จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการบ่มเซลล์ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ในยากานามัยซิน เซลล์จะมีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์สูงจำนวน 3 ยีน คือ ยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c โดยมีระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษามากกว่าระดับการแสดงออกของยีน *sigA* อย่างน้อย 2 เท่า และมีระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษามากกว่าระดับการแสดงออกของยีนนั้นในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164 มากกว่า 1.5 เท่า (ตารางที่ 4.5) นำยีนทั้ง 3 ยีนนี้ มาใช้ในการศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ต่อไป

ตารางที่ 4.5 ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันยาเข้าสู่เซลล์หรือขับยาออกจากเซลล์ที่ื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์

กลุ่มของ Efflux pump	ยีน efflux pump	ระดับการแสดงออกของยีน			
		24433	24433+km	17164	17164+km
MFS	<i>sigA</i>	1	0.315437	1	0.135379
	Rv0783	1	0.111129	1	24.685430
	Rv1250	1	0.327203	1	1.339369
	Rv1258c	1	5.96304	1	40344463
	Rv1410c	1	1.983136	1	3.61069
	Rv1634	1	0.689276	1	0.477137
	Rv1877	1	22.7848	1	0.9070439
	Rv2333c	1	0.679467	1	1.098081
	Rv2846c	1	1.556306	1	0.598081
	ABC	Rv1456c	1	1.053873	1
Rv1457c		1	0.000904	1	0.000266
Rv1458c		1	0.798272	1	0.722309
Rv1819c		1	2.554083	1	1.946058
RND	Rv1145	1	0.199029	1	195.0613
	Rv1146	1	1.294868	1	4.253993
SMR	Rv3065	1	1.210873	1	2.723429
<i>whiB7</i>	Rv3197A	1	17070298	1	6757816

หมายเหตุ ระดับการแสดงออกของยีนของเชื้อ *M. tuberculosis* MT433 และ *M. tuberculosis* MT164 ที่ไม่ได้ปมยาจะเป็น 1 เสมอ หากค่าการแสดงออกของยีนในเชื้อที่ปมยาน้อยกว่า 1 หมายถึงมีระดับการแสดงออกของยีนลดลง (Down regulation) หรือมากกว่า 1 หมายถึงมีระดับการแสดงออกของยีนมากขึ้น (Up regulation)

4.3 การศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่มีระดับการแสดงออกสูงเมื่อปมเซลล์ในยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

ในการศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c จะทำการโคลนยีนทั้งสามชนิดเข้าไปในพลาสมิดดีเอ็นเอที่สามารถแสดงออกได้ในเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra (เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคในคนและใช้เป็นตัวแทนของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ก่อโรคในคน)

4.3.1 การโคลนยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c เข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive

4.3.1.1 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c และออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 3 ชนิด โดยผลการออกแบบไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 4.6

4.3.1.2 ผลการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Rv1819c Rv1877 และ Rv2846c ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

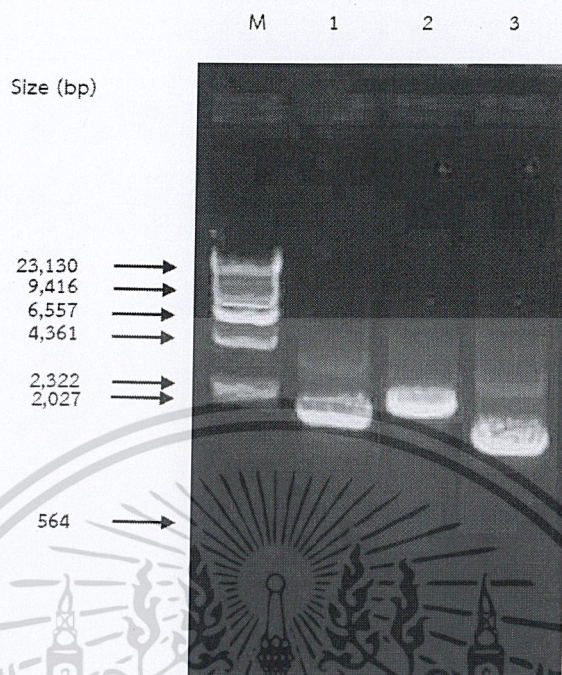
จากการเพิ่มปริมาณยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์และทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction โดยผ่านคอลัมน์เพื่อขจัดสารเคมีหรือสิ่งปนเปื้อนที่รบกวนปฏิกิริยาการตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Rv1819c Rv1877 และ Rv2846c มี ขนาดประมาณ 1,600-2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.4) ซึ่งเป็นขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใกล้เคียงกับ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดหวังไว้

ตารางที่ 4.6 ไพรมเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ยีนทั้ง 3 ชนิด

ยีน Efflux pump	ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์	อุณหภูมิการหลอม ตัว(°C)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
PCR primer				
Rv1819c	F Rv1819C-BamHI	5'-GGATCCTTGGGCCCGAAATGTTTAA-3'	62	1,932
	R Rv1819C-BamHI	5'-GGATCCTTACACTTCGGCGGGCCGCG-3'	66	
Rv1877	F Rv1877-BamHI	5'-GGATCCATGGGGGCCCA-3'	60	2,076
	R Rv1877-BamHI	5'-GGATCCCTACGTTGTAGCCGCGA-3'	60	
Rv2846c	F Rv2846C-BamHI	5'-GGATCCATGACGGCTCTCAACGACAC-3'	64	1,605
	R Rv2846C-BamHI	5'-GGATCCTTACAGCTCGCCGGGCTCGA-3'	66	
Sequencing primer				
Rv1819c	FM1 Rv1819C	5'-AGGGGCACTCCGAATGCTCC-3'	61	
	FM2 Rv1819	5'-CCGAGCGACGACGAGTCCGT-3'	61	
	RM1 Rv1819C	5'-TGATCGACTGCACGGGCCCG-3'	60	
	RM2 Rv1819C	5'-GCAGCGTGGTCTTGCCGGC-3'	60	

ตารางที่ 4.6 โพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและสำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR ยีนทั้ง 3 ชนิด (ต่อ)

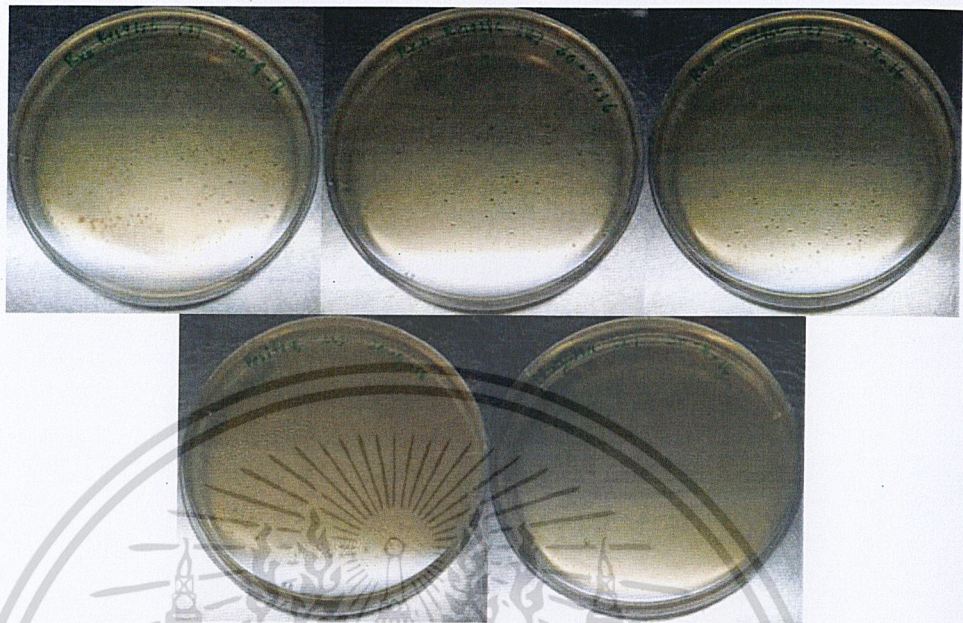
ยีน Efflux pump	โพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโพรเมอร์	อุณหภูมิการหลอมตัว (°C)	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR (bp)
Sequencing primer	Rv1877	5'-CGCGGTGCTGACAGTGGCG-3'	61	
		5'-GTCGGGGCGCCGTGCTGT-3'	59	
		5'-GCCACAGCGATGACCAGGATCC-3'	60	
		5'-GGGGCGGCCATGCTCTGG-3'	59	
Rv2846c	FM1 Rv2846C	5'-CCATCGGGGGCAAGCAACC-3'	60	
	FM2 Rv2846C	5'-CGTCTGCATCGGCCCTGTACGTG-3'	60	
	RM1 Rv2846C	5'-CCCTTGGGGAACGTGGTCCG-3'	60	
	RM2 Rv2846C	5'-CTGCGAGGACACACCTAGGCC-3'	60	



รูปที่ 4.4 ผลิตรหัส PCR ของยีน Efflux pump Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c
 เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 เลน 1 คือ ผลิตรหัส PCR ยีน Rv1819c
 เลน 2 คือ ผลิตรหัส PCR ยีน Rv1877
 เลน 3 คือ ผลิตรหัส PCR ยีน Rv2846c

4.3.1.3 ผลการเชื่อมต่อผลิตรหัส PCR ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c กับ
 พลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5 α

หลังจากการตรวจสอบความถูกต้องของผลิตรหัส PCR ของยีน Rv1819c, Rv1877
 และ Rv2846c แล้ว นำผลิตรหัส PCR ของทั้งสามยีนนี้มาทำให้บริสุทธิ์และนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด
 ดีเอ็นเอ pDrive ทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์โฮสต์ *E. coli* DH5 α คัดเลือก
 โคลนีสีขาวจาก Blue white screening (รูปที่ 4.5) นำโคลนเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่
 มียาปฏิชีวนะเพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมต่อไป

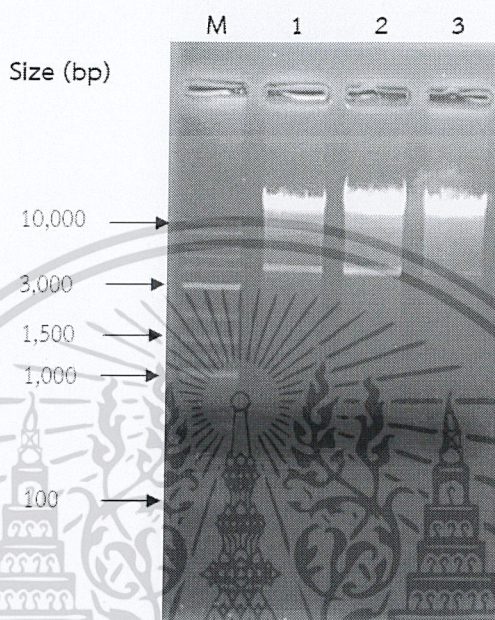


รูปที่ 4.5 โคลนีเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive

4.3.1.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pDrive และผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการเชื่อมของพลาสมิด pDrive กับผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 3 ยีน คือ ยีน Rv1819c Rv1877 และ Rv2846c แล้วนำพลาสมิดดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ได้พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม 3 ชนิด คือ pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c (รูปที่ 4.6) จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 3 ชนิดมาตรวจสอบการมีอยู่ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเหล่านี้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* หลังจากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากการทดลองพบว่า เมื่อตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมทั้ง 3 ชนิด คือ pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบของพลาสมิดดีเอ็นเอ pDrive ที่ขนาดประมาณ 3,850 คู่เบส และแถบของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสามยีนที่มีขนาดประมาณ 1,600-2,000 คู่เบส (รูปที่ 4.7) แสดงให้เห็นว่าพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเหล่านี้มีผลิตภัณฑ์

PCR ของยีนทั้งสามอยู่ จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมทั้งหมดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของยีนทั้ง 3 ชนิดมีความถูกต้อง



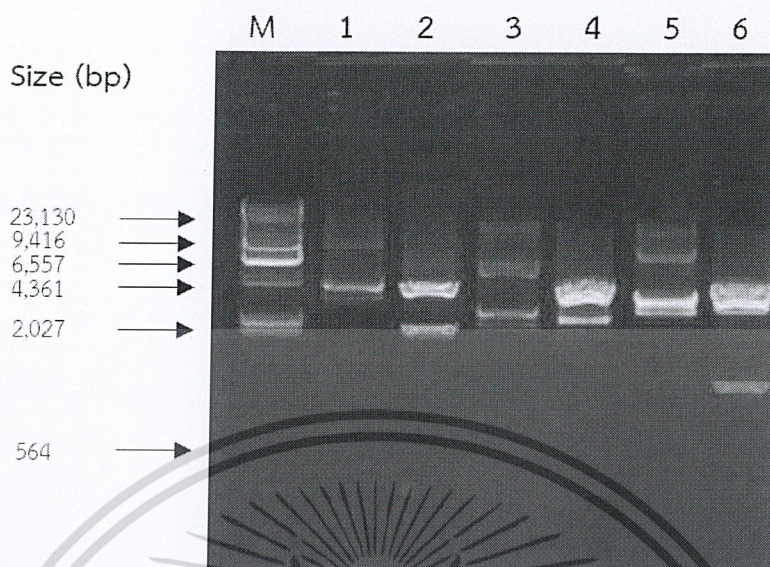
รูปที่ 4.6 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของ pDrive กับยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1877

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv2846c



รูปที่ 4.7 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา λ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1877

เลน 4 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1877 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

เลน 5 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv2846c

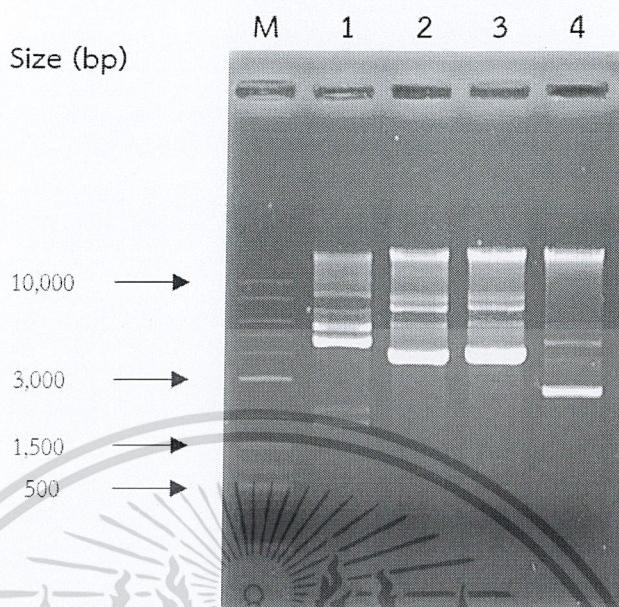
เลน 6 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv2846c ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

4.3.2 การโคลนยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c เข้าสู่พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1

4.3.2.1 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c

จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c ด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ High-speed Plasmid Mini kit (Geneaid, Taiwan) และนำพลาสมิดดีเอ็นเอทั้งหมดนำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ได้พลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการ (รูปที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1877

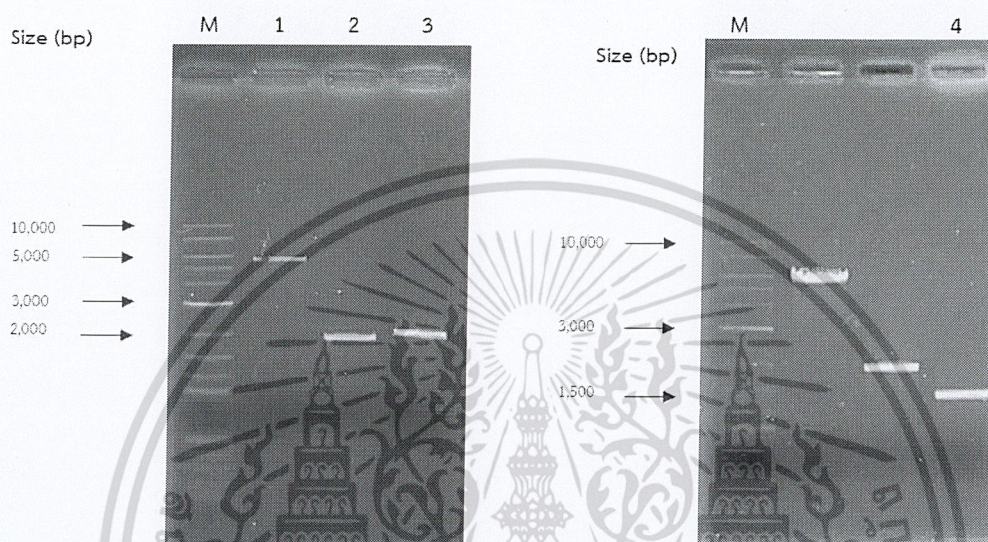
เลน 4 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv2846c

4.3.2.2 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และการทำ dephosphorylation

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c, pDrive-Rv1877 และ pDrive-Rv2846c มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการและนำไปทำให้บริสุทธิ์ ก่อนนำไปกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' หรือทำปฏิกิริยา dephosphorylation จากนั้น นำพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดเท่ากับ 5,817 คู่เบส และชิ้นส่วนของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่ได้จากการตัดพลาสมิดลูกผสมทั้งสามด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีขนาดประมาณ 1,900, 2,000 และ 1,600 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 และยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA

เลน 1 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เลน 2 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1819c ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1819c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เลน 3 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1877 ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv1877 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เลน 4 คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv2846c ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pDrive-Rv2846c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และผ่านการทำให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.3 ผลการเชื่อมต่อของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c และการทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5 α

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 มาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ด้วยเอนไซม์ไลเกส จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อมาทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat-shock แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะไฮโกลมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่า ประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันมีค่าประมาณ 10^3 - 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) (รูปที่ 4.10) จากนั้น จึงทำการสุ่มโคโลนีของแต่ละพลาสมิดชนิดละ 4 โคโลนีมาทำการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมต่อไป



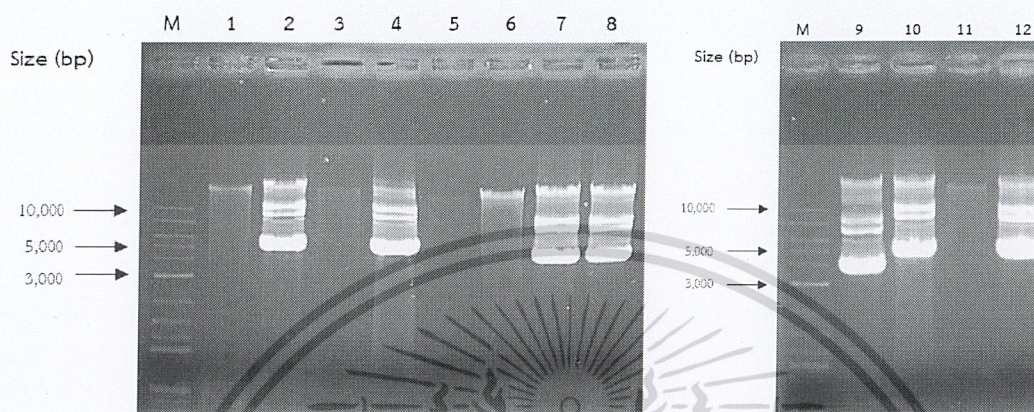
รูปที่ 4.10 โคโลนีของเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอยีน Rv1819c Rv1877 และ Rv2846c

4.3.2.4 ผลการตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Nrul

จากการนำโคโลนีของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ของทั้ง 3 ยีนๆ ละ 4 โคโลนีมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า ปรากฏแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ชัดเจนในโคโลนีทั้งหมด 7 โคโลนี เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ภายนอกการดำเนินงาน ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ Rv1819c-2, Rv1819c-4, Rv1877-3, Rv1877-4, Rv2846c-1, Rv2846c-2 และ Rv2846c-4 (รูปที่ 4.11)



รูปที่ 4.11 พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-1

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-2

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-3

เลน 4 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-4

เลน 5 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-1

เลน 6 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-2

เลน 7 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-3

เลน 8 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-4

เลน 9 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-1

เลน 10 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-2

เลน 11 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-3

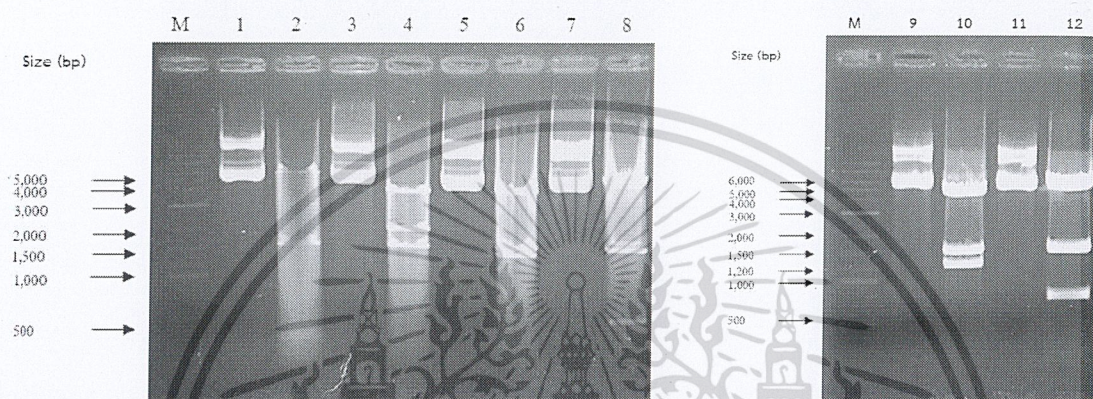
เลน 12 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-4

จากนั้น นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของทั้ง 3 ยีนๆ ละ 2 พลาสมิด คือ pSMT1-

Rv1819c-2, pSMT1-Rv1819c-4, pSMT1-Rv1877-3, pSMT1-Rv1877-4, pSMT1-Rv2846c-2 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pSMT1-Rv2846c-4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I นำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปวิเคราะห์ด้วยในอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์พบว่า พลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 กับยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้อง ตรงกับรูปแบบของขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดหวังไว้ (รูปที่ 4.12)



รูปที่ 4.12 ผลการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ที่มียีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-log DNA

เลน 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-2

เลน 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน 3 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-4

เลน 4 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1819c-4 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน 5 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-3

เลน 6 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-3 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน 7 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-4

เลน 8 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv1877-4 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน 9 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-2

เลน 10 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-2 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เลน 11 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-4

เลน 12 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1-Rv2846c-4 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nru*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.5 ผลการทรานสฟอร์มพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c เข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra

จากการนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c มาทรานสฟอร์มเข้าสู่เชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra พบว่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเมชันมีค่าประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) (รูปที่ 4.13) จากนั้น นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ด้วยการหาค่า Minimal Inhibitor Concentrations (MICs) ต่อไป



รูปที่ 4.13 โคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมระหว่างพลาสมิด pSMT1 กับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c

4.3.3 ผลการศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ต่อการดื้อยากานามัยซินด้วยวิธีการหาค่า Minimal Inhibitor concentrations (MICs)

นำโคโลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมของพลาสมิด pSMT1 กับยีนทั้ง 3 ยีนที่มีทิศทางการเชื่อมต่อนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกต้อง (3 ตัวอย่าง) และไม่ถูกต้อง (2 ตัวอย่าง) มาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MICs) ด้วยวิธี Agar dilution test โดยใช้ยาปฏิชีวนะที่ใช้เป็นตัวแทนของยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ คือ กานามัยซิน ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ยากานามัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ ใช้โคโลนีที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pSMT1 เป็น Positive control และโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra เป็น Negative control จากการทดลองพบว่า ยีน Rv1819c และ Rv1877 แสดงผลเป็นบวก (+) ที่น่าจะมี ความเกี่ยวข้องกับ การดื้อยาทานามัยซินในระดับต่ำ (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ค่า MICs ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Ra ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม pSMT1 ที่มียีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ดื้อยาทานามัยซิน

พลาสมิดดีเอ็นเอ ลูกผสม	ความเข้มข้นของยาทานามัยซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	5	10	20
Rv1819C-1 (C)	+	-	-
Rv1819C-2 (C)	-	-	-
Rv1819C-3 (C)	-	-	-
Rv1819C-4 (I)	-	-	-
Rv1819C-5 (I)	-	-	-
Rv1877-1 (C)	+	-	-
Rv1877-2 (C)	+	-	-
Rv1877-3 (C)	+	-	-
Rv1877-4 (I)	-	-	-
Rv1877-5 (I)	-	-	-
Rv2846C-1 (C)	-	-	-
Rv2846C-2 (C)	++	-	-
Rv2846C-3 (C)	-	-	-
Rv2846C-4 (I)	-	-	-
Rv2846C-5 (I)	++	-	-
Positive pSMT1	+	-	-
Negative H37Ra	-	-	-

C คือ ทิศทางถูกต้อง I คือ ทิศทางไม่ถูกต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาต้านกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump)

ในงานวิจัยนี้ สนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาต้านกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) ทั้ง 16 ยีนของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากผู้ป่วยวัณโรคของประเทศไทย และไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Sowajassatakul et al. 2014) จากผลการทดลองพบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน RV1250 เท่านั้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงจากเบสไซโตซีนเป็นเบสไทมีนที่ตำแหน่งที่ 502 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (ตารางที่ 4.2) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ส่งผลกระทบต่อลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีนดังกล่าว (ตารางที่ 4.2) ผลการทดลองนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการดื้อยาคานามัยซินในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่ได้มาจากการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาต้านกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์

งานวิจัยนี้ทำการศึกษายีน Efflux pump หรือยีนที่คาดว่าจะทำหน้าที่เป็นยีน Efflux pump (Hypothetical predicted transmembrane) รวมถึงยีน *eis* (Rv1258c) และยีน *whiB7* (Rv3917A) ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในกลุ่มของยีน Efflux pump นั้น พบว่ายีน Rv0783c, Rv1250, Rv1258c, Rv1410c, Rv1634, Rv1877, Rv2333c และ Rv2846c จัดอยู่ในกลุ่ม Major facilitator super-family (MFS) ที่จะอาศัยประจุของโปรตอนในการขับเคลื่อน (Mazukiewicz et al. 2005) ซึ่งมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคทั้งยาต้านหลักและยาต้านสำรอง เช่น ยาไอโซไนอะซิด ยาสเตรปโตมัยซิน และยาคานามัยซิน เป็นต้น (Rossi et al. 2002; Pang et al. 2013; Mazukiewicz et al. 2005) ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Efflux pump กลุ่มนี้ พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Rv1250 แต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะมิโนของโปรตีนที่ถอดและแปลรหัสมาจากยีนนี้ นอกจากนี้ ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวโอไทด์ของยีนอื่นๆ ในกลุ่ม MFS รวมถึงยีน Efflux pump ในกลุ่ม MFS ที่เคยมีรายงานการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ยีน *tap*, Rv1877 และ Rv2333c ด้วยเหตุนี้ อาจเป็นไปได้ว่า ยีนเหล่านี้ อาจมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าปกติ จึงนำมาศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในเชื้อที่มีการบ่มในยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

ในกลุ่มของยีน Efflux pump กลุ่ม ATP-binding cassette (ABC) มียีนที่เกี่ยวข้องคือ ยีน Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c และ Rv1819c ซึ่งมีรายงานว่า มีผลทำให้เชื้อในกลุ่มมัคโคแบคทีเรียดื้อต่อยาหลายชนิด เช่น ยาสเตรปโตมัยซิน ยาแอมพลิซิลิน และ ยาเตตระไซคลิน เป็นต้น (Hao et al. 2011; Domenech et al. 2009; Danilchanka et al. 2008) นอกจากนี้ มีรายงานว่ายีน Rv1819c หรือ *bacA* เกี่ยวข้องกับการดื้อยากกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์หลายชนิด (Domenech et al. 2009) อย่างไรก็ตาม ไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในกลุ่มนี้ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 แสดงให้เห็นว่า การดื้อยากานามัยซินของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน Efflux pump กลุ่ม ABC

ยีน Rv1145 และ Rv1146 เป็นยีน Efflux pump ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Resistance nodulation division (RND) ที่มีความคล้ายคลึงกับยีน *mmpL* ในเชื้อ *M. smegmatis* ยีนนี้ทำหน้าที่ในการขับยาปฏิชีวนะออกนอกเซลล์ในเชื้อ *M. tuberculosis* (Li et al. 2004) นอกจากนี้ทั้งสองแล้ว ยีน Rv3065 ซึ่งเป็นยีน Efflux pump ในกลุ่ม Small multidrug resistance (SMR) ที่มีผลทำให้ค่า MIC ของยากานามัยซินลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของเชื้อ wild-type ในการทดลองนี้ ไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Rv1145, Rv1146 และ Rv3065 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่า การดื้อยากานามัยซินของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน Efflux pump กลุ่ม RND และ SMR

นอกจากยีนในกลุ่ม Efflux pump แล้ว ยีนควบคุม (Regulatory gene) *whiB7* และยีนที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ทำลายฤทธิ์ของยากานามัยซินหรือยีน *eis* มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ โดยรายงานของ Reeves และคณะ ในปี ค.ศ. 2013 พบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ 5' untranslated region (UTR) ของยีน *whiB7* มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *tap* และ *eis* เพิ่มขึ้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

UTR และยีน *whiB7* อย่างไรก็ตาม การศึกษาความเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลีโอไทด์ไม่สามารถบ่งบอกถึงหน้าที่ที่ถูกต้องที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ ดังนั้น จึงสนใจศึกษาระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้

5.2 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยาอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) ด้วยวิธี Quantitative Reverse Transcription Real-time PCR (qRT-PCR)

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Aminoglycoside efflux pump ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ทั้ง 16 ยีน ซึ่งในการศึกษานี้จะทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 กับเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164 (สายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ที่ตำแหน่ง A1401G) ทั้งการกีดกันด้วยยากานามัยซินและที่ไม่ถูกกีดกันด้วยยา ผลการทดลองที่ได้จะทำการคัดเลือกเฉพาะยีนที่มีระดับการแสดงออกที่สูงในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ที่ถูกกีดกันด้วยยากานามัยซิน จากผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของยีน Rv1819c, Rv1877, Rv2846c และ Rv1258c (*eis*) มีระดับการแสดงออกที่สูงในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ที่ถูกกีดกันด้วยยากานามัยซิน เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ (ตารางที่ 4.5) ยีน Rv1819c มีรายงานพบว่ามีเกี่ยวข้องกับดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในระดับต่ำในเชื้อ *M. tuberculosis* (Domenech et al. 2009) ในขณะที่ยีน Rv1877 และ Rv2846c (ยีน *efpA*) มีผลทำให้ค่าความไวต่อยาชนิดต่างๆ ในเชื้อ *M. smegmatis* ลดลง เช่น อิริโทรมัยซิน โนโบโอซิน กานามัยซิน อะคริฟลาวิน เป็นต้น (Li et al. 2004) การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Efflux pump ซึ่งให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันในทุกสภาวะหรือระดับการแสดงออกที่ลดลง

จากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมด พบว่า ยีน *eis* มีระดับการแสดงออกที่สูงมากในสภาวะที่ทำการศึกษา โดยไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *eis* รวมถึงในบริเวณโปรโมเตอร์ยีน *eis* ดังที่เคยมีรายงานมาก่อน จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของยีน *eis* กับการดื้อยากานามัยซินในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 มีรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *eis* นั้นจะส่งผลทำให้มีการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้เกิดการดื้อยากานามัยซินในระดับต่ำ (Zaunbrecher et al. 2009) นอกจากนี้ มีรายงานที่พบว่าการแสดงออกของ *Eis* ในเชื้อมัคโคแบคทีเรียมีความเกี่ยวข้องกับการรอดชีวิตของเชื้อภายในแมคโครฟาจของมนุษย์ (Wei et al. 2000)

5.3 การศึกษาหน้าที่ของยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c กับการดื้อยากานามัยซินและยาอะมิกาซิน

จากการคัดเลือกยีน Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงในสภาวะการกีดกันด้วยยาปฏิชีวนะกานามัยซินในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่นๆ มาทำการศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ต่อการดื้อยากานามัยซินและยาอะมิกาซินด้วยวิธีการตรวจสอบความไว (MIC) ต่อยาหรือวิธี Agar dilution จากการทำ Overexpression ของยีนทั้งสามชนิดนี้ใน *M. tuberculosis* H37Ra พบว่า ค่า MIC ที่ได้ของแต่ละยีนไม่มีความแตกต่างกับสภาวะควบคุมหรือ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra Wild-type (ตารางที่ 4.7) เนื่องจากทุกสภาวะมีค่า MIC เท่ากับสภาวะควบคุมแบบ Positive (มีพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 เท่านั้น) จึงทำให้คิดว่าทั้งสามยีนนี้อาจจะมีผลกับกลไกการดื้อยากานามัยซินและอะมิกาซินในทางอ้อม แต่ไม่ได้ทำงานโดยตรงกับการดื้อยาสองชนิดนี้ ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการรายงานที่ศึกษาความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาทั้งสามยีนนี้ (Hao et al. 2011; Domenech et al. 2009; Li et al. 2004)

จากการศึกษาหน้าที่ของยีน Efflux pump Rv1819c, Rv1877 และ Rv2846c นี้ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน *eis* น่าจะเป็นกลไกหลักที่มีผลต่อการดื้อยากุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 และที่น่าสนใจคือ ยีน *eis* ที่ทำการศึกษานี้ไม่มีการกลายพันธุ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ แต่สามารถมีระดับการแสดงออกที่สูงมากได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาค่า MIC ของยีน *eis* ต่อความไวต่อยากานามัยซินและอะมิกาซินด้วย จึงทำให้ไม่สามารถยืนยันความเกี่ยวข้องที่แน่นอนของยีน *eis* ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

1. จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ (Aminoglycoside efflux pump) ทั้ง 16 ยีนในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากผู้ป่วยวัณโรคของประเทศไทยและไม่พบการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์อื่นๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่า เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่มีการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ ยกเว้นในยีน Rv1250 ที่ตำแหน่ง 502 มีการเปลี่ยนแปลงจากเบสไซโตซีนไปเป็นเบสไทมีน แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีผลต่อลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน จากผลดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า การดื้อยากานามัยซินในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ไม่ได้เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ทั้ง 16 ยีน

2. จากการศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน Aminoglycoside efflux pump ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ทั้ง 16 ยีน โดยเปรียบเทียบระดับการแสดงออกกับเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164 (สายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ที่ตำแหน่ง A1401G) ในสภาวะที่มีการกีดกันด้วยปฏิชีวนะยากานามัยซินและไม่ถูกกีดกันด้วยยา พบว่า ยีน Rv1819C, Rv1877 และ Rv1258c มีระดับการแสดงออกที่สูงในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ภายใต้สภาวะที่ถูกกีดกันด้วยยากานามัยซิน นอกจากนี้ ยังพบยีน Rv3197A ที่มีระดับการแสดงออกที่สูงมากในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 ภายใต้สภาวะที่ถูกกีดกันด้วยยากานามัยซินอีกด้วย จากผลดังกล่าวจึงสามารถสรุปได้ว่า เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 24433 มีระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาที่มีความสามารถในการขับยา กลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ออกนอกเซลล์ทั้ง 16 ยีนแตกต่างจากเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ 17164 สายพันธุ์ที่มีการดื้อยาที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *rrs*

บรรณานุกรม

Ainsa, 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.

Balganesh M., Dinesh N., Shama S., Kuruppath S., Nair A.V., and Shama U. 2012. “Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates.” *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(5): 2643-2651.

Braibant M., Gilot P., and Content J. 2000. “The ATP binding cassette (ABC) transport system of *Mycobacterium tuberculosis*.” *FEMS. Microbiol. Rev.* 24(4): 449-467.

Cattoir V. 2004. “Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria.” *Pathol. Biol.* 52(10): 607-616.

Choudhuri B.S., Bhakta S., Barik R., Basu J., Kundu M., and Chakrabarti P. 2002. “Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*.” *Biochem.* 367: 279-285.

Colangeli R., Helb D., Sridharan S., Sun J., Varma-Basil M., Hazbón M.H., Harbacheuski R., Megjugorac N.J., Jacobs W.R. Jr., Holzenburg A., Sacchetti J.C., Alland D. 2005 “The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol.” *Mol. Microbiol.* 55(6): 1829-1840.

Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., and Barry C.E. 3rd. 1998. “Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.” *Nature.* 393: 537-544.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Cui Z., Wang J., Lu J., Huang X., and Hu Z. 2011. "Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* from east China in 2009." **BMC Infect. Dis.** 11(78): doi : 10.1186/1471-2334-11-78.
- Danilchanka O., Mailaender C., and Niederweis M. 2008. "Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*" **Antimicrob. Agents Chemother.** 52(7): 2503-2511.
- De Rossi E., Branzoni M., Cantoni R., Milano A., Riccardi G. and Ciferri, O. 1998. "mmr, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors." **J. Bacteriol.** 180: 6068-6071.
- De Rossi E., Arrigo P., Bellinzoni M., Silva P.A., Martin C., Aínsa J.A., Gugliera P., and Riccardi G. 2002. "The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*" **Mol. Med.** 8(11): 714-724.
- Domenech P., Kobayashi H., Lier K., Walker G. C. and Barry C. E. III (2009). "BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*." **J Bacteriol.** 191(2): 477-485.
- 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(3): e33275.
- Grange J.M. 1996. **Mycobacteria and human disease.** London : Oxford University Press.
- Gupta A.K., Reddy V.P., Lavania M., Chauhan D.S., Vaankatesan K., Sharma V.D., Tyagi A.K., and Katoch V.M. 2010. "*jeftA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol." **Indian. J. Med. Res.** 132: 176-188.

- Hao P., Shi-Liang Z., Ju L., Ya-Xin D., Biao H., Xu W., Min-Tao H., Shou-Gang K., and Ke W. 2011. "The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China." *Folia. Microbiol. (Praha)*. 56(6): 549-553.
- Johnson R., Jordaan A.M., Pretorius L., Engle E., Van der Spuy G., Kewley C., Bosman M., Van Helden P.D. Warren R., and Victor T.C. 2006. "Ethambutol resistance testing by mutation detection." *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 10(1): 68-73.
- Karlson A.G., and Needham G.M. 1948. "The in vitro activity of ethambutol (Dextro-2,2'-[Ethylenediimino-di-l-Butanol]) against tuberculosis bacilli and other microorganisms." *Am. Rev. Respir. Dis.* 83(6): 905-906.
- Krüner A., Jureen P., Levina K., Ghebremichael S. and Hoffner, S. 2003. "Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2971-2973.
- Li X.Z., Zhang L., and Nikaido H. 2004. "Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*." *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7): 2415-2423.
- Li, X.Z. and Nikaido, H. 2009. "Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update." *Drugs.* 69:1555-1623.
- Mazukiewicz P., Driessen A.J., and Konings W.N. 2005. "What do proton motive force driven multidrug resistance transporters have in common?." *Curr. Issues Mol. Biol.* 7(1): 7-21.
- Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y., and Tulkens P.M. 1999. "Aminoglycosides: activity and resistance." *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(4): 727-737.
- Pang Y., Lu J., Wang Y., Song Y., Wang S., and Zhao Y. 2013. "Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob. Agents Chmother.* 57(2): 839-900.

- Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, Bellinzoni M, De Rossi E. and Riccardi G. 2004. "Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3175-3178.
- Pasca M.R., Gugliera P., De Rossi E., Zara F., and Riccardi G. 2005. "mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*." *Antimicrob. Agents Chmother.* 49(11): 4775-4777.
- Putman M., Veen H.W.V., and Konings W.N. 2000. "Molecular properties of bacterial multidrug transporters." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 672-693.
- Ramirez M. V., Cowart K. C., Campbell P. J., Morlock G. P., Sikes D., Winchell J. M. and Posey J.E. 2010. "Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis." *J. Clin. Microbiol.* 48:4003-4009.
- Ramón-García S., Martín C., Rossi E.D., and Ainsa J.A. 2007. "Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG." *J. Antimicrob. Chemother.* 59(3): 544-547.
- Ramon-Garcia S., Martin C., Thompson C.J. and Ainsa JA. 2009. "Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth." *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3675-3682.
- Reeves A.Z., Campbell P.J., Sultana R., Malik S., Murray M., Pikaytis 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 Chmother.* 57(4): 1857-1865.
- Saier M.H. Jr., Yen M.R., Noto K, Tamang D.G. and Elkan C. 2009. "The Transporter Classification Database: recent advances." *Nucleic Acids Res.* 37: D274-D278.
- Sensi P. 1983. "History of the development of rifampin." *Rev. Infect. Dis.* 3: 402-406.

- Silva P.E., Bigi F., Santangelo M.P., Romano M.I., Martin C., Cataldi A. and Ainsa J.A. 2001. "Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother.* 45(3):800-804.
- Snewin V.A., Gares M.P., ÓGaora P., Hasan Z., Brown I.N., and Young D.B. 1999. "Assessment of immunity to mycobacterial infection with luciferase reporter constructs." *Infect. Immun.* 67(9): 4586-4593.
- Sowajassatakul A., Prammananan T., Chaiprasert A., and Phunpruch S. 2014. "Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand." *BMC Microbiol.* 14: 165.
- Telenti A., Philipp W.J., Sreevatsan S., Bernasconi C., Stockbauer K.E., Wieles B., Musser J.M., and Jacobs W.R. Jr. 1997. "The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol." *Nat. Med.* 3(5): 567-570.
- Tseng T.T., Gratwick K.S., Kollman J., Park D., Nies D.H., Goffeau A., and Saier M.H. 1999. "The RND permease superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins." *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 107-125.
- Via L.E., Cho S.N., Hwang S., Bang H., Park S.K., Kang H.S., Jeon D., Min S.Y., Oh T., Kim Y., Kim Y.M., Rajan V., Wong S.Y., Shamputa I.C., Carroll M., Goldfeder L., Lee S.A., Holland S.M., Eum S., Lee H. and Barry C.E. 2010. "Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from south korean patients with drug-resistant tuberculosis." *J Clin Microbiol.* 48(2): 402-411.
- Wei J., Dahl J.L, Moulder J.W., Roberts E.A., O'Gaora P., Young D.B., Friedman R.L. 2000. "Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene that enhances mycobacterial survival in macrophages." *J. Bacteriol.* 182(2): 377-384.

- Woodruff H. B., AND J. W. Foster. 1946. "Antibacillin, a naturally occurring inhibitor of bacillin." *J. Bacteriol.* 51: 371-380.
- Yeager R.L., Munroe W.G., and Dessay F.I. 1952. "Pyrazinamide (aldinamide) in the treatment of pulmonary tuberculosis." *Am. Rev. Tuberc.* 65(5): 523-46.
- Zaubrecher M.A., Sikes 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.
- Zhang Y., and Mitchison D. 2003. "The curious characteristics of pyrazinamide: a review." *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 7(1): 6-21.
- [Online]. Available : http://kobiljak.msu.edu/cai/HM561_Pathology/Images-Injury/Lab1-Image17.jpg
- [Online]. Available : http://static.framar.bg/thumbs/6/atc/isoniazid_11.jpg
- [Online]. Available : <https://www.drugbank.ca/structures/DB01045/image.svg>
- [Online]. Available : <https://www.drugbank.ca/structures/DB00339/image.png>
- [Online]. Available:
https://en.wikipedia.org/wiki/Enantiopure_drug#/media/File:Negative_enantiomer_of_ethambutol.png
- [Online]. Available : <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/410/202/u7284.fig1.jpg>
- [Online]. Available : <http://textbookofbacteriology.net/MTBCDC.jpg>
- [Online]. Available : <https://www.askjpc.org/wsc/wsc/images/2012/121102-3.jpg>
- [Online]. Available : <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n8/images/nrmicro3299-i1.jpg>

[Online]. Available: http://4.bp.blogspot.com/-iPcDg7yVP8o/UGpXK9AleII/AAAAAAAAAFkk/h_BEg72JDIE/s524/08-Neomycin-B-%2528Framycetin%2529.jpg

[Online]. Available: <http://www.cell.com/cms/attachment/2016508716/2037209025/fx1.jpg>

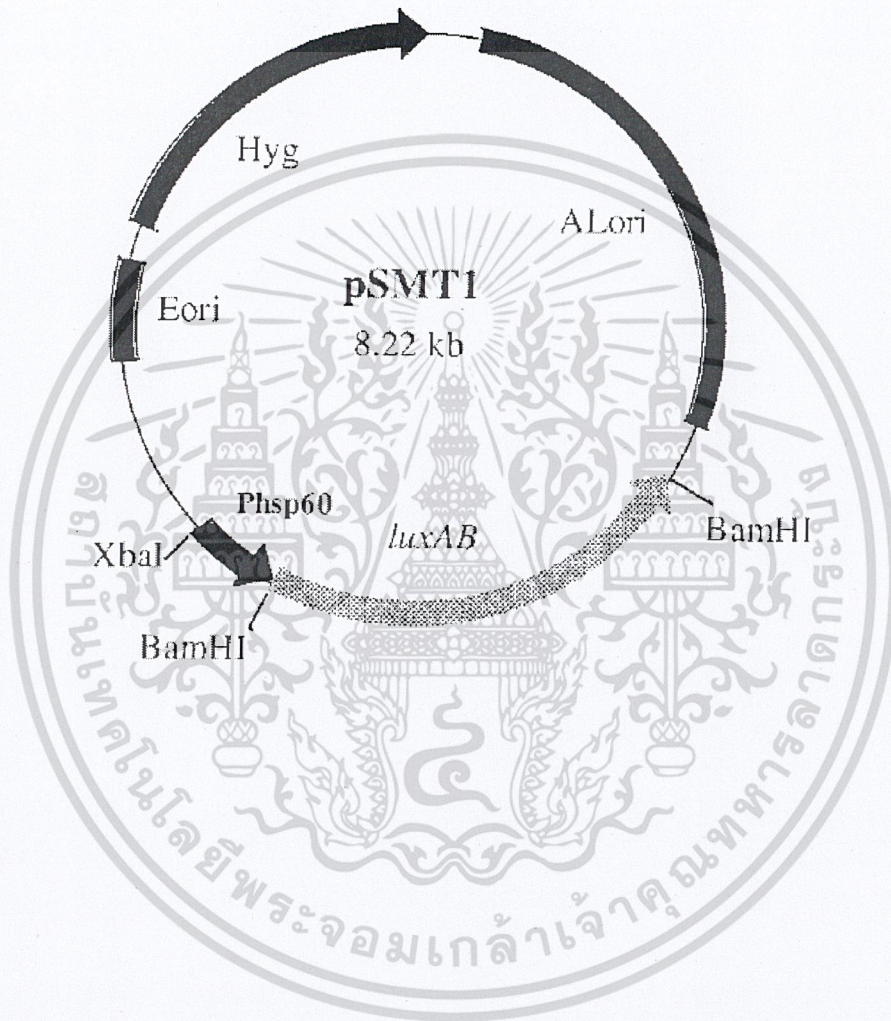
[Online]. Available : <http://image.shutterstock.com/z/stock-photo-mechanism-of-antibiotic-resistance-in-bacteria-labeled-diagram-166170113.jpg>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แผนที่ยีนของพลาสมิดดีเอ็นเอ pSMT1 (Snewin VA., 1999)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 และ 7H10

ส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร)

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

อาหาร Middlebrook 7H10 จะมีองค์ประกอบของสารต่างๆ เช่นเดียวกับอาหาร Middlebrook 7H9 แต่จะมีการเติมวุ้น ปริมาณ 15 กรัมต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร ลงไป

2. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

ส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร)

Tryptone	10
Yest extract	5
Sodium chloride	10

จากนั้นต้องทำการปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH โดยอาหารแข็ง LB จะมีองค์ประกอบของสารต่างๆ เช่นเดียวกับอาหารเหลว LB แต่จะมีการเติมวุ้น ปริมาณ 15 กรัมต่ออาหารปริมาตร 1 ลิตร ลงไป

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาวธัญญา พันธุ์พฤกษ์

เพศ ชาย หญิง วันเดือนปีเกิด 21 พฤศจิกายน 2512 อายุ 43 ปีสถานภาพ 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	มูลนิธิแถบนิลนิตี

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> ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ชนิดทนเค็ม <i>Aphanothece halophytica</i>	สวทช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2544-45	การค้นหายีนที่ผลิตไฮโดรจีเนสและการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ไฮโดรจีเนสในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้ท่านไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2554-56	การตรวจหากลไกการดื้อยาของกลุ่ม Aminoglycoside ที่ยังไม่เคยมีรายงานในเชื้อวัณโรค	งบรายได้ คณะวิทย์ สจล.
2555-56	การผลิตพลาสติกชีวภาพจากไซยาโนแบคทีเรีย	วช
2556-57	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรเจนของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Anabaena siamensis</i> โดยการตรึงเซลล์	คณะวิทย์ สจล.

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

Maneeruttanarungroj C and **Phunpruch S.** 2017 Effect of pH on biohydrogen production in green alga *Tetraspora* sp. CU2551. Energy Procedia 138: 1085-1092.

Taikhao S and **Phunpruch S.** 2017 Increasing hydrogen production efficiency of N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by cell immobilization. Energy Procedia 138: 366-371.

Taikhao S and **Phunpruch S.** 2017 Effect of metal cofactors of key enzymes on biohydrogen production by nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. Energy Procedia 138: 360-365.

Nanasombat S, Treebavonkusol P, Kittirisopit S, Jaichalad T, **Phunpruch S**, Kootmas A and Nualsri I. 2017 Lactic acid bacteria isolated from raw and fermented pork products: Identification and characterization of catalase-producing *Pediococcus pentosaceus*. Food Science and Biotechnology 26(1): 173-179.

Nanasombat S, **Phunpruch S** and Charoenrak N. 2016 Bacteriocins from Lactobacillus strains and their anti-*Listeria monocytogenes* in Nham, Thai fermented pork. KMITL Science and Technology Journal 16(2): 43-48.

Tinpranee N, Incharoensakdi A and **Phunpruch S.** 2016 Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand. KKU Research Journal 22(1): 256-266.

Pansook S, Incharoensakdi A and **Phunpruch S.** 2016 Hydrogen production by immobilized cells of unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* in alginate beads. KKU Research Journal 22(1): 248-255.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Phunpruch S, Puangplub A. and Incharoensakdi A. 2016 Biohydrogen production by microalgae isolated from the rice paddle field in Thailand. *KKU Research Journal* 22(1): 236-247.
- Phunpruch S, Taikhao S and Incharoensakdi A. 2016 Identification of bidirectional hydrogenase genes and their co-transcription in unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology* 28(2):967-978. (DOI10.1007/s10811-015-0664-8)
- Sowajassatakul A, Coker OO, Prammananan T, Chaiprasert A and Phunpruch S. 2015 Draft genome sequence of amikacin- and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* MT433 without *rrs* and *eis* mutations. *Genome Announcements* 3(6):e01363-15
- Warit S, Phunpruch S, Jityam C, Jaitrong S, Billamas P, Chaiprasert A, Palittapongarnpim P and Prammananan T. 2015 Genetic characterization of a *whiB7* mutant of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 3:262-266 (DOI10.1016/j.jgar.2015.07.004)
- Taikhao S, Incharoensakdi A and Phunpruch S. 2015 Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater. *Journal of Applied Phycology* 27:187-196.
- Sowajassatakul A, Prammananan T, Chaiprasert A and Phunpruch S. 2014 Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand. *BMC Microbiology* 14: 165.
- Ongmali R, Phunpruch S and Thawornchaisit U. 2014 Cellular lipid production of a heterotrophic bacterium isolated from poultry processing wastewater. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 36(3): 359-365.
- 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 Chaiprasert, 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 N_2 -fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis*" *Journal of Applied Phycology* 18: 713-722.
- Prammananan, 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

Warichanan K and **Phunpruch S.** 2017 Enhancement of hydrogen production by unicellular green alga *Scenedesmus* sp. KMITL-OVG1. In: Proceedings of The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand, July 25-28, 2017. 354-359.

Khamheang Y and **Phunpruch S.** 2017 Comparison of hydrogen production by unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CC-3806 and CC-124 under nutrient deprivation. In: Proceedings of The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand, July 25-28, 2017. 345-353.

Taikhao S and **Phunpruch S.** 2017 Biomass and biohydrogen production of unicellular green alga *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* TISTR 8261 in frozen food industrial wastewater. In: Proceedings of The 12th Asian Biohydrogen & Biorefinery Symposium. Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand, July 25-28, 2017. 18-25.

Puangplub A and **Phunpruch S.** 2017 Effect of light intensity and light pattern on hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2. In: Proceedings of The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. Pullman Khon Kaen Raja Orchid, Khon Kaen, Thailand, July 25-28, 2017. 157-163.

Pansook S, Incharoensakdi A and **Phunpruch S.** 2017 Effect of oxidative phosphorylation uncoupler cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP) on H₂ production by unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- halophytica*. In: The 55th Kasetsart University Annual Conference. January 31-February 3, 2017. 136-143.
- Khamheang Y, Maneerattanarungroj C and **Phunpruch S**. 2017 Growth and hydrogen production by wild type and mutant strains of unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: The 55th Kasetsart University Annual Conference. January 31-February 3, 2017. 168-175.
- Puangplub A, Incharoensakdi A and **Phunpruch S**. 2017 Screening of green algae isolated from natural water sources in Thailand for H₂ production. In: The 55th Kasetsart University Annual Conference. January 31-February 3, 2017. 199-206.
- Sowajassatakul A, Prammananan T, Chaiprasert A and **Phunpruch S**. 2015 Genetic characterization of putative drug efflux pumps in amikacin- and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain. In: Biotechnology International Congress (BIC) 2015 “Biotechnology for Healthy Society”, September 9th-10th, BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand. pp.75-79
- Pansook S, Incharoensakdi A and **Phunpruch S**. 2015 Hydrogen production by immobilized cells of unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* in alginate beads. In: The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT New Core to Core Program A. Advance Research Networks and Research Group for Development of Microbial Hydrogen Production Process from Biomass-KKU, July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & Convention Centre Khon Kaen, Thailand. pp.212-217.
- Tinpranee N, Incharoensakdi A and **Phunpruch S**. 2015 Hydrogen production by unicellular green alga *Chlorella* sp. LSD-W2 isolated from seawater in Thailand. In: The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT New Core to Core Program A. Advance Research Networks and Research Group for Development of Microbial Hydrogen Production Process from Biomass-KKU, July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & Convention Centre Khon Kaen, Thailand. pp.289-296.

Phunpruch S, Puangplub A. and Incharoensakdi A. 2015 Biohydrogen production by microalgae isolated from the rice paddy field in Thailand. In: The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Sessions from JSPS-NRCT New Core to Core Program A. Advance Research Networks and Research Group for Development of Microbial Hydrogen Production Process from Biomass-KKU, July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & Convention Centre Khon Kaen, Thailand. pp.403-411.

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

เอกสารนี้เป็น with Joint Sessions from JSPS-NRCT Asian Core Program & The 7th Conference

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ปีสถานภาพ 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	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	ดี ประจำปีการศึกษา 2551 ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ดีเด่นทางปรีคลินิก	มหาวิทยาลัยมหิดล
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	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	human pythiosis	
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>Penicillium marneffei</i> and PCR fingerprinting for strain typing of <i>Penicillium marneffei</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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (H37Rv), <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus</i> sp. and <i>Candida albicans</i> in water	LICC Co.,Ltd.
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	วช.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	detection of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)	
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 Mycobacterium tuberculosis (MDRTB)	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
2555-58	DNA chip for identification and typing Mycobacterium tuberculosis 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. Imwidthaya 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, Porntaveevudhi O, Mairiang P, Patjanasontorn 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 สุริยะวงศ์ไพศาล, 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)

เอกสารนี้ Respiration Medicine 1995; 89: 621-3. (Impact: 01.663) อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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. Chokephaibulkit 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, Linpiyawon 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, Louisirirochanakul 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**, Arjratanakool 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

เอกสารนี้เป็น evaluation of Candi Select test and conventional methods for identification of ราค่า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Candida albicans* in routine clinical isolates. *Mycoses* 2002; 45: 75-8. (Impact: 1.708; 2000)
55. Phongsamart W, Chokephaibulkit K, **Chaiprasert A**, Vanprapa N, Cheerskul 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, Linpiyawon 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, Arjratanakul 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**, Gengviniij 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 Allergy Immunol* 2002; 20(4): 267-77. (Correspondence: Angkana Chaiprasert) (Impact: 0.381; 2001)
62. Lolekha R, Phongsamart W, Chokephaibulkit K, **Chaiprasert A**, Vanprapa N, Cheerskul S. *Cryptococcus neoformans* infection in Thai children: Siriraj Hospital during 1996-2000. *Thai J Pediatr* 2002; 41: 16-24.
63. Mahaisavariya P, **Chaiprasert A**, Khemngern S, Manonukul J, Gengviniij N, Na Ubol P, Pinitugsorn S. Nontuberculous mycobacterial skin infections: clinical and bacteriological studies. *J Med Assoc Thai* 2003; 86(1): 52-60.
64. Tongyoo S, Vilaichone W, Sukpanichnant S, Auewarakul C, **Chaiprasert A**, Ratanarat A, Permpikul C. Thrombocytopenic purpura associated with miliary tuberculosis short running head: Miliary TB with thrombocytopenia. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 976-80.
65. Prariyachatigul C, **Chaiprasert A**, Geenkajorn K, Kappe R, Chuchottaworn C,

seminested PCR assay for the detection and identification of *Penicillium marneffeii*. *Mycoses* 2003; 46: 447-54. (Correspondence: Angkana Chaiprasert)(Impact: 0.805; 2001)

66. **Chaiprasert A**, Munsrishoom A, Prariyachatigul C, Tansuphaswadikul S. Diagnosing of cryptococcal meningitis in AIDS patients by conventional and PCR methods. Proceedings of 9th Congress of the European Confederation of Medical Mycology 7th Trends in Invasive Fungal Infetions 2003; 91-8.
67. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ: ภาค 1. จดหมายข่าวสมาคมอุรเวชช์ ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 เดือน กรกฎาคม 2546 หน้า 4-6.
68. **อังคณา ฉายประเสริฐ**. การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ: ภาค 2.จดหมายข่าวสมาคมอุรเวชช์ ปีที่ 12 ฉบับที่ 4 เดือน สิงหาคม 2546 หน้า 7-8.
69. Chierakul N, Anantasetagoon T, **Chaiprasert A**, Tingtoy N. Diagnostic value of gastric aspirate smear and polymerase chain reaction in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2003; 8: 492-6. (Impact: 01.264; 2005)
70. Chierakul N, Kantisap A, **Chaiprasert A**, Viriyataveekul R. A simple C-reactive protein measurement for the differentiation between tuberculous and malignant pleural effusion. *Respirology* 2004; 9: 66-9. (Impact: 01.264; 2005)
71. Mahaisavariya P, Manonukul J, Khemngern S, **Chaiprasert A**. Mycobacterial skin infections: Comparison between histopathologic features and detection of acid fast bacilli in pathologic section. *J Med Assoc Thai* 2004; 87(6): 709-12.
72. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, **Chaiprasert A**, Suwanagool P, Manuskiatti W, Ruangsetakit C, Ajello L. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine*. 2004; 22: 3613-21. (Impact: 02.881; 2002)
73. **Chaiprasert A**, Prammananan T, Tingtoy N, Srimuang S, Ajratanakool W, Jearanisilavong J, Srifeungfung S, Dhiraputra C. Six-year report of mycobacteria recovered from automated culture system at Siriraj Hospital. *Siriraj Hosp Gaz* 2004; 56(9): 477-84.
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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: 572-9.
80. Ngamskulrungraj 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, Rangspanuratn 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: 1000-1004. (Impact: 3.445; 2006)

เอกสารนี้เป็น *Mycobacterium avium* complex isolates in Thailand. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1000-1004

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3819-21. (Impact: 03.439; 2004, 50%, Corresponding author: Angkana Chaiprasert)
85. Wanachiwanawin 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, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin 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, Wanachiwanawin 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. Ngamskulrunroj 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

เอกสารนี้เป็น tuberculosis ใน Thais. Genes Immun 2008; 1:1-7. ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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*

เอกสารนี้เป็น *tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. Intern J Antimicrob Agent ราคา
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2011, 37; 84-5. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 3.01; 2009)
102. 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. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11: 1142-9. (Corresponding author: Angkana Chaiprasert) (Journal Impact factor 3.223; 2009)
103. Faksri K, Drobniowski 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. Pitaksajjakul 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, Sutekanit 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 preseting 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, วัณโรค บทที่ 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 ใน ตำรา *An update on infectious diseases IV* 2540; บรรณาธิการ บุญมี สถาปัตยกรรมศาสตร์ อัญญาวิภากุล, สมาคมโรคติดต่อแห่งประเทศไทย, สวีชาญการพิมพ์, 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, สวีชาญการพิมพ์, กรุงเทพฯ (หน้า 335-55).(100%)
5. ศมนีย์ สุขรุ่งเรือง, อังคณา ฉายประเสริฐ, "ราฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์" : *Cryptococcus neoformans* บทที่ 14 ใน *เอชไอวีและจุลชีพฉวยโอกาส* 2541; บรรณาธิการ พิไลพันธ์ พุชวิวัฒน์ และคณะ อักษรสมัย กรุงเทพฯ หน้า 14.1-14.17. (50%)
6. อังคณา ฉายประเสริฐ, อมร ลีลารัตน์, จุลชีววิทยาของมัยโคแบคทีเรียสิ่งแวดล้อม บทที่ 11 ใน ตำรา *เวชศาสตร์สิ่งแวดล้อม ฉบับเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา มหาราช* 2542; บรรณาธิการ สมชัย บวรกิตติ, จอห์น พี ลอฟท์ส และ กฤษดา ศรีสำราญ. เรือนแก้วการแพทย์ กรุงเทพฯ หน้า 193-210. (80%)
7. อังคณา ฉายประเสริฐ, การทดสอบความไวของเชื้อมัยโคแบคทีเรียต่อยาจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ในหนังสือ *การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค ; การประยุกต์ทางคลินิกและเพื่อการพัฒนาใหม่*; 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 ใน

เอกสารนี้รายงานการประชุม "วิชาการวัณโรคและโรคระบบการหายใจระดับชาติ" ครั้งที่ 5 จัดโดย รศ.ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ และคณะ เมื่อวันที่ 15-16 กรกฎาคม 2554 ณ โรงแรมเซ็นทาราแกรนด์ไฮแอท เอราวัณ กรุงเทพฯ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร สมาคมออร์เวชแห่งประเทศไทยและสถาบันวิจัยวัณโรค 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 โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติกรมปศุสัตว์ 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 (การตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ) ในการจัดอบรมระยะสั้นของสมาคมโรคติดเชื้อในเด็กแห่งประเทศไทย 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. ในหนังสือการจัดอบรมระยะสั้นของสมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย เรื่อง An Update on Infectious Diseases 2007; pp 120-129.
 17. Kiaticchai 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 ดิ่งด้อย, นางสาวสมบุญ ศรีม่วง, นายเทอดศักดิ์ พรหมณะ นันทน์, นางสาววิยะดา อาจารย์ตนกุล, นางสาวปริญวิศว์ ณ อุบล, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นางสาววัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, 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 ดิ่งด้อย, นางสาววิยะดา อาจารย์ตนกุล, นายสง่า พัฒนากิจสกุล, นายสุขชัย เจริญรัตนกุล, 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 ดิ่งด้อย, นางสาวสมบุญ ศรีม่วง, นางพรรณนภา มไหสวริยะ และนายอภิชาติ ศิวายธร 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)

อณูชีววิทยาของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย โดยเฉพาะทางด้านกลไกการดื้อยา และจุลชีววิทยาของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

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	รางวัลการได้รับคุ้มครองสิทธิบัตรเรื่องชุด ตรวจสอบเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจในระดับ ห้องปฏิบัติการโดยวิธี One-tube nested PCR และเรื่องการจำแนกชนิดเชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> และ nontuberculous mycobacteria โดยวิธี One-tube multiplex PCR	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีแห่งชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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	ทุนวิจัยวัณโรคต่อยาในศิริราชมูลนิธิ
2549-50	Computational identification of non-coding RNAs in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2550-52	Investigation of <i>Mycobacterium tuberculosis 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2551-52	Evaluation of macroarrays for identification of multidrug-resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MDR-TB)	สภาวิจัยแห่งชาติ
2551-53	Determination of virulent-related <i>M. tuberculosis</i> strains isolated from cerebrospinal fluid	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาติเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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, Suksamran 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* (MDR-TB) 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, Rangsanurath 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*

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**, Arjatanakool 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, Ajratanakool 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**, Sturfels 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 พรหมณะนันท์, Antituberculous drug resistance: genetic and physiologic mechanisms. ใน: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์, บรรณาธิการ. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค: การประยุกต์ทางคลินิกและเพื่อพัฒนาญาใหม่. 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

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 พรหมณะ นันทน์, นางสาววิยะดา อัจฉรัตนกุล, นางสาวปรีวิศว์ 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 ได้รับ สิทธิบัตรเมื่อ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 28130
2. นางอังคณา ฉายประเสริฐ, นางนิภา ตังต้อย, นางสาววิยะดา อัจฉรัตนกุล, นายสง่า พัฒนากิจ สกุล, นายสุชัย เจริญรัตนกุล, นายนิธิพัฒน์ เจริญกุล, นายเพทาย เย็นจิตโสมนัส, นายกิตติพันธ์ เสมอพิทักษ์, นายเทอดศักดิ์ พรหมณะนันทน์และนางสาวสมบุญ ศรีม่วง เรื่อง “ชุดตรวจสอบ สำเร็จเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจโดยวิธีพีซีอาร์” ให้ไว้ ณ วันที่ 4 กุมภาพันธ์ 2543 (รางวัล ชมเชย) ยื่นขอจดสิทธิบัตร เมื่อวันที่ 2 กรกฎาคม 2544 เลขที่คำ ขอ 066670 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อ 8 มกราคม พ.ศ. 2553 เลขที่สิทธิบัตร 27265

Genetic characterization of putative drug efflux pumps in amikacin- and kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strain

Angkanang Sowajassatakul^a, Therdsak Prammananan^{b,d}, Angkana Chaiprasert^{c,d} and Saranya Phunpruch^{a,e,*}

^aDepartment of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Road, Bangkok 10520, Thailand

^bTuberculosis Research Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency, Thailand Science Park, Pathum Thani 12120, Thailand

^cDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

^dDrug-Resistant Tuberculosis Research Fund, Siriraj Foundation, Bangkok 10700, Thailand

^eBioenergy Research Unit, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Road, Bangkok 10520, Thailand

*Corresponding author: kpsarany@kmitl.ac.th

Abstract

Active drug efflux has been reported to play a role in anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In this study, the amikacin- and kanamycin-resistant *M. tuberculosis* clinical strain MT433, previously described as the strain carrying unknown resistance mechanism (no mutation in *rrs* and *eis*), was genetically characterized. Seventeen annotated efflux pump encoding genes (Rv0194, Rv0783c (*emrB*), Rv1145 (*mmpL13a*), Rv1146 (*mmpL13b*), Rv1250, Rv1258c (*tap*), Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c (*efpA*), Rv3065 (*mmr*), and Rv3239c) and one regulatory gene Rv3197A (*whiB7*) were sequenced and results revealed a point mutation located in Rv0194, Rv1250, and Rv3239c. However, amino acid substitution (M74T) was found only in Rv0194 (T221C). The other genes showed identical sequences with those of the susceptible *M. tuberculosis* reference strain H37Rv. No conclusive evidence at the nucleotide level indicated the role of efflux pump on the resistant phenotype. Further analysis of expression level would be explored in order to elucidate whether these genes play a role on amikacin- and kanamycin-resistance in this clinical strain.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, aminoglycoside, drug resistance, efflux pump

1. Introduction

Tuberculosis (TB), caused by an infection of *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. In 2013 WHO reported that there were an estimated 9.0 million incident cases of TB and 1.5 million deaths from TB (1.1 million HIV-negative and 360,000 HIV-positive deaths) [1]. In addition, there were approximately 480,000 new multidrug-resistant tuberculosis cases (MDR-TB; resistance at least to isoniazid and rifampicin), suggesting that anti-tuberculosis drug resistance is an important health problem in many countries, especially in Asia and Africa. Thailand was categorized in the seven high MDR-TB burden countries which 63,541 new TB cases were notified in 2013 [2].

One of the second-line injectable anti-TB drugs, aminoglycosides such as amikacin (AK) and kanamycin (KM), is a broad-spectrum antibiotic and generally used for MDR-TB treatment [3]. It functions to bind 16S rRNA in 30S small ribosomal

subunit resulting in the interrupting the protein translation [3-4]. The resistance of aminoglycosides brings about the extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB; MDR-TB strain resistance to any fluoroquinolones and one of injectable drugs) which is more difficult for treatment than MDR-TB. Thus, understanding of aminoglycoside resistance mechanisms is necessary for developing a new drug and also new highly sensitive and more accurate diagnostic method. Until now, three known aminoglycoside resistance mechanisms have been found in *M. tuberculosis*. One is the modification of drug target at the adenine position 1401 of the 16S rRNA [5] Second is the presence of aminoglycoside modifying enzymes, such as N-acetyltransferase in the bacterial cells [6-7]. The last mechanism is involved in an aminoglycoside efflux pump [8].

Efflux pumps are the energy-dependent proteins capable of exporting many compounds such as antibiotics and toxic compounds out of the cells [8-9]. There have been at least five families of drug efflux pumps (major facilitator family (MFS), ATP

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

binding cassette (ABC) transporter family, multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family, small multidrug resistance (SMR) family, and resistance-nodulation-division (RND) superfamily [10-11]. In bacteria, efflux pump mechanism has been shown to play an impact role in the drug resistance; however the efflux pump genes and proteins can also appear in both antibiotic-susceptible and -resistant bacteria, including *M. tuberculosis* [12-13]. In our previous study, there was one clinical strain of *M. tuberculosis*, MT433, which did not contain any known mutations associated with AM- and KM-resistance, including *rrs* (Rvnr01), *eis* (Rv2416c), *tap* (Rv1258c) and *tlyA* (Rv1694) but displayed the high-level resistance of AK and KM with both MIC values of >64 µg/ml [14]. One possible explanation is that *M. tuberculosis* MT433 might have some differences of efflux pump mechanism in both/either point mutation and/or the expression level of the efflux pump genes. In this study, we investigated the nucleotide sequences of 17 annotated drug transporter encoding genes from four drug efflux pump families and one regulatory gene *whiB7* in *M. tuberculosis* MT433.

2. Materials and Methods

2.1 Mycobacterial strain and culture condition

M. tuberculosis MT433 was obtained from the Drug-Resistant Tuberculosis Research Laboratory, Drug-Resistant Tuberculosis Research Fund, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. It was grown on Löwenstein-Jensen (LJ) medium (BBL, USA) and incubated at 37°C for 3-4 weeks.

2.2 Genomic DNA isolation

The cells of *M. tuberculosis* MT433 were collected into an eppendorf tube containing 500 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) and heated at 80°C for 20 min. Then, the cells were harvested by centrifugation at 6,000xg at 4°C for 10 min and resuspended in 400 µl of Tris-EDTA-Tween-lysozyme solution (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.5% (v/v) Tween80, 2 mg/ml lysozyme (Amresco, USA)), followed by incubation at 37°C for 3 h. SDS and proteinase K were added to the cell suspension to make the final concentrations of 1% (w/v) and 1 mg/ml, respectively. The mixture was incubated at 37°C for 1 h. After that, 80 µl of 5 M NaCl and 80 µl of 10% (w/v) cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) (Sigma, USA) were added to the mixture, followed by heating immediately at 65°C for 15 min. Then, an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) (v/v) was added to mixture and the aqueous DNA phase was separated by centrifugation at 12,000xg for 5 min before extraction with an equal volume of

chloroform-isoamyl alcohol (24:1) (v/v) again. Genomic DNA was precipitated after adding with 0.1 volume of 3 M sodium acetate (pH 5.3) and 2.5 volumes of ice-chilled absolute ethanol, prior to an incubation at -70°C for 30 min and centrifugation at 12,000xg at 4°C for 15 min. Genomic DNA was washed with 500 µl of ice-chilled 70% ethanol, dried, and resuspended in 20 µl of TE buffer. RNaseA (Qiagen, Germany) was added to the DNA solution to generate a final concentration of 0.5 µg/µl, and the mixture was subsequently incubated at 37°C for 1 h.

2.3 DNA amplification by PCR

Seventeen efflux pump genes (Rv0194, Rv0783c (*emrB*), Rv1145 (*mmpL13a*), Rv1146 (*mmpL13b*), Rv1250, Rv1258c (*tap*), Rv1410c, Rv1456c, Rv1457c, Rv1458c, Rv1634, Rv1819c, Rv1877, Rv2333c, Rv2846c (*efpA*), Rv3065 (*mmr*) and Rv3239c) and one involving regulatory gene Rv3197A (*whiB7*) were amplified by PCR using specific primers (Table 1). Fifty µl of PCR reaction mixtures contained 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 50 ng of DNA template and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, USA). The PCR conditions were an initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 58-62°C for 1 min and extension at 72°C for 2-4 min depending on the PCR product sizes (Table 1). All PCR products were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis and purified by QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany).

2.4 DNA sequencing

The PCR products were sequenced with Big-Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, USA) using ABI PRISM^R 3700 DNA analyzer at First BASE Laboratories (Malaysia). PCR products were sequenced in both directions (Table 1). The obtained nucleotide sequences were compared with *M. tuberculosis* H37Rv genome (Accession no. NC_000962) using ClustalW multiple sequence alignment program [15].

2.5 Prediction of the mutation effect on protein function

Effect of a non-synonymous mutation on protein function was predicted using the SIFT score (available at <http://sift.jcvi.org>) by comparing the degree of evolutionary conservation of the orthologous protein-positions in the other bacteria. The value of SIFT score is normalized probability score that means tolerated, and SIFT score ≤ 0.05 indicates the function impact as deleterious [16].

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้