

การจำแนกปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA
ที่เพิ่มจำนวน

นายวิรัช พวงภู



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-253-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อยีสต์แบบที่เตรียมโดยลำดับเบสของ
ชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวน

โดย

นายวิรัช พวงภู

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางการแพทย์

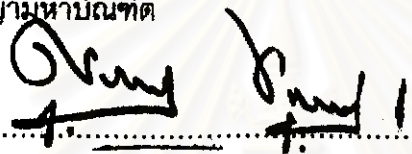
อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง รั้ววาสร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

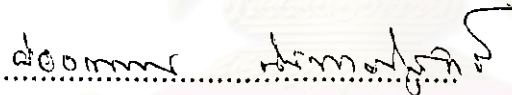
อาจารย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการ
ศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชูติวงศ์) คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



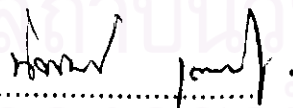
(รองศาสตราจารย์ ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ)

ประธานกรรมการ



(รองศาสตราจารย์ ดร.สมหญิง รั้ววาสร)

อาจารย์ที่ปรึกษา



(อาจารย์ นิพนธ์ อุดมสันติสุข)

กรรมการ



(นายแพทย์ เจริญ ชูโชติदार)

กรรมการ

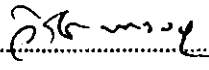
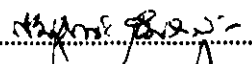
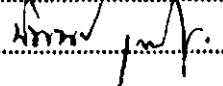
วิธี พวงภู : การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA ที่เพิ่มจำนวน (DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIUM BY DIRECT SEQUENCING OF AMPLIFIED 16S rDNA FRAGMENT) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมหญิง ธีมวาลร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นิพนธ์ อุดมสันติสุข; 78 หน้า. ISBN 974-331-235-8.

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิติต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

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 conventional 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 published 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 methods.

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



ภาควิชา..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต..... วิระ วรรณ

สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... นิพนธ์ วัฒน

ปีการศึกษา..... 2541..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... นิพนธ์ วัฒน



กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดีจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ และขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

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

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

รองศาสตราจารย์ ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์

นายแพทย์ เจริญ ชูโชติถาวร โรงพยาบาลโรคทรวงอกที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้ตัวอย่างเชื้อในการทำวิทยานิพนธ์

อาจารย์ เสาวนีย์ ขวัญเลิศจิตต์ และเจ้าหน้าที่ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความสนใจและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

คุณฉัญชลี ละอาด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณชาญณรงค์ สุดสามารท โรงพยาบาลโรคทรวงอก ที่กรุณาให้ตัวอย่างเชื้อในการทำวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
รายการตารางประกอบ	ฅ
รายการรูปประกอบ	ญ
คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์	ฎ
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

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 ปฏิกริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย	13
ตารางที่ 5 (ต่อ) ปฏิกริยาชีวเคมีของมัยโคแบคทีเรีย	14
ตารางที่ 6 ปฏิกริยาชีวเคมีหลักที่แยกมัยโคแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ	15
ตารางที่ 7 ความเสียหายทั่วโลกที่เกิดจากวัณโรคในปี ค.ศ. 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 ผลการทดสอบปฏิกริยาเคมี 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 สรุปผลการทดสอบปฏิกริยาชีวเคมี Accuprobe และหาลำดับเบสของ	65

รายการรูปประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 ส่วนประกอบผนังเซลล์ของมัคโคแบคทีเรีย	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 <i>M.kansasii</i> ATCC 12478 region A	46
รูปที่ 8 Autoradiogram ของ <i>M.kansasii</i> ATCC 12478 region B	47
รูปที่ 9 Autoradiogram ของ <i>M.fortuitum</i> ATCC 6841 region A	48
รูปที่ 10 Autoradiogram ของ <i>M.fortuitum</i> ATCC 6841 region B	49
รูปที่ 11 Autoradiogram ของ <i>M.tuberculosis</i> region A by sequencing primer pB	50
รูปที่ 12 Autoradiogram ของ <i>M.tuberculosis</i> region A by sequencing primer pC	51
รูปที่ 13 Autoradiogram ของ <i>M.tuberculosis</i> region B by sequencing primer pX	52
รูปที่ 14 Autoradiogram ของ <i>M.tuberculosis</i> region B by sequencing primer pY.....	53
รูปที่ 15 Autoradiogram ของ <i>M.avium</i> region A by sequencing primer pB.....	54
รูปที่ 16 Autoradiogram ของ <i>M.avium</i> region A by sequencing primer pC	55
รูปที่ 17 Autoradiogram ของ <i>M.avium</i> region B by sequencing primer pX	56
รูปที่ 18 Autoradiogram ของ <i>M.avium</i> region B by sequencing primer pY	57
รูปที่ 19 Autoradiogram ของ <i>M.intracellulare</i> region A by sequencing primer pB	58
รูปที่ 20 Autoradiogram ของ <i>M.intracellulare</i> region A by sequencing primer pC	59
รูปที่ 21 Autoradiogram ของ <i>M.paraffinicum</i> region A.....	60
รูปที่ 22 Autoradiogram ของ <i>M.paraffinicum</i> 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	= <i>Mycobacterium avium</i> 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
μ M	= ไมโครโมลาร์
μ m	= ไมโครเมตร
μ l	= ไมโครลิตร
16S rDNA	= 16S ribosomal DNA
°ซ	= องศาเซลเซียส