# การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียมโดยหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวน

นายวิรัช พวงภู่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-253-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19306635

# DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM* SPECIES BY DIRECT SEQUENCING OF AMPLIFIED 16 S rDNA FRAGMENT

MR. VIRAD POUNGPOO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-331-235-8

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียมโดยหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวน |
| โดย | นายวิรัช พวงภู่ |
| สหสาขาวิชา | จุลชีววิทยาทางการแพทย์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | อาจารย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์) คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....

(รองศาสตราจารย์ ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์) ประธานกรรมการ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร) อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(อาจารย์ นิพนธ์ อุดมสันติสุข ) กรรมการ

.....

(นายแพทย์ เจริญ ชูโชติถาวร) กรรมการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

วิรัช พวงภู่ : การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียมโดยหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวน ( DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM* BY DIRECT SEQUENCING OF AMPLIFIED 16S rDNA FRAGMENT ) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมหญิง ธัมวาสร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นิพนธ์ อุดมสันติสุข; 78 หน้า. ISBN 974-331-235-8.

ทำการศึกษาเพื่อแยกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย โดยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction เปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำ (conventional method ) โดยอาศัยลักษณะของโคโลนี การสร้างสี อัตราการเจริญเติบโต ปฏิกิริยาชีวเคมี และ Accuprobe ในการศึกษาใช้เชื้อมัยโคแบคทีเรียมาตรฐาน 16 สปีชีส์ และเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่แยกจากผู้ป่วย 71 ราย ผลการทดสอบในเชื้อมาตราฐาน 16 สปีชีส์ มีลำดับเบสเหมือนกับที่มีรายงานไว้และเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยให้ผลตรงกับวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำ จำนวน 68 ราย มี 3 รายที่ให้ผลแตกต่างคือ 1 ราย ที่ผลแตกต่างเพียงเล็กน้อย เนื่องจากวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำมีข้อจำกัดในการจำแนกสปีชีส์เชื้อมัยโคแบคทีเรีย และ 2 ราย ที่ให้ผลเป็น *M.paraffinicum* ด้วยวิธีการหาลำดับเบส แต่ผลจากวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำไม่สามารถสรุปผลได้

การจำแนกสปีชีส์เชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยหาลำดับเบสด้วย manual sequencing และติดฉลากด้วย $^{35}S$ อ่านผลได้ภายใน 5 วัน เร็วกว่าวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำซึ่งใช้เวลา 4-8 สัปดาห์ มีความเชื่อถือได้ และราคาใกล้เคียงกับวิธีที่ใช้อยู่เป็นประจำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

## 3971728630 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *MYCOBACTERIUM* SPECIES / 16S rDNA / SEQUENCING

WIRAD POUNGPOO : DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM* SPECIES BY SEQUENCING OF AMPLIFIED 16S rDNA FRAGMENT, THESIS ADISOR : ASSO. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D. THESIS COADVISORS : NIBONDH UDOMSANTISUK, M.Sc. 78 pp. ISBN 974-331-235-8.

Identification of *Mycobacterium* species was performed by sequencing of amplified 16S rDNA. The results were compared with those from conventionnal methods which include colonial morphology, growth rate, pigmentation , biochemical test and Accuprobe. A total of 16 reference *Mycobacterium* species and 71 clinical isolates were included in this study. For all of the reference species were found a 16S rDNA sequence identical to publish sequence and 68 clinical isolates gave identical result to conventional methods. For 1 isolate, minor discrepancy was present because of the limited discriminating power of the conventional methods. For 2 isolates, *M.paraffinicum* was identified by sequencing method but unidentified by conventional menthods.

Manual sequencing with $^{35}S$ labelling for species identification of mycobacteria gave result within 5 days. This is more rapid than conventional methods which taked 4 to 8 weeks. The sequencing methods is reliable and cost comparable to conventional methods.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดีจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ และขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง ธัมวาสร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนอนุญาตให้ใช้สถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัย

อาจารย์ นิพนธ์ อุดมสันติสุข ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำ และเสนอแนะแนวทางในการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรค และปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ด้วยความเอาใจใส่

รองศาสตราจารย์ ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์

นายแพทย์ เจริญ ชูโชติถาวร โรงพยาบาลโรคทรวงอกที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้ตัวอย่างเชื้อในการทำวิทยานิพนธ์

อาจารย์ เสาวนีย์ ขวัญเลิศจิตต์ และเจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้กำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

คุณอัญชลี ละอาด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณชาญณรงค์ สุดสามารถ โรงพยาบาลโรคทรวงอก ที่กรุณาให้ตัวอย่างเชื้อในการทำวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

รายการตารางประกอบ ..... ฌ

รายการรูปประกอบ ..... ญ

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์ ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ ..... 1

วัตถุประสงค์ ..... 3

2. การสำรวจเอกสาร

ลักษณะรูปร่าง และคุณสมบัติทั่วไป ..... 4

การจำแนกชนิด ..... 6

การพิสูจน์เชื้อ ..... 9

ระบาดวิทยาและการก่อโรค ..... 20

การรักษา ..... 28

3. วัสดุและวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการศึกษา ..... 31

การแยก nucleic acid ..... 31

การเพิ่มปริมาณ ดี เอ็น เอ ..... 34

การหาลำดับเบส ..... 35

การแปลผล ..... 37

4. ผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ผล PCR product ..... 42

การตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อมาตรฐาน ..... 42

การตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ..... 42

หน้า

5. สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง .....67
6. รายการอ้างอิง .....69
ภาคผนวก ก .....75
ข.....76
ค.....77
ประวัติผู้เขียน .....78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1 สปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียที่ยอมรับแล้ว .....7
ตารางที่ 2 สปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียที่ยังไม่ยอมรับ..... 8
ตารางที่ 3 อุณหภูมิสำหรับการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย .....10
ตารางที่ 4 ลักษณะการเจริญของมัยโคแบคทีเรีย.....11
ตารางที่ 5 ปฏิกิริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย .....13
ตารางที่ 5 (ต่อ) ปฏิกิริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย .....14
ตารางที่ 6 ปฏิกิริยาชีวเคมีหลักที่แยกมัยโคแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ.....15
ตารางที่ 7 ความเสียหายทั่วโลกที่เกิดจากวัณโรคในปี คศ. 1991 .....21
ตารางที่ 8 การตายของประชากรที่อายุมากกว่า 5 ปี จากโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ .....22
ตารางที่ 9 การแพร่กระจายตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย จากการติดเชื้อวัณโรค .....23
นอกปอดของผู้ป่วยใน South-East England
ตารางที่ 10 nontuberculous mycobacteria ที่สามารถก่อโรคในคน .....25
ตารางที่ 11 เชื้อกลุ่ม saprophytic mycobacteria ที่นาน ๆ ครั้งก่อโรคได้.....26
ตารางที่ 12 การจัดจำแนกมัยโคแบคทีเรีย ตามลักษณะอาการทางคลินิก..... .27
ตารางที่ 13 ยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่วัณโรค.....30
ตารางที่ 14 เชื้อมาตรฐานที่ใช้ศึกษา ..... 32
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบปฏิกิริยาเคมี และAccuprobe .....33
ตารางที่ 16 ลำดับเบสของ 16S rDNA ตำแหน่ง 129-214 .....39
ตารางที่ 16(ต่อ) ลำดับเบสของ 16S rDNA ตำแหน่ง 129-214 ..... 40
ตารางที่ 17 ลำดับเบสของ 16S rDNA ตำแหน่ง 439-497..... 41
ตารางที่ 18 สรุปผลการทดสอบหาลำดับเบสของเชื้อมาตรฐานบน 16S rDNA .....44
ตารางที่ 18(ต่อ) สรุปผลการทดสอบหาลำดับเบสของเชื้อมาตรฐานบน 16S rDNA ..... 45
ตารางที่ 19 สรุปผลการทดสอบหาลำดับเบสของ 16S rDNA ..... 64
ตารางที่ 20 สรุปผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี Accuprobe และหาลำดับเบสของ .....65
16S rDNA

# รายการรูปประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 ส่วนประกอบผนังเซลล์ของมัยโคแบคทีเรีย .....5
รูปที่ 2 ขั้นตอนของ Polymerase Chain Reaction .....18
รูปที่ 3 Autoradiogram ของ sequencing gel เพื่อหาลำดับเบสโดยวิธีของ Sanger..... .....19
รูปที่ 4 Physical map ของ primers ที่เทียบกับตำแหน่งเป้าหมายบน 16S rDNA ..... ..... 37
รูปที่ 5 ขั้นตอนหาลำดับเบส .....38
รูปที่ 6 PCR product ขนาดประมาณ 1,000 bps จากการเพิ่มจำนวนยีน ที่ควบคุม ..... .....43
การสร้าง 16S rRNA
รูปที่ 7 Autoradiogram ของ *M.kansasii* ATCC 12478 region A .....46
รูปที่ 8 Autoradiogram ของ *M.kansasii* ATCC 12478 region B .....47
รูปที่ 9 Autoradiogram ของ *M.fortuitum* ATCC 6841 region A ..... .....48
รูปที่ 10 Autoradiogram ของ *M.fortuitum* ATCC 6841 region B .....49
รูปที่ 11 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region A by sequencing primer pB .....50
รูปที่ 12 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region A by sequencing primer pC .....51
รูปที่ 13 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region B by sequencing primer pX .....52
รูปที่ 14 Autoradiogram ของ *M.tuberculosis* region B by sequencing primer pY..... 53
รูปที่ 15 Autoradiogram ของ *M.avium* region A by sequencing primer pB.....54
รูปที่ 16 Autoradiogram ของ *M.avium* region A by sequencing primer pC .....55
รูปที่ 17 Autoradiogram ของ *M.avium* region B by sequencing primer pX .....56
รูปที่ 18 Autoradiogram ของ *M.avium* region B by sequencing primer pY ..... .57
รูปที่ 19 Autoradiogram ของ *M.intracellulare* region A by sequencing primer pB .....58
รูปที่ 20 Autoradiogram ของ *M.intracellulare* region A by sequencing primer pC .....59
รูปที่ 21 Autoradiogram ของ *M.paraffinicum* region A..... 60
รูปที่ 22 Autoradiogram ของ *M.paraffinicum* region B.....61
รูปที่ 23 Autoradiogram ของ Isolate No 71 region A ..... .....62
รูปที่ 24 Autoradiogram ของ Isolate No 71 region B .....63

# คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

ddNTP = Dideoxynucleoside Triphosphate

dNTP = Deoxynucleoside Triphosphate

GLC = Gas Liquid Chromatographic Analysis

HIV = Human Immunodeficiency Virus

MAC = *Mycobacterium avium* complex

MOTT = Mycobacteria Other Than Tubercle Bacilli

mM = มิลลิโมลาร์

NASBA = Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

NTM = Nontuberculous Mycobacteria

PCR = Polymerase Chain Reaction

pmol = พิโคโมล

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphism

µM = ไมโครโมลาร์

µm = ไมโครเมตร

µl = ไมโครลิตร

16S rDNA = 16S ribosomal DNA

°ซ = องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย