

การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification with
dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) ในการวินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ

Mycobacterium tuberculosis



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช

ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC RECOMBINASE POLYMERASE
AMPLIFICATION WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY (MAS-RPA-DC) FOR RIFAMPICIN
RESISTANCE *Mycobacterium tuberculosis* DETECTION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification with dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) ในการวินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

โดย

น.ส.มัทธวี โพธิกนิษฐ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันท์ ชัยชนะวงศาโรจน์)

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชาญวิทย์ ศรีพุทธรัตน์)

มัชฐาวี โพรทิกนิกซ์ : การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification with dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) ในการวินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*. (DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY (MAS-RPA-DC) FOR RIFAMPICIN RESISTANCE *Mycobacterium tuberculosis* DETECTION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล

วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่ทำให้การรักษาวัณโรคล้มเหลว และส่งผลให้การแพร่ระบาดของโรคงังคมีอัตราที่สูง วัณโรคดื้อยาหลายขนานเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin และยา Isoniazid พร้อมกัน โดยมากกว่า 90% ของวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin มักเกิดการดื้อยา Isoniazid ร่วมด้วยภายหลัง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* จึงสามารถใช้เป็นตัวแทนในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ วิธีทางอนุชีววิทยาที่ใช้วินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานในปัจจุบันต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและการดูแลซ่อมบำรุงอย่างสม่ำเสมอ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการและเป็นทางเลือกสำหรับการทดสอบที่ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะ สามารถให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง รวดเร็ว และนำไปประยุกต์ใช้ในงานภาคสนามได้ การศึกษารุ่นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ภายในยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในการทดสอบภายใต้ปฏิกิริยาเดียวกันและแบบอ่านผลด้วยตาเปล่า ภายหลังจากนำเทคนิค MAS-RPA-DC มาทดสอบกับ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิกจำนวน 141 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC มีความไวและความจำเพาะที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing โดยมีความไวในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516 rpoB526* และ *rpoB531* มีค่าเท่ากับ 100 % 70 % และ 98.2 % ตามลำดับ มีค่าความจำเพาะในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516 rpoB526* และ *rpoB531* เท่ากับ 95.5 % 97.5 % และ 97.7 % ตามลำดับ และมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีถึงดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์ของเชื้อจำนวน 125 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 83.2 % และ 100 % ตามลำดับ และมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดี เทคนิค MAS-RPA-DC มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถทดสอบได้เท่ากับ 1 ng/μl และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มักพบในการก่อโรคทางเดินหายใจ เทคนิค MAS-RPA-DC สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาเป็นชุดตรวจวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และเหมาะสำหรับใช้ในงานภาคสนามหรือโรงพยาบาลขนาดเล็ก เนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือที่จำเพาะที่มีราคาแพง และยังเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว อ่านผลปฏิกิริยาแบบ Multiplex ได้ด้วยตาเปล่า ไม่ซับซ้อน ราคาถูก มีความไวและความจำเพาะสูง

สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล	ลายมือชื่อนิสิต
	ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา	
	ภูมิคุ้มกัน	
ปีการศึกษา	2564	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6076754837 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), Rifampicin resistance, Multiplex allele specific-recombinase polymerase amplification with dipstick chromatography (MAS-RPA-DC), Dipstick chromatography

Mattawee Potiganit : DEVELOPMENT OF MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION WITH DIPSTICK CHROMATOGRAPHY (MAS-RPA-DC) FOR RIFAMPICIN RESISTANCE *Mycobacterium tuberculosis* DETECTION. Advisor: Asst. Prof. PANAN RATTHAWONGJIRAKUL, Ph.D.

Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is one of the causes of tuberculosis treatment failure resulting in a high incidence of the disease spreading. MDR-TB is tuberculosis that resists both rifampicin and isoniazid. Over 90% of rifampicin-resistant tuberculosis induce isoniazid resistance afterwards. Thus, the detection of rifampicin-resistant tuberculosis can be used as a surrogate marker for MDR-TB diagnosis. Molecular techniques used for MDR-TB diagnosis rely on expensive instrumentation and regular maintenance. Isothermal amplification has played a role in clinical laboratories as an alternative diagnostic test independent of specific instruments, which is accurate, rapid, and can be applied in fieldwork. This study aimed to develop multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification with dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) to simultaneously detect the *rpoB* gene mutations at codon 516 526 531 associated with rifampicin-resistant *M. tuberculosis* by naked eyes. A total of 141 DNA samples were extracted and tested by MAS-RPA-DC. The result of this study showed high sensitivity and specificity of the MAS-RPA-DC technique. The sensitivity of *rpoB*516 *rpoB*526 and *rpoB*531 mutation detection is 100%, 70% and 98.2%, respectively, compared to Sanger DNA sequencing. While the specificity of mutation detection of *rpoB*516 *rpoB*526 and *rpoB*531 are 95.5% 97.5% and 97.7%, respectively. MAS-RPA-DC showed substantial to an almost perfect agreement with Sanger DNA sequencing. Compared to a phenotypic susceptibility method, MAS-RPA-DC exhibited 83.2 % and 100 % sensitivity and specificity, respectively, with a substantial agreement. The detection limit of MAS-RPA-DC was 1 ng/μl, and no cross-reaction with the other respiratory tract infection bacteria was noticed. MAS-RPA-DC could be further developed as a test kit for MDR-TB diagnosis suitable for fieldwork or small healthcare settings. MAS-RPA-DC is a specific instrument free technique, which is rapid, multi targets detection by naked eyes, less complex, low cost, and high sensitivity and specificity.

Field of Study:	Molecular Science of Medical Microbiology and Immunology	Student's Signature
Academic Year:	2021	Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จและลุล่วงไปได้ด้วยดีจากการได้รับความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากบุคคลต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณามอบความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในทุกด้าน รวมถึงกรุณาช่วยเหลือปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ในฐานะนิสิตปริญญาโทที่ทำงานไปด้วยได้อย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลONI ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากสิ่งส่งตรวจกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอและทำการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบภายนอกมหาวิทยาลัย ในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รัชนิพร ดิยะวิสุทธิ์ศรี ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้องๆ ในห้องปฏิบัติชั้น 5 ตึกจุฬาพัฒน์ที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงให้คำปรึกษาต่างๆ จนทำให้ข้าพเจ้าทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2563

ขอขอบพระคุณ ทนพญ. รพีพรรณ อเนกวรรณ อดีตผู้อำนวยการสำนักงานชั้นสูตรสาธารณสุข และ ทนพญ. กิรตยา งามเลิศ นักเทคนิคการแพทย์เชี่ยวชาญ อดีตหัวหน้ากลุ่มจุลชีววิทยา สำนักงานชั้นสูตรสาธารณสุข ที่กรุณาอนุญาตให้ศึกษาต่อระดับปริญญาโทและสนับสนุนเวลาในการเรียนและการปฏิบัติงานวิจัย ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ทนพญ. เนย์ยี่ เชื้ออินทร์ และ ทนพญ. ธิดา มงคลแสงจันทร์ ตลอดจนผู้ร่วมปฏิบัติงานทุกคนที่สำนักงานชั้นสูตรสาธารณสุข ที่ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนการเรียนต่อระดับ

ปริญญาโทของข้าพเจ้าในทุกๆ ด้าน จนสามารถทำงานวิจัยในวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านเพื่อศึกษาต่อ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการเรียน และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณภาณุรังษิ วิวัฒน์นอม ที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการปฏิบัติงานวิจัยทุกๆ ด้าน ตลอดจนให้คำปรึกษาและให้กำลังใจจนสามารถผ่านช่วงเวลายากลำบาก และอุปสรรคที่เกิดขึ้นระหว่างการเรียนต่อระดับปริญญาโทของข้าพเจ้ามาได้จนข้าพเจ้าบรรลุเป้าหมายที่ตั้งใจ

จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

มัชฌาวิ โปธิกนิษฐ



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญรูปภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
3. ขอบเขตของงานวิจัย	6
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
1. โรควัณโรค (Tuberculosis : TB).....	7
2. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	7
3. การติดต่อของวัณโรค	8
4. พยาธิสภาพ.....	9
5. ยาต้านวัณโรค	10
6. ยา Rifampicin	11
7. การดื้อยา Rifampicin	12
8. บทบาทของการดื้อยา Rifampicin ที่มีต่อการบ่งชี้วัณโรคดื้อยาหลายขนาน	14
9. สถานการณ์วัณโรคและการติดเชื้อมื้อยาวัณโรคชนิด Rifampicin.....	15

10. การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคในห้องปฏิบัติการ.....	15
10.1 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์.....	15
10.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางจีโนไทป์	17
11. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Isothermal Amplification.....	18
12. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA)	20
13. การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	23
13.1 การตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis	23
13.2 การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I	24
13.3 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิคของไหลจุลภาค (Microfluidic).....	25
13.4 การตรวจสอบผลผลิตด้วยกล้องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (Real time fluorescence detection system).....	26
13.5 การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Lateral flow	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	30
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	30
2. เครื่องมือ	31
3. การออกแบบงานวิจัย	31
3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rpoB</i> ด้วยเทคนิค DNA Sequencing	31
3.2 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) พัฒนาเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับการตรวจวัดผลผลิตด้วย Dipstick	32
3.3 การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์คลินิกด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	32
3.4 การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-RPA-DC ในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	32

4. วิธีการทดลอง	33
4.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง	33
4.2 การพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน	34
4.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา	34
4.4 เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์มาตรฐาน	35
4.5 เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ตัวแทนสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโค ดอน 516 526 และ 531	35
4.6 การสกัด DNA ของ <i>M. tuberculosis</i>	36
4.7 Primer ที่ใช้ในการศึกษา	36
4.7.1 Primer ที่จำเพาะต่อยีน <i>rpoB</i> เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR	36
4.7.2 Primer เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA	37
4.8 การวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	40
4.8.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>rpoB</i> ด้วยปฏิกิริยา PCR	40
4.8.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rpoB</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing	41
4.9 การพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC)	41
4.9.1 การเตรียมแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	41
4.9.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Multiplex allele-specific recombinase polymerase ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS- RPA-DC)	44
4.9.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	45
4.9.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมในการทำ ปฏิกิริยา	46

4.9.2.3 การทดสอบหาระยะเวลาบ่มที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	47
4.9.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dipstick modified developing buffer ในการตรวจสอบผลผลิต	48
4.9.2.5 การทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ Streptavidin-coated blue latex beads ในการตรวจสอบผลผลิต.....	49
4.9.2.6 การทดสอบหาอัตราส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม	50
4.9.2.7 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา.....	50
4.9.2.8 การทดสอบหาระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลผลิต	51
4.10 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค MAS-RPA-DC	52
4.11 การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (Limit of detection; LOD) ของ DNA ต้นแบบที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC.....	52
4.12 การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	53
4.13 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa ของเทคนิค MAS-RPA-DC.....	54
4.13.1 การประเมินค่าความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa.....	56
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย.....	58
1. ผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา	58
2. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rpoB</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing	59
2.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>rpoB</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	59
2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR	60
3. การพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC).....	64

3.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	65
3.2 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	67
3.3 ผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	90
3.4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dipstick modified developing buffer ในการตรวจสอบผลผลิต ด้วย Dipstick chromatography	94
3.5 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ Streptavidin-coated blue latex beads ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography	104
3.6 ผลการทดสอบหาอัตราส่วนการเจือจางในการตรวจสอบผลผลิตที่เหมาะสมจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography	109
3.7 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา	113
3.8 ผลการทดสอบระยะเวลาในการจุ่มแผ่นทดสอบที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลผลิตจาก ปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography	116
3.9 สรุปสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB516</i> ยีน <i>rpoB526</i> และยีน <i>rpoB531</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	120
4. ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค MAS-RPA-DC	121
5. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถทดสอบได้ด้วยปฏิกิริยา MAS-RPA-DC (Limit of Detection; LOD).....	122
6. ผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของ เชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC....	124
7. ผลการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) และค่าความ สอดคล้องจากสถิติ Kappa ของเทคนิค MAS-RPA-DC	126
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	132
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	147

บรรณานุกรม.....	149
ประวัติผู้เขียน.....	163



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....	39
ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายละเอียดความเข้มข้นของ Primer แต่ละชุดที่ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม	46
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค DNA sequencing ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 141 ตัวอย่าง.....	55
ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 125 ตัวอย่าง.....	55
ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค DNA sequencing เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 125 ตัวอย่าง.....	56
ตารางที่ 6 ตารางแสดงตัวอย่างของผลการทดสอบที่แตกต่างกัน 2 วิธี.....	57
ตารางที่ 7 การแปลผลความสอดคล้องกันทางสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Cohen	57
ตารางที่ 8 สรุปรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบนลำดับเบสของยีน <i>rpoB</i> ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing.....	61
ตารางที่ 9 สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB516</i> ยีน <i>rpoB526</i> และยีน <i>rpoB531</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>	120
ตารางที่ 10 ตารางแสดงรายละเอียดการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC เพื่อวินิจฉัย IS1081 ยีน <i>rpoB516</i> ยีน <i>rpoB526</i> และยีน <i>rpoB531</i>	122
ตารางที่ 11 สรุปการตรวจพบ IS1081 และการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของ <i>M. tuberculosis</i> จำนวน 141 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC.....	125
ตารางที่ 12 สรุปผลการวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 จำนวน 125 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	126

- ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing..... 127
- ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 129
- ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 108 ตัวอย่าง ซึ่งมีการกลายพันธุ์เฉพาะในตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960..... 130
- ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของเทคนิค Sanger DNA sequencing ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 131

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยา Rifampicin	12
รูปที่ 2 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification	21
รูปที่ 3 ตัวอย่างเทคนิค PCR-dipstick chromatography	28
รูปที่ 4 ตัวอย่างการออกแบบ Allele-specific primer ตามวิธีของ Yaku-Bonczyk.....	38
รูปที่ 5 ตัวอย่างจำลองแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อยา Rifampicin.....	42
รูปที่ 6 ตัวอย่างการอ่านผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> สำหรับวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531	43
รูปที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยา <i>Rifampicin</i> ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ..	59
รูปที่ 8 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>rpoB</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5 %.....	59
รูปที่ 9 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA ด้วย IS1081 primer <i>rpoB</i> 516 primer <i>rpoB</i> 526 primer และ <i>rpoB</i> 531 primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %.....	65
รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบความเข้มข้นต่างกัน	66
รูปที่ 11 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1	68
รูปที่ 12 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2	70
รูปที่ 13 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3	71
รูปที่ 14 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4	73
รูปที่ 15 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5	75
รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6	76

รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7	78
รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 8	80
รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9	81
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10	83
รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 11	85
รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 12	86
รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 13	88
รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 14	90
รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ ระยะเวลาบ่มปฏิกิริยา	94
รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ กับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 0 150 และ 300 mM	97
รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ กับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 160 180 200 220 240 260 และ 280 mM	103
รูปที่ 28 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ กับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM กับ Streptavidin-coated blue latex beads	108
รูปที่ 29 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อเจือจาง ผลผลิต MAS-RPA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	112
รูปที่ 30 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ ที่อุณหภูมิในการบ่มปฏิกิริยา	115
รูปที่ 31 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ หาระยะเวลาในการจุ่มแผ่นทดสอบ	119
รูปที่ 32 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	121
รูปที่ 33 การตรวจสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC	123



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคติดเชื้อวัณโรค (Tuberculosis : TB) มีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* และเป็นปัญหาสำคัญระดับโลกที่ทั้งนักวิจัย หน่วยงานทางสาธารณสุขต่างๆ รวมถึงองค์การอนามัยโลก World Health Organization (WHO) เห็นพ้องต้องกัน ในการหามาตรการลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรค รวมไปถึงการควบคุม ป้องกัน และรักษาวัณโรคให้หมดสิ้นไป จากรายงานการประชุมเกี่ยวกับวัณโรคขององค์การอนามัยโลกประจำปี พ.ศ.2563 ระบุว่าในปี พ.ศ.2562 มีประชากรจากทั่วโลกถึง 10 ล้านคนติดวัณโรค โดยประเทศที่มีอัตราผู้ป่วยวัณโรคสูงที่สุดอันดับหนึ่งคือประเทศอินเดีย รองลงมาคือประเทศอินโดนีเซีย และประเทศจีนตามลำดับ ในขณะที่ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีอัตราผู้ติดเชื้อวัณโรคสูงที่สุดทั่วโลก (High tuberculosis burden countries) โดยในปี พ.ศ.2562 ประเทศไทยมีจำนวนผู้ติดเชื้อวัณโรคเท่ากับ 105,000 คน ซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) จำนวน 10,000 คน (1) แม้ว่าอัตราของผู้ป่วยวัณโรคที่พบจะมีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับในอดีต แต่การลดลงของผู้ป่วยดังกล่าวยังอยู่ในอัตราที่ต่ำ ทำให้วัณโรคยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่ยังต้องการการแก้ไขอย่างเร่งด่วน

ในปัจจุบันแม้จะมีการพัฒนายาต้านเชื้อวัณโรคขึ้นมาช่วยในการรักษา แต่พบว่าอุปสรรคของการรักษาที่สำเร็จประกอบไปด้วยหลายปัจจัย อาทิเช่น ประชากรในประเทศด้อยพัฒนาหรือกำลังพัฒนาไม่สามารถเข้าถึงการวินิจฉัยได้หรือไม่สามารถจ่ายค่ารักษาพยาบาลได้ จึงไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสม อีกทั้งการรักษาที่ใช้ระยะเวลานาน ทำให้ผู้ป่วยขาดการรักษา และหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการรักษาที่ล้มเหลวคือการเกิดวัณโรคดื้อยา (2) ข้อมูลขององค์การอนามัยโลกระบุว่าในปี พ.ศ.2562 ผู้ป่วยใหม่ที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin มีจำนวนมากถึง 465,000 คน ในขณะที่มีประชากรจำนวนมากถึง 78% ของจำนวนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Rifampicin ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานหรือ Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) โดยในประเทศไทยมีอัตราผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin และวัณโรคดื้อยาหลายขนานในปี พ.ศ.2562 ประมาณ 2,500 คน (1) การติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อวัณโรคที่มี

ประสิทธิภาพดีที่สุดพร้อมกัน 2 ชนิด ได้แก่ ยา Rifampicin และยา Isoniazid อย่างไรก็ตามมากกว่า 90% ของการดื้อต่อยา Rifampicin มักส่งผลให้มีการดื้อต่อยา Isoniazid ร่วมด้วยในภายหลัง การตรวจวินิจฉัยหาการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* จึงสามารถใช้เป็นตัวแทน (Surrogate marker) ในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ (3)

สาเหตุหลักของการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* มักเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียวของยีน *rpoB* (4) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์ภายใน 81 bp ณ บริเวณ Rifampicin resistance determining regions : RRDRs ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง β -subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase ที่เป็นเป้าหมายของยา ทำให้ยา Rifampicin ไม่สามารถจับได้และส่งผลให้ยาไม่ออกฤทธิ์ต่อตัวเชื้อ (5) ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบว่าสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin และพบมากที่สุดได้แก่ การกลายพันธุ์ที่โคดอน 516 526 และ 531 (6) การศึกษาในประเทศไทยพบว่าอัตราการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนดังกล่าวทั้งสามมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าที่ตำแหน่งโคดอน 531 มีอัตราความชุกสูงที่สุด เท่ากับ 58% รองลงมาคือตำแหน่งโคดอน 526 และ 516 ซึ่งมีอัตราความชุกเท่ากับ 25.2% และ 9.1% ตามลำดับ (7) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่พบทั้งสามตำแหน่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ในระดับสูง (8) และมักถูกนำมาใช้ในการพัฒนาเพื่อวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาในปัจจุบัน

การวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านวัณโรคเป็นส่วนผสมเพื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียาต้านวัณโรคเป็นส่วนผสม และอ่านผลการทดสอบด้วยการคำนวณจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่เปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยาต้านวัณโรค (9) ซึ่งมีข้อจำกัดที่สำคัญได้แก่ การใช้เวลาในการทดสอบที่นาน 3 - 4 สัปดาห์ จึงทำให้เกิดความล่าช้าในการปรับการรักษาให้มีความเหมาะสม ส่งผลต่อผู้ป่วยที่แพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่นได้ (10) ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้รับรองเทคนิคทางจีโนไทป์สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยา ได้แก่ การทดสอบด้วยเทคนิค Xpert MTB/RIF ซึ่งอาศัยหลักการตรวจหาชิ้นส่วนของยีน *rpoB* โดยใช้ Molecular beacon probes จำนวน 5 Probe ที่ครอบคลุมบริเวณ RRDRs ของยีน *rpoB* ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่ 507-533 ในเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยา Rifampicin ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ ณ บริเวณ RRDRs ทำให้ Probe สามารถจับกับลำดับเบสของ DNA ต้นแบบได้ และส่งผลให้สารเรืองแสงที่ติดฉลากไว้ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา (11)

ในขณะที่การทดสอบด้วยเทคนิค Line probe assay (LPA) อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา เช่น ยีน *rpoB* ด้วย Primer ที่จำเพาะภายใต้ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ผลผลิตที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจสอบผ่านการจับกันของ Probe ที่จำเพาะที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่น nitrocellulose ซึ่งหากเป็นเชื้อวัณโรคที่ไม่ดื้อยา Rifampicin และไม่มีการกลายพันธุ์ ณ บริเวณ RRDRs สารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้นมาจะสามารถจับกับ Wild types (WT) probes ได้ และสังเกตเห็นเป็นแถบบนแผ่น nitrocellulose (12) การทดสอบด้วยวิธีทางจีโนมไทป์ทั้งสองให้ผลการทดสอบที่แม่นยำ มีความไวสูง และสามารถทดสอบได้ภายในระยะเวลาที่รวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางพีโนไทป์ แต่พบว่ามีข้อจำกัดบางประการ ได้แก่ ราคาที่แพง และต้องใช้เครื่องมือที่ต้องการการซ่อมบำรุงอย่างต่อเนื่อง (13) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการใช้งานไปใช้วินิจฉัยวัณโรคดื้อยาในสถานพยาบาลขนาดเล็ก และอาจทำให้ผู้ป่วยที่มีรายได้น้อยไม่สามารถเข้าถึงการวินิจฉัยได้ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรค

เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) เป็นหนึ่งในเทคนิค Isothermal amplification ซึ่งอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้การควบคุมอุณหภูมิที่คงที่ตลอดการดำเนินงาน จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม อีกทั้งยังเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมจำนวนตั้งต้นในระดับต่ำได้ มีขั้นตอนการออกแบบ Primer และขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก มีระยะเวลาการทดสอบที่รวดเร็วประมาณ 10 - 40 นาที ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิค RPA มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาต่างๆ ได้แทนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เช่น การตรวจหาวัณโรคด้วย Primer ที่จำเพาะ (14) หรือการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจ (15) นอกจากนี้เทคนิค RPA ยังมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจแบบรวดเร็ว และการตรวจแบบ Point-of-care testing (POCT) เพื่อวินิจฉัยทางอณูชีววิทยาได้อีกมากมาย (16)

จากที่กล่าวมาข้างต้น การดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* มีสาเหตุหลักมาจากการกลายพันธุ์หนึ่งตำแหน่งของยีน *rpoB* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 การทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางจีโนมไทป์จึงมักอาศัยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของโคดอนดังกล่าว ไม่ว่าจะเป็นการหาลำดับเบส การทดสอบด้วยเทคนิค Xpert MTB/RIF หรือการทดสอบด้วยเทคนิค LPA การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Allele-specific primer ที่สามารถ

จำแนกตำแหน่งการกลายพันธุ์ได้ เช่น เทคนิค Allele-specific PCR อาศัยการออกแบบ Primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งโคดอนหนึ่งตำแหน่งที่มักพบการกลายพันธุ์ของยีน และแปลผลการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นด้วยการตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การศึกษาเพื่อวินิจฉัยวัณโรคที่อยู่ที่ยานที่ผ่านมามีการพัฒนาเทคนิคเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับการใช้ Allele-specific primer ที่จำเพาะต่อตำแหน่งโคดอนที่มักพบการกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการหาลำดับเบส ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมิกส์ (6)

การตรวจสอบผลผลิตหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA สามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่หลากหลาย อาทิเช่น เทคนิคการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าภายใต้เจลตัวกลางค้ำจุน (Gel electrophoresis) ซึ่งสามารถใช้ระบุหรือแยกสารพันธุกรรมที่มีขนาดกลางถึงใหญ่ และมีช่วงของการแยกกว้าง อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องแยกสาร (Electrophoresis tank) รวมไปถึงการใช้วุ้นและสีย้อมเพื่อเตรียมเจล และต้องทำการ Purify ผลผลิต RPA ก่อนนำมาแยกภายใต้กระแสไฟฟ้า (17) ทำให้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ในขณะที่การอ่านแถบผลผลิตอาจไม่ชัดเจนในบางครั้ง เนื่องจากเกิดการฟุ้งกระจายขณะถูกแยกภายใต้กระแสไฟฟ้า (18) เทคนิคการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR Green I ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของสีที่เข้าจับกับ DNA สายคู่ตรงตำแหน่ง Minor groove และปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมา ซึ่งสามารถสังเกตและอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า (14) ข้อดีของเทคนิค SYBR Green I นี้ ได้แก่ ราคาไม่แพง (19) และสามารถอ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่าได้ทันที (20) อย่างไรก็ตามเทคนิค SYBR Green I อาจให้การอ่านผลที่เป็นผลบวกปลอม เนื่องจากสีมีโอกาสเข้าจับกับ Primer-dimer ที่อยู่ในผลผลิต RPA ได้ ส่งผลให้การทดสอบมีความจำเพาะต่ำ (21) อีกทั้งไม่สามารถใช้เทคนิค SYBR green I วิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบหลายเป้าหมาย (Multiplex amplification) พร้อมกันได้ (19) เทคนิค Microfluidic ซึ่งอาศัยหลักการไหลของสิ่งตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นของเหลวจากแรง Capillary บน Lab-on-a-chip (LOC) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และเนื่องจากต้องใช้ Chip สำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่มีขนาดเล็กมากจึงทำให้พกพาได้สะดวกและสามารถใช้น้ำยาและสิ่งตัวอย่างได้ในปริมาณน้อย อย่างไรก็ตามเทคนิค Microfluidic นั้นมีราคาแพง ใช้เวลานานในการขึ้นแบบพิมพ์บน Chip และมีการจำกัดขนาดของการออกแบบแผ่นพิมพ์บน Chip ซึ่งอาจทำให้แผ่นพิมพ์มีขนาดเล็กและไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ (22) ในขณะที่เทคนิค Lateral flow อาศัยหลักการของ Chromatography โดยให้

สิ่งตัวอย่างซึ่งเป็นของเหลวที่ต้องการตรวจวัดที่เคลื่อนที่โดยปราศจากแรงภายนอกผ่านบริเวณต่างๆ ของแผ่นทดสอบ (Strip) ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถจับกับสารที่ต้องการตรวจวัดเคลื่อนอยู่ (23) ข้อดีของเทคนิค Lateral flow มีหลายประการ อาทิเช่น สามารถแปลผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง ใช้ระยะเวลาในการทำการทดสอบที่สั้น และสามารถพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องมือทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วยได้ (24)

การศึกษาครั้งนี้ต้องการพัฒนาเทคนิคสำหรับวินิจฉัยวัณโรคคือยา Rifampicin ซึ่งจัดว่าเป็น Surrogate marker สำหรับเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน โดยเทคนิคที่จะพัฒนาขึ้นอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA ด้วย Primers ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 และตรวจสอบผลผลิตแบบอ่านผลด้วยตาเปล่าบนแถบ Dipstick chromatography และเรียกเทคนิคที่พัฒนาขึ้นว่า Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification with dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) ทั้งนี้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นจะช่วยวินิจฉัยการคือยา Rifampicin ของเชื้อวัณโรคได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถนำไปใช้ในสถานพยาบาลขนาดเล็กได้ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากสามารถเข้าถึงการวินิจฉัยได้ง่ายขึ้น ส่งผลต่อการพิจารณาให้การรักษาที่เหมาะสมต่อไป อันจะช่วยลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรคได้

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* แบบอ่านผลด้วยตาเปล่า

2.2 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้น ในการวินิจฉัยความไวต่อยา Rifampicin ของ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing และเทคนิค BACTEC MGIT 960

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นตัวอย่าง DNA ซึ่งสกัดมาจากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ (Left over specimen) และบางส่วนมาจากสิ่งตรวจเสมหะโดยตรงของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกันจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น และจากห้องปฏิบัติการสังกัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งไม่ได้รับอนุญาตให้เปิดเผยแหล่งที่มา โดยตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpoB* ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่ 507-533 ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing และพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC สำหรับการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ DNA ความเข้มข้นของ Primer อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และใช้ Dipstick chromatography ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-RPA จากนั้นเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างเทคนิค MAS-RPA-DC กับเทคนิค Sanger DNA sequencing และเทคนิค BACTEC MGIT 960 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่ได้พัฒนาขึ้นมา

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้เทคนิค MAS-RPA-DC ที่มีประสิทธิภาพและสามารถปฏิบัติได้อย่างไม่ซับซ้อนสำหรับการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin โดยสามารถใช้เทคนิค MAS-RPA-DC ไปประยุกต์เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นเครื่องมือทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย หรือ Point of care testing (POCT) ในอนาคต เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองวัณโรคดื้อยา Rifampicin ที่รวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการรักษาที่เหมาะสมอย่างทันที่ และช่วยควบคุมการแพร่กระจายของวัณโรคได้ นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยลดกระบวนการ อุปกรณ์ และค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์และบำรุงรักษาเครื่องมือขั้นสูง ซึ่งเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่ขาดแคลนบุคลากรปฏิบัติงาน หรือไม่มีอุปกรณ์เพียงพอต่อการตรวจวินิจฉัย หรือสถานพยาบาลขนาดเล็ก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรควัณโรค (Tuberculosis : TB)

วัณโรคเป็นโรคติดต่อชนิดเรื้อรังซึ่งแพร่กระจายได้ในอากาศ (25) โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *Mycobacterium* กลุ่มที่ก่อให้เกิดวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis* complex : MTBC) ได้แก่ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium dassie* และ *Mycobacterium oryx* (26) อย่างไรก็ตามเชื้อ MTBC สายพันธุ์ที่พบว่าเป็นสาเหตุหลักของการเกิดวัณโรค คือ เชื้อ *M. tuberculosis* จากรายงานการประชุมเกี่ยวกับวัณโรคของ WHO ประจำปี พ.ศ.2563 ระบุว่าในปี พ.ศ.2562 มีประชากรจากทั่วโลกถึง 10 ล้านคนติดเชื้อวัณโรค โดยมีประชากรจำนวน 1.2 ล้านคนเสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรคซึ่งไม่ได้ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HIV ในขณะที่มีประชากรจำนวน 208,000 คนเสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรคร่วมกับเชื้อ HIV โดยการติดเชื้อวัณโรคนั้นมีในทุกประเทศและทุกกลุ่มอายุ อย่างไรก็ตามพบว่า 56 % ของผู้ที่ติดเชื้อเป็นวัยผู้ใหญ่เพศชาย รองลงมาคือวัยผู้ใหญ่เพศหญิง พบ 32 % และพบในวัยเด็ก 12 % โดยประเทศที่มีอัตราผู้ป่วยวัณโรคสูงที่สุดอันดับหนึ่ง คือประเทศอินเดีย รองลงมาคืออินโดนีเซียและจีนตามลำดับ ในขณะที่ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีอัตราผู้ติดเชื้อวัณโรคสูงที่สุดทั่วโลก โดยในปี พ.ศ.2562 ประเทศไทยมีอัตราผู้ติดเชื้อวัณโรคเท่ากับ 105,000 คน ซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อร่วมกับเชื้อ HIV จำนวน 10,000 คน (1) ทั้งนี้ปัญหาการดื้อยาต้านเชื้อวัณโรคนับเป็นปัญหาวิกฤตทางสาธารณสุขอีกอย่างหนึ่งโดยพบว่าปัจจัยเสี่ยง 5 ปัจจัยแรกที่ทำให้เกิดการติดเชื้อวัณโรคในประเทศไทยดังต่อไปนี้ การสูบบุหรี่ การขาดสารอาหาร โรคเบาหวาน การดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV (1)

2. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ *M. tuberculosis*

M. tuberculosis เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินหายใจของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (26) และเป็นสาเหตุหลักของวัณโรคซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้คนจำนวนมากทั่วโลก โครโมโซมของ

แบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะเป็นวงกลมเส้นเดี่ยว ขนาดประมาณ 4.4 Mb (27) เมื่อทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพบรูปร่างของเชื้อเป็นลักษณะแท่ง ความยาวประมาณ 1 - 4 μm เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ และสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ (27) และพบโคโลณีสีลักษณะขรุขระ สีครีม ค่อนข้างมันวาว (26) ลักษณะที่สำคัญอีกประการของเชื้อคือเป็นแบคทีเรียที่ติดสีทนกรดจากการย้อมด้วยสี Phenicated fuchsin เนื่องจากมีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยไขมันเชิงซ้อนอย่าง Mycolic acid จำนวนมาก (26) นอกจากคุณสมบัติข้างต้น ในส่วนของการดำรงชีวิตของเชื้อ

M. tuberculosis จะอาศัยอยู่ในสถานะที่มีออกซิเจนเท่านั้น และมีความสามารถในการหลบหลีกจากกระบวนการจับกินของ Macrophage อยู่ภายในร่างกายของมนุษย์ (27)

3. การติดต่อของวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่แพร่กระจายผ่านทางอากาศจึงมักติดต่อผ่านการหายใจเป็นหลัก เมื่อผู้ป่วยวัณโรคไอ จาม ขากเสมหะ หรือแม้กระทั่งพูดสนทนา จะมีเชื้อ *M. tuberculosis* ฝุ้งกระจายออกมาพร้อมกับสารคัดหลั่งของทางเดินหายใจ (28) โดยมีลักษณะเป็นอนุภาคขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 5 μm เรียกว่า droplet nuclei ซึ่งสามารถลอยอยู่ในอากาศได้นานหลายชั่วโมง เมื่อมีผู้สูดหายใจรับเอา droplet nuclei ที่มีเชื้อ *M. tuberculosis* เข้าไปสู่ร่างกายผ่านทางปากหรือจมูก ผ่านไปสู่ทางเดินหายใจส่วนบน หลอดลม (bronchi) และเข้าไปในถุงลมปอด (alveoli) ตามลำดับ (29) นอกจากนั้นยังพบว่าวัณโรคสามารถติดต่อได้ผ่านการรับประทาน โดยมีรายงานพบการแพร่เชื้อผ่านทางน้ำนมที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ การติดต่อผ่านการฉีด vaccine เข้าร่างกายโดยตรง (direct inoculation) (30) การสัมผัสเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อวัณโรค การได้รับเชื้อผ่านทางบาดแผลหรือเยื่อบุตาขาว หรือการได้รับเชื้อจากแม่สู่ลูกผ่านทางสายสะดือ (31) อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์การติดต่อดังกล่าวพบได้ในอัตราส่วนที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การติดต่อผ่านการหายใจ (30)

4. พยาธิสภาพ

เมื่อเชื้อ *M. tuberculosis* เข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ เชื้อจะมีกลไกที่ทำให้เกิดการดำเนินของโรค ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน โดยที่แต่ละขั้นตอนมีความเกี่ยวข้องกัน ดังรายละเอียดที่อธิบายด้านล่าง

ระยะแรกเมื่อมนุษย์ได้รับเชื้อผ่านทางหายใจรับเอา Droplet nuclei ที่มีเชื้อ *M. tuberculosis* ซึ่งลอยอยู่ในอากาศเข้าไป เชื้อจะเดินทางผ่านทางเดินหายใจส่วนบนสู่ถุงลม จากนั้นจะถูกเซลล์ที่มีคุณสมบัติจับกิน (Phagocytic cells) ชนิดต่างๆ เช่น Alveolar macrophage Dendritic cells และ Monocytes เข้าจับกิน (32) แม้ว่า Alveolar macrophage จะเป็น Phagocytic cells หลักในการจับกินเพื่อเป็นกลไกในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพ แต่เชื้อ *M. tuberculosis* มีการพัฒนากลวิธีมากมายในการเอาชีวิตรอดและตั้งถิ่นฐานในเซลล์ของเจ้าบ้านได้ กลวิธีเหล่านี้ประกอบไปด้วย การลดการทำให้เกิดกรดของถุง phagosome ซึ่งมีเชื้อ

M. tuberculosis อยู่ การเปลี่ยนแปลง phagosome trafficking pathway การเปลี่ยนแปลงการสร้างโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ phagosome และการรวมตัวกันของโปรตีนหลายประเภทที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ phagosome กลไกทั้งหมดที่กล่าวมาส่งผลให้เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถหลบหลีกการถูกกำจัดในขณะที่อาศัยอยู่ในเซลล์จับกิน และเพิ่มจำนวนเชื้อไปจนถึงระดับปานกลางในระยะเริ่มต้นนี้ได้ (32)

ระยะที่สอง ระยะเวลาที่ใช้ในการติดเชื้อจะขึ้นอยู่กับ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องจะมีอาการติดเชื้อแบบเฉียบพลันโดยร่างกายไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเชื้อที่เกิดขึ้นจากในระยะแรกได้ และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปยังบริเวณอื่น ส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่มีการพัฒนาไปเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (Active tuberculosis) มักมีอาการอ่อนแรง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีไข้ต่ำ เริ่มแสดงอาการเรื้อรัง และมีอาการไอซึ่งสามารถแพร่กระจายเชื้อได้ (32) ในขณะที่ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติ ร่างกายจะใช้ระบบภูมิคุ้มกันป้องกันหรือกำจัดเชื้อเบื้องต้น หรืออาจใช้กลไกอื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ กลไกที่ช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อ กลไกที่จำกัดการแพร่กระจายของเชื้อ และกลไกที่ช่วยให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันตอบสนองสู่บริเวณที่มีการติดเชื้อได้โดยตรง ถึงแม้ว่าผู้ป่วยเหล่านี้จะติดเชื้อวัณโรคต่อไปเป็นเวลานาน (persistently) และยังคงเป็นพาหะที่มีเชื้อแฝง แต่ผู้ป่วยเหล่านี้จะไม่มีอาการของวัณโรคแสดงออกมา

(Latent tuberculosis) (32) อย่างไรก็ตามหากทำการทดสอบภาวะภูมิคุ้มกันไวเกินชนิดที่ 4 (delayed-type hypersensitivity response) จะให้ผลทดสอบที่เป็นบวกทั้งในกลุ่มของผู้ป่วย Active tuberculosis และกลุ่มของคนที่มีภาวะ Latent tuberculosis (32)

ระยะที่สาม ระยะนี้เกิดจากการตื่นตัวอีกครั้ง (Reactivation) ของเชื้อ *M. tuberculosis* จากระยะหลบซ่อนในผู้ที่มีภาวะ Latent tuberculosis ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและกลายเป็นผู้ป่วย Active tuberculosis ทั้งนี้การเกิด Reactivation มักพบในอัตรา 10% ของผู้ที่มีภาวะ Latent tuberculosis โดยกลไกในการ Reactivate นั้นไม่เป็นที่ปรากฏแน่ชัดนัก อย่างไรก็ตามสันนิษฐานว่าเกี่ยวข้องกับสถานะภูมิคุ้มกันของร่างกายของผู้ที่มีเชื้อ อาทิเช่น อายุ ภาวะทุพโภชนาการ รวมไปถึงมีการกดภูมิคุ้มกันไว้จากปัจจัยต่างๆ เช่น การติดเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) หรือการรักษาด้วยยาสตีรอยด์ (32)

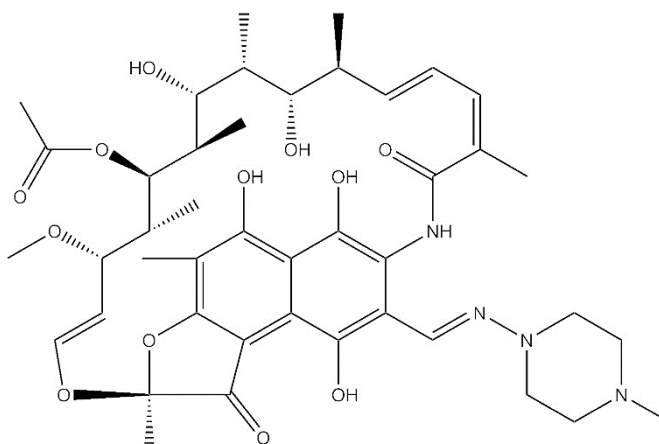
5. ยาด้านวัณโรค

องค์การอนามัยโลกได้ทำการแบ่งกลุ่มของยาด้านวัณโรคออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ยาด้านวัณโรคกลุ่มแรก (First-line oral anti-TB drugs) ได้แก่ ยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Ethambutol และยา Pyrazinamide กลุ่มที่ 2 ยาด้านวัณโรคกลุ่มที่สอง ชนิดที่ใช้เป็นยาฉีด (Injectable anti-TB drugs) ได้แก่ ยา Streptomycin ยา Kanamycin ยา Amikacin และยา Capreomycin กลุ่มที่ 3 ยาด้านวัณโรคกลุ่ม Fluoroquinolones ได้แก่ ยา Levofloxacin ยา Moxifloxacin ยา Gatifloxacin และยา Ofloxacin กลุ่มที่ 4 ยาด้านวัณโรคกลุ่มที่สองชนิดที่ใช้รับประทาน (Oral bacteriostatic second-line anti-TB drugs) ได้แก่ ยา Ethionamide/Prothionamide ยา Cycloserine/Terizidone และยา p-aminosalicylic acid และกลุ่มที่ 5 ยาด้านวัณโรคชนิดที่มีข้อจำกัดของประสิทธิภาพและความปลอดภัยในระยะยาว (Anti-TB drugs with limited data on efficacy and long-term safety in the treatment of drug-resistant TB) ได้แก่ ยา Bedaquiline ยา Delamanid ยา Linezolid และ ยา Clofazimine เป็นต้น (33) ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคนั้นจะเลือกใช้ยาด้านเชื้อวัณโรคตามกรณีของผู้ป่วย อาทิเช่น ผู้ป่วยวัณโรคชนิดที่ไวต่อยาด้านวัณโรค และไม่เคยมีประวัติคือยาด้านวัณโรคมามาก่อน จะได้รับยาด้านเชื้อวัณโรคกลุ่มแรกเป็นระยะเวลา 6 เดือนต่อการรักษาหนึ่งครั้ง ผู้ป่วยวัณโรคคือยา Rifampicin เพียงขนานเดียว (Rifampicin resistance tuberculosis : RR-TB) และผู้ป่วยวัณโรคชนิดคือยา

หลายขนาน (Multidrug resistance tuberculosis : MDR-TB) ซึ่งเป็นผู้ป่วยวัณโรคที่ดื้อต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือยา Isoniazid และยา Rifampicin จะได้รับยาต้านวัณโรคกลุ่มที่ 2 ชนิดที่ใช้เป็นยาชนิด และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิดรุนแรง (Extensive drug resistance tuberculosis : XDR-TB) ซึ่งเป็นผู้ป่วยวัณโรคชนิด MDR-TB ที่ดื้อต่อยาอย่างน้อย 1 ชนิดจากยาต้านวัณโรคกลุ่ม Fluoroquinolones และเพียง 1 ชนิดจากยาต้านวัณโรคกลุ่มที่ 2 ชนิดที่ใช้เป็นยาชนิด (1) โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้จะได้รับยาร่วมกันหลายชนิดตามการพิจารณา อาทิเช่น ยา Bedaquiline และยา Capreomycin เป็นต้น (34)

6. ยา Rifampicin

การรักษาวัณโรคด้วยเคมีบำบัดในระยะเวลาอันสั้นนั้นใช้เวลาเริ่มต้นในการรักษาประมาณ 2 เดือนต่อเนื่องไปจนถึง 4 เดือน และมียาที่ใช้รักษาอย่างเคร่งครัดอันประกอบไปด้วยยาต้านวัณโรคกลุ่มแรก ได้แก่ ยา Rifampicin ยา Isoniazid ยา Pyrazinamide และยา Ethambutol (35) โดยที่ ยา Rifampicin (หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่ายา Rifampin) เป็นยาต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ร่วมกับยา Isoniazid สามารถออกฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ในวงกว้างเช่นเดียวกับยา Isoniazid ยา pyrazinamide และยา ethambutol และใช้ในการรักษาวัณโรคทั้งในและนอกปอด (2) Rifampicin มีอนุพันธ์หลากหลายชนิด ได้แก่ Rifalazil (KRM-1648) Rifabutin (RBT) Rifapentine (RPT) และ CGP-7040 ปัจจุบันอนุพันธ์ของยา Rifampicin ข้างต้นที่กล่าวมาได้ถูกนำมาใช้ทดสอบเพื่อรักษาการติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin ด้วยเช่นกัน (35) ยา Rifampicin สามารถดูดซึมเข้าสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกายผ่านทางารรับประทาน โดยผ่านระบบการหมุนเวียนในลำไส้และตับ (enterohepatic) และกระบวนการกำจัดหรือลดหมู่อะซีทิล (deacetylation) แล้วจึงขับถ่ายออกผ่านทางอุจจาระเป็นส่วนใหญ่ และมีบางส่วนสามารถขับออกมาทางปัสสาวะ การรับประทานยา Rifampicin นั้นควรรับประทานตามขนาดที่เหมาะสม โดยอยู่ที่ประมาณน้อยกว่า 10 mg ต่อน้ำหนักของร่างกายซึ่งปริมาณที่สามารถรับประทานได้มากที่สุดในหนึ่งวันคือ 600 mg โดยยาชนิดนี้มีข้อดีต่อร่างกายคือ ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อดับและไต (2) โครงสร้างทางเคมีของยา Rifampicin ประกอบไปด้วย 3-[(4-methyl-1-piperazinyl)imino]-methyl ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน มีลักษณะพิเศษเป็นสาร Aliphatic เชื่อมวงแหวน Aromatic เข้าด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 1 (36)



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของยา Rifampicin (36)

ยา Rifampicin มีส่วนช่วยในการต้านเชื้อ *M. tuberculosis* ได้อย่างมากเนื่องจากตัวยาสามารถแพร่เข้าสู่เปลือกหุ้มของเชื้อ (envelope) ได้อย่างรวดเร็วและมีฤทธิ์ในการฆ่าทำลายเชื้อจุลชีพสูง (Bactericidal) ยา Rifampicin ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 - 0.2 μg สามารถยับยั้งเชื้อ *M. tuberculosis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นผลเนื่องมาจากการที่ยามีคุณสมบัติกำจัดให้เชื้อบริเวณรอยโรคหมดไปเร็วยิ่งขึ้น (High sterilizing activity) (35) ยา Rifampicin มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการจับกับ β -subunit ของเอนไซม์ RNA Polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการถอดรหัสของสารพันธุกรรม (DNA transcription) และควบคุมการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตทั้งหมด (35) โดยไม่มีผลกระทบต่อเอนไซม์อื่นๆ ในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (2) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ DNA transcription และป้องกันการเชื่อมต่อของลำดับเบสไม่ให้เกินกว่า 2 - 3 ตัว ในกระบวนการเพิ่มความยาวของสาย RNA (Elongation) (35) ทำให้ร่างกายของเชื้อจุลชีพไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนและตายไปในที่สุด

7. การดื้อยา Rifampicin

การดื้อยา Rifampicin มีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ 1. การกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ RNA polymerase ที่เป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา และจัดเป็นกลไกหลักที่พบได้บ่อยที่สุดที่ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ดื้อต่อยา Rifampicin (37) เนื่องจากยาไม่สามารถจับกับบริเวณเป้าหมายจึงทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อ *M. tuberculosis* (38) และมักพบว่าสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ในระดับสูง (37) 2. การจำลองตำแหน่งเป้าหมายของยา ทำให้

แม้ว่ายาจะสามารถจับกับบริเวณที่จำเพาะของยีนเป้าหมายได้ แต่ยีนที่ถูกจำลองตัวยังสามารถทำงานได้แทนยีนที่ถูกจับ เชื้อจึงยังมีชีวิตอยู่ (39) 3. การถูก RNA-binding protein (*rbpA*) เหนี่ยวนำให้เกิดการดีดยา โดย *dnaA* ซึ่งเป็นหนึ่งในชนิดของ *rbpA* จะจับกับเอนไซม์ RNA polymerase และ *dnaA* ซึ่งอยู่ในรูปแบบทั้ง ATP และ ADP ต่างมีคุณสมบัติในการทำให้ฤทธิ์ของยา Rifampicin ที่มีต่อการยับยั้งเอนไซม์ RNA polymerase ลดลง (37) 4. ยา Rifampicin มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้างของตัวยา ทำให้ความสามารถในการจับบริเวณเป้าหมายของยาลดลงหรือไม่มีอีกต่อไป (40) 5. การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของยา Rifampicin ซึ่งเป็นผลมาจากกลไกการลดความสามารถในการผ่านเข้าออกของสารผ่านผนังเมมเบรนของเชื้อแบคทีเรีย และความสามารถในการขับยาปฏิชีวนะด้วยความเร็วพิเศษออกจากผนังเมมเบรน (Efflux pumps) (37)

การกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อยา Rifampicin เกิดขึ้นใกล้กับศูนย์กลางของยีน *rpoB* ซึ่งมีหน้าที่สร้าง β -subunit ของ RNA Polymerase (35) การกลายพันธุ์มักเกิดขึ้นในรูปแบบของการกลายพันธุ์เพียงขั้นตอนเดียว (single step mutation) โดยส่วนใหญ่เกิดจากการแทนที่คู่เบสของกรดอะมิโนเพียง 1 ตัว และมีบางส่วนที่เกิดจากการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์หรือการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ เมื่อมีการกลายพันธุ์ดังกล่าวเกิดขึ้น จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ β -subunit ในเอนไซม์ RNA polymerase ซึ่งเป็นบริเวณเป้าหมายของยา Rifampicin และเมื่อยาไม่สามารถจับกับบริเวณเป้าหมายที่จำเพาะได้จึงทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเชื้อจุลชีพ (38)

มากกว่า 95% ของการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* เกิดขึ้นบริเวณตำแหน่ง Rifampicin resistance determining regions (RRDRs) ซึ่งครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ประมาณ 81 bp ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่ 507 - 533 และประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 27 ชนิด (6, 35) โดยตำแหน่งโคดอนที่มักพบการกลายพันธุ์มากที่สุด คือ โคดอน 531 (พบประมาณ 58%) รองลงมาคือโคดอน 526 (พบประมาณ 25.2%) และโคดอน 516 (พบประมาณ 9.1%) (7) ซึ่งทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อยา Rifampicin ในระดับสูง โดยมีค่าความเข้มข้นยาต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC) มากกว่า 32 - 256 mg/l (41, 42) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่น อาทิเช่น โคดอน 514 521 และ 533 มักพบในอัตราที่ต่ำมากและสัมพันธ์กับการตื้อยา Rifampicin ในระดับต่ำ (35) (Low-level resistance : MIC of < 16 mg/l) (41) ในขณะที่

การกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* บริเวณนอกตำแหน่ง RRDRs พบได้ว่าเกิดขึ้นในอัตราประมาณน้อยกว่า 5% ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin (43)

จากการศึกษาของ Zaw และคณะ รายงานความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin ในประเทศบราซิล พบว่า ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด 2 ตำแหน่ง ได้แก่ โคดอน Ser531Leu พบประมาณ 58.5% และโคดอน Ser531Trp พบประมาณ 20.8% ในขณะที่เมือง Zhejiang ประเทศจีน พบว่าตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด ได้แก่ โคดอน 526 พบมากถึง 75% ในขณะที่โคดอน 531 พบเพียงแค่ 5% เท่านั้น (43) จากการศึกษาของ Qazi และคณะ รายงานความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin ในประเทศปากีสถาน พบว่า ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด ได้แก่ โคดอน 531 พบประมาณ 52% และรองลงมาคือ โคดอน 516 ซึ่งพบประมาณ 21% (44) จากการศึกษาของ Madania และคณะ รายงานความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin ในประเทศซีเรีย พบว่าตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด ได้แก่ โคดอน 531 โคดอน 526 และโคดอน 516 โดยพบความถี่ประมาณ 61% 13% และ 8.7% ตามลำดับ (45) ในขณะที่ในประเทศไทย การศึกษาของ Prammananan และคณะ รายงานความชุกของการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin โดยพบว่า ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์บ่อยที่สุด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ โคดอน 531 พบประมาณ 58% รองลงมาคือ โคดอน 526 พบประมาณ 25.2% และสุดท้าย โคดอน 516 พบประมาณ 9.1% (7)

8. บทบาทของการดื้อยา Rifampicin ที่มีต่อการบ่งชี้วัณโรคดื้อยาหลายขนาน

การติดเชื้อมีวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดพร้อมกัน 2 ชนิด ได้แก่ ยา Rifampicin และยา Isoniazid อย่างไรก็ตามการดื้อต่อยา Rifampicin มากกว่า 90% มักส่งผลให้มีการดื้อต่อยา Isoniazid ร่วมด้วยในภายหลัง การตรวจวินิจฉัยหาการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* จึงสามารถใช้เป็นตัวแทน (Surrogate marker) ในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ (3)

9. สถานการณ์วัณโรคและการติดเชื้อดื้อยาวัณโรคชนิด Rifampicin

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ.2563 พบว่าในปี พ.ศ.2562 ประชากรจากทั่วโลก ประมาณ 465,000 คนติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin (Rifampicin resistant tuberculosis : RR-TB) ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาวัณโรคกลุ่มแรกที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และมีผู้ป่วยติดเชื้อดื้อยาชนิดที่เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน โดยคิดเป็น 78% ของจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin สำหรับประเทศไทยซึ่งถูกจัดให้เป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีอัตราผู้ติดเชื้อวัณโรคสูงสุดทั่วโลกโดยองค์การอนามัยโลกและยังถูกจัดเป็น 1 ใน 30 ประเทศที่มีอัตราผู้ป่วยวัณโรคร่วมกับการติดเชื้อ HIV และอัตราผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานสูงที่สุด จากรายงานขององค์การอนามัยโลกซึ่งได้ประมาณการอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมดในประเทศไทยในปี พ.ศ.2562 เท่ากับ 105,000 คน และเป็นผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิด MDR/RR-TB ประมาณ 2,500 คน คิดเป็นอัตราส่วนเท่ากับ 3.6 ต่อประชากร 100,000 คน โดยเป็นผู้ป่วยรายใหม่ 1.7% และเป็นผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาแล้ว 10% (1)

10. การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการพิจารณาให้การรักษาผู้ป่วยวัณโรคอย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากหากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติดื้อยา จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนกลุ่มของยาที่ใช้ในการรักษาทันทีเพื่อลดอัตราการรักษาที่ล้มเหลวที่อาจเกิดขึ้นตามมา ประกอบกับจำนวนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาที่มีอัตราสูงอย่างต่อเนื่องจากอดีตถึงปัจจุบัน นำไปสู่การแพร่กระจายเชื้อที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข (10) การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคสามารถทำได้ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์และจีโนไทป์ ซึ่งทั้งสองเทคนิคมีรายละเอียดดังอธิบายด้านล่าง

10.1 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์อาศัยหลักการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่ หากเชื้อไวต่อยาจะถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญได้ในทางตรงกันข้ามหากเชื้อดื้อต่อยาจะสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยาได้ ตัวอย่างของเทคนิคทางพีโนไทป์ที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค อาทิเช่น เทคนิค Agar proportion method ซึ่งถูกกำหนดให้เป็นวิธีมาตรฐานทางพีโนไทป์โดย Clinical Laboratory Standards

Institute (CLSI) อาศัยการคำนวณจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่เปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยาต้านวัณโรค หากพบเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 1% เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาต้านวัณโรคเป็นส่วนผสมเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยาต้านวัณโรค ให้แปลผลว่าเชื้อดังกล่าวติดต่อยาต้านวัณโรค (9) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลาในการทดสอบที่นาน 3 - 4 สัปดาห์ จึงอาจมีความล่าช้าในการปรับการรักษาให้มีความเหมาะสมและผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยาอาจยังคงแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่นได้ (10)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460 (บริษัท Becton Dickinson จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ซึ่งใช้ตรวจวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ *M. tuberculosis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว BACTEC 12B (46) ที่มีส่วนประกอบดังนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Modified middlebrook 7H9 4 ml Casein hydrolysate Bovine serum albumin Catalase [14C] - Palmitic acid ซึ่งเป็นสารกัมมันตรังสี และส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ PANTA ซึ่งได้แก่ ยา Polymyxin B ยา Amphotericin B ยา Nalidixic acid ยา Trimethoprim และยา Azlocillin (47) โดยใช้หลักการตรวจวัดปริมาณของ $^{14}\text{CO}_2$ ที่ถูกปล่อยมาจากกระบวนการสันดาป (Metabolism) ของ ^{14}C - Palmitic acid ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mycobacterium* (46) ติดตามการเจริญของเชื้อทุกๆ 2 วันในสัปดาห์แรก หากมีการเจริญของเชื้อ ค่าดัชนีชี้วัดการเจริญของเชื้อ (GI) จะมีค่ามากกว่า 10 ขึ้นไป และให้แปลผลการทดสอบว่าเป็นผลบวก (47) ข้อดีของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้คือช่วยลดระยะเวลาในการวินิจฉัยวัณโรค โดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 10 - 14 วัน (46) อย่างไรก็ตามการใช้สารกัมมันตรังสีในกระบวนการตรวจวิเคราะห์ทำให้ไม่มีความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน วิธีนี้จึงไม่ได้รับความนิยมเท่าใดนัก (47)

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC Mycobacterial Growth Indicator Tube 960 (BACTEC MGIT 960 : บริษัท Becton Dickinson จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Middlebrook 7H9 ซึ่งมียาต้านวัณโรคผสมอยู่ ที่กั้นหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีเซนเซอร์ต่อ O_2 - quenching fluorescent ซึ่งเคลือบอยู่กับซิลิกอนสำหรับตรวจหาการเจริญของเชื้อ โดยวิเคราะห์จากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เปล่งแสงออกมาภายหลังเชื้อเจริญเติบโตและมีการใช้ออกซิเจน ทำให้อุณหภูมิของฟลูออเรสเซนส์เป็นอิสระ และตรวจวัดได้ที่ขนาดความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร (48) ปริมาณของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เปล่งออกมาจะแปรผกผันกับ

ระดับออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (48, 49) ในการแปลผลต้องเปรียบเทียบค่า Growth unit (GU) กับหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MGIT ที่ไม่มียาต้านวัณโรคซึ่งถือเป็นหลอดควบคุมและมีค่า GU มากกว่า 400 หากค่า GU ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MGIT ที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่ มีค่าเท่ากับ 100 ขึ้นไป ให้แปลผลว่าเชื่อนั้นมีการดื้อต่อยาต้านเชื้อวัณโรค ในขณะที่หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MGIT ที่มียาต้านวัณโรคผสมอยู่ มีค่า GU น้อยกว่า 100 ต้องนำไปบ่มเพิ่มอีกเป็นระยะเวลา 7 วัน และหากยังคงมีค่าน้อยกว่า 100 ให้แปลผลว่าเชื้อดังกล่าวไวต่อยาต้านวัณโรค (50) เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 สามารถใช้ทดสอบหาความไวต่อยาได้อย่างครอบคลุมทั้งยาต้านวัณโรคกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยมีระยะเวลาการทดสอบประมาณ 5 - 14 วัน (51) และเป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติอย่างเต็มรูปแบบซึ่งทำงานร่วมกับระบบคอมพิวเตอร์ในการแปลผล อย่างไรก็ตามด้วยราคาที่สูงและการใช้ระบบวิเคราะห์อัตโนมัติที่ซับซ้อนจึงเป็นผลให้วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ได้รับความนิยมในการใช้เป็นวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการของประเทศที่กำลังพัฒนาเท่าใดนัก (48, 52)

10.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางจีโนมไทป์

ด้วยข้อจำกัดทางด้านระยะเวลาการทดสอบที่ล่าช้า และความไวที่ต่ำของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์ ทำให้ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางจีโนมไทป์เข้ามาใช้ทดสอบแทนที่มากขึ้น โดยมีเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing) (53) เป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมไทป์ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยาที่แสดงออก (54, 55) อย่างไรก็ตามเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสมีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น มีความยุ่งยากในการปฏิบัติจึงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในงานประจำ ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน และราคาแพง (55)

องค์การอนามัยโลกได้รับรองเทคนิค Xpert MTB/RIF ซึ่งเป็นเทคนิคทางจีโนมไทป์สำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีการระบาดสูง และขาดแคลนทรัพยากรในการตรวจเพาะเลี้ยงเชื้อ เทคนิค Xpert MTB/RIF สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* complex พร้อมกับตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ได้ในเวลาเดียวกันภายใน 2 ชั่วโมง โดยอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Gene Xpert ซึ่งสามารถสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจที่ถูกบรรจุอยู่ในตัลลับน้ำยา และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ พร้อมกับตรวจหาผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวัดแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา ในการทดสอบการ

ดื้อยา Rifampicin อาศัยหลักการตรวจหาชิ้นส่วนของยีน *rpoB* โดยใช้ Molecular beacon probes จำนวน 5 Probe แต่ละ Probe ถูกติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสง (Fluorophore) ที่แตกต่างกัน 5 อัน Probe ทั้ง 5 นี้จะครอบคลุมบริเวณ RRDRs ของยีน *rpoB* ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่ 507-533 ในเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยา Rifampicin ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ ณ บริเวณ RRDRs ทำให้ Probe สามารถจับกับลำดับเบสของ DNA ต้นแบบได้ ส่งผลให้สารเรืองแสงที่ติดฉลากไว้ปล่อยแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมา ในทางกลับกันหากเชื้อดื้อยาและมีการกลายพันธุ์บริเวณ RRDRs จะส่งผลให้ Probe ไม่สามารถจับกับตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ได้ ทำให้ไม่พบการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนส์ (11) ถึงแม้ว่าเทคนิค Xpert MTB/RIF จะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของเทคนิคนี้คือไม่สามารถตรวจหาการดื้อยาชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากยา Rifampicin ได้ ประกอบกับมีราคาสูง และต้องอาศัยเครื่อง Gene Xpert ที่ต้องการการซ่อมบำรุงอย่างต่อเนื่อง ทำให้เป็นข้อจำกัดสำหรับสถานพยาบาลขนาดเล็ก

เทคนิค Line probe assay (LPA) เป็นอีกหนึ่งเทคนิคทางจีโนมไทป์ที่ได้การรับรองจากองค์การอนามัยโลกเช่นเดียวกับเทคนิค Xpert MTB/RIF สำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคชนิดดื้อยาหลายขนานได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 2 วัน จากผล smear เสมหะที่เป็นบวก (13) โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา เช่น ยีน *rpoB* ด้วย Primer ที่จำเพาะ ภายใต้ปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ผลผลิตที่เกิดขึ้นถูกตรวจสอบผ่านการจับกันกับ Probe ที่จำเพาะที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่น nitrocellulose ซึ่งหากเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยา Rifampicin และไม่มีการกลายพันธุ์ ณ บริเวณ RRDRs สารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้นมาจะสามารถจับ Wild types (WT) probes ได้ และสังเกตเห็นเป็นแถบบนแผ่น nitrocellulose หากเชื้อดื้อยาและมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น สารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มขึ้นมาจะไม่สามารถจับกับ Probe ที่จำเพาะกับตำแหน่งโคดอนที่กลายพันธุ์ได้ ทำให้ไม่พบแถบที่จำเพาะบนแผ่น nitrocellulose (12) อย่างไรก็ตามเทคนิค LPA มีข้อจำกัดคือ ราคาแพง และต้องอาศัยความเชี่ยวชาญในการอ่านและแปลผลสูง (13)

11. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Isothermal Amplification

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นเทคนิคทางจีโนมไทป์ที่มีความไวในการวินิจฉัยสารชีวภาพต่างๆ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวต้องอาศัยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่อาจเป็นข้อจำกัด

ด้านต้นทุนของการตรวจวินิจฉัยรวมไปถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในงานภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิค Isothermal amplification ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ตลอดปฏิกิริยา (56) ได้แก่

เทคนิค Nucleic acid sequence-based amplification หรือ NASBA เป็นเทคนิคที่จำเพาะต่อการตรวจหาสารพันธุกรรมประเภท RNA ซึ่งปฏิกิริยาดำเนินภายใต้อุณหภูมิคงที่ 41 องศาเซลเซียส และต้องมีขั้นตอนการใช้อุณหภูมิสูงในการแยกสายสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์เข้าร่วมในการทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ avian myeloblastosis virus reverse transcriptase เอนไซม์ RNaseH และเอนไซม์ T7 DNA dependent RNA Polymerase โดยสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ตั้งแต่ 90 นาทีไปจนถึง 3 ชั่วโมง (57)

เทคนิค Transcription-mediated amplification หรือ TMA มีหลักการคล้ายเทคนิค NASBA คือเป็นเทคนิคที่จำเพาะต่อการตรวจหาสารพันธุกรรมประเภท RNA เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามเทคนิค TMA มีข้อแตกต่างจากเทคนิค NASBA เล็กน้อยตรงที่ไม่ใช้เอนไซม์ RNaseH ในการทำปฏิกิริยา แต่ใช้เอนไซม์เพียง 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ avian myeloblastosis virus reverse transcriptase และเอนไซม์ T7 DNA dependent RNA Polymerase (57)

เทคนิค Helicase-dependent amplification หรือ HDA เป็นเทคนิคที่ใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ DNA helicase ช่วยในการคลายเกลียวของ DNA ต้นแบบ และมีโปรตีน single strand DNA binding protein (SSB) เข้าจับกับ DNA เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้ DNA กลับไปจับกันอีกครั้งเป็น Double strand จากนั้น Primer จะเข้าจับกับ DNA ต้นแบบ และเกิดการต่อสายลำดับเบสใหม่ด้วยเอนไซม์ Polymerase mediated elongation ใช้ระยะเวลาทำปฏิกิริยาประมาณ 60 - 120 นาที ณ อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส โดยที่ไม่ต้องใช้ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอในขั้นแรกของกระบวนการ (57)

เทคนิค Strand displacement amplification หรือ SDA อาศัยเอนไซม์ Bst DNA polymerase ในการเริ่มต้นการจำลองตนเองของ DNA ต้นแบบ โดยใช้ Primer ที่แตกต่างกันจำนวน 4 คู่ ซึ่งมีตำแหน่งที่ใช้ตัดจำเพาะ (restriction sites) สำหรับเอนไซม์ Hinc III exonucleas ปฏิกิริยา SDA ดำเนินการภายใต้อุณหภูมิประมาณ 37 - 70 องศาเซลเซียส โดยใน 1 ปฏิกิริยา

สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ DNA เป้าหมายได้ถึง 10^9 copies ภายในเวลาไม่ถึง 1 ชั่วโมง (57)

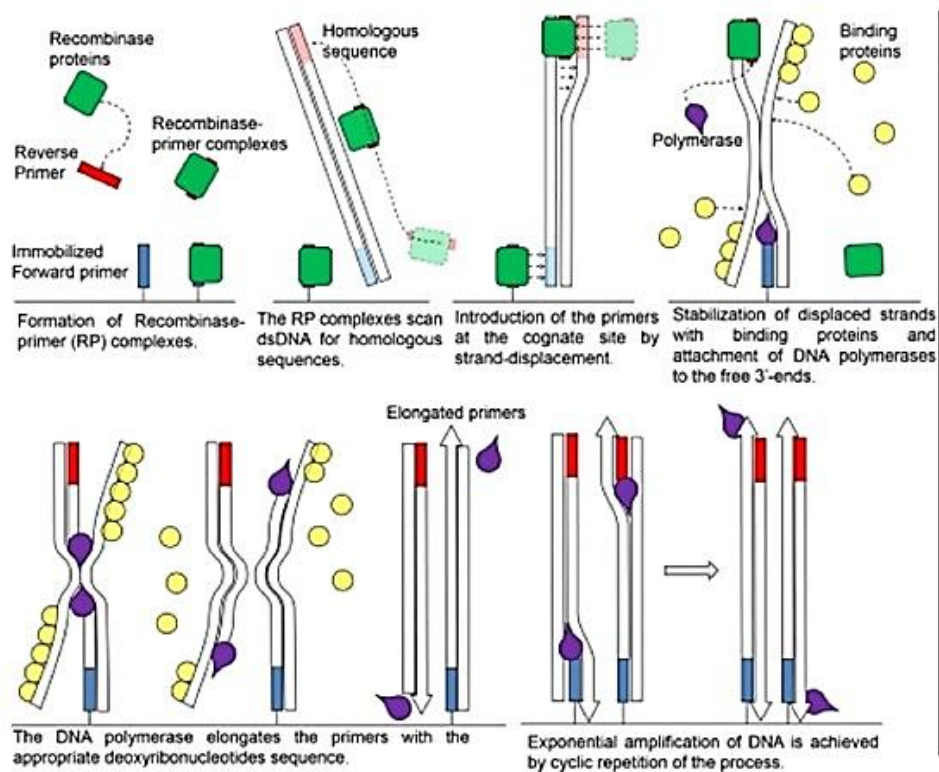
เทคนิค Rolling circle amplification หรือ RCA ใช้เอนไซม์ Phi29 Bacteriophage DNA polymerase ซึ่งมีความสามารถในการแยกสาย DNA รูปวงแหวน (circular DNA) ได้ แต่ต้องมีขั้นตอนการแยกสาย DNA ก่อนการเริ่มปฏิกิริยาด้วยอุณหภูมิสูง (melting DNA) จากนั้น Primer จะเข้าจับกับ circular ssDNA และเริ่มต้นสร้าง DNA สายใหม่ขึ้นมาใหม่ ภายใต้อุณหภูมิคงที่ ประมาณ 30 - 36 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 30 - 90 นาที (57)

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification หรือ LAMP อาศัยการทำงานแบบแทนที่ของเอนไซม์ Bst DNA polymerase บนสาย DNA และจาก Primer 4 - 6 เส้นที่จำเพาะกับลำดับเบส 6 ตำแหน่งบน DNA ต้นแบบ (57) ซึ่งจะช่วยให้ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง (20) เทคนิคดังกล่าวใช้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพียง 1 ขั้นตอน ภายใต้อุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส ในเวลาอันสั้นเพียง 45 - 60 นาที (57)

12. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification (RPA)

เทคนิค Isothermal amplification อื่นๆ ส่วนใหญ่ก็มีขั้นตอนการใช้อุณหภูมิสูงเพื่อแยกสาย DNA ให้กลายเป็นสายเดี่ยวก่อนการเริ่มปฏิกิริยา ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องใช้อุณหภูมิเพิ่มเติม และมีความยุ่งยากในการปฏิบัติเพื่อใช้ในการควบคุมอุณหภูมิ ต่างจากเทคนิค Recombinase Polymerase Amplification หรือ RPA ที่สามารถดำเนินการเข้าสู่ปฏิกิริยาได้ทันทีโดยปราศจากขั้นตอนการใช้อุณหภูมิสูงในการแยกสาย DNA (57) การดำเนินปฏิกิริยาของเทคนิค RPA เกิดขึ้นได้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ Recombinase และเอนไซม์ Strand displacement DNA polymerase ร่วมกับโปรตีน 1 ชนิด ได้แก่ Single-stranded DNA-binding protein หรือ SSB (58) โดยในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ Recombinase และ loading factor จะรวมตัวกันเป็น nucleoprotein filament ไปจับกับ Primer จากนั้นจะเคลื่อนตัวไปตามสายของ DNA สายคู่ (dsDNA) เพื่อหาลำดับเบสที่เป็น Homologous แล้วจึงทำการแยกสายของ DNA ทำให้เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า D-loop จากนั้นโปรตีน SSB เข้าจับบนสาย DNA เพื่อป้องกันไม่ให้สาย DNA กลับมาจับกันอีกครั้ง สุดท้ายเอนไซม์ Recombinase จะหลุดออกจากสาย DNA เมื่อ

เอนไซม์ Strand displacement DNA polymerase เข้ามาในปฏิกิริยาเพื่อช่วยสังเคราะห์ DNA สายใหม่ จากนั้น DNA 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะกลายเป็น DNA ต้นแบบสำหรับการเริ่มปฏิกิริยาครั้งใหม่ โดยปฏิกิริยา RPA จะดำเนินซ้ำไปเรื่อยๆ จนกว่า Phosphocreatine จะหมดลง (57)



รูปที่ 2 กระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) (56)

เทคนิค RPA ดำเนินการภายใต้อุณหภูมิคงที่ตลอดปฏิกิริยาที่ประมาณ 37 - 42 องศาเซลเซียส โดยมีปัจจัยสำคัญบางประการที่ต้องพิจารณา เพื่อให้เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ประการแรก ขนาดของ Primer ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RPA ควรมีความยาวประมาณ 30 - 35 bp (57) อย่างไรก็ตามการใช้ Primer ที่มีขนาดเท่ากับที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR หรือประมาณ 18 - 26 bp สามารถนำมาใช้ในปฏิกิริยา RPA ได้ แต่สถานะของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะดำเนินการได้ช้าลงเมื่อเทียบกับการใช้ Primer ที่มีความยาวเท่ากับ 30 bp หรือมากกว่า (59) และไม่ควรรใช้ Primer ที่มีความยาวมากกว่า 45 bp เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิด primer-dimer ได้สูง (57)

ประการที่สอง ควรเลือกใช้ GC content ของ Primer ที่อยู่ระหว่าง 30 - 70% เนื่องจาก GC content ที่ต่ำกว่า 30% จะส่งผลให้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป็นไปได้ยากกว่า (60) และ GC content ที่สูงกว่า 70% จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Recombinase protein ซึ่งเป็นส่วนประกอบของปฏิกิริยา RPA (61)

ประการที่สาม เทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีลำดับเบสที่ยาวโดยความยาวผลผลิตมากที่สุดที่เทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้มีความยาวมากถึง 1.5 kb (62) อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ให้ผลผลิตที่มีขนาดประมาณ 100 - 200 bp ให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าเนื่องจากสามารถช่วยลดสัญญาณรบกวน (noise) ของปฏิกิริยาและส่งผลให้ปฏิกิริยามีค่าความไวที่สูงกว่า (57)

ประการที่สี่ ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหลายตำแหน่งเป้าหมายภายในเวลาเดียวกันด้วยเทคนิค RPA (multiplex RPA) ควรใช้ Primer ที่จำเพาะสำหรับแต่ละตำแหน่งเป้าหมายและมีความยาวประมาณ 30 - 35 bp การศึกษาก่อนหน้าได้ออกแบบ Primer สำหรับปฏิกิริยา multiplex RPA ให้มีความยาวประมาณ 18 - 26 bp ซึ่งช่วยลดโอกาสในการเกิด primer-dimer ได้ (57)

ประการที่ห้า ปฏิกิริยา RPA สามารถเกิดขึ้นได้ในอุณหภูมิห้องจนถึง 45 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับดำเนินปฏิกิริยาเท่ากับ 37 - 42 องศาเซลเซียส (57) การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่สำหรับดำเนินปฏิกิริยาสามารถทำได้ง่ายโดยใช้เครื่องบ่มเชื้อ (incubator) เครื่องทำความร้อน (Heater) หรือแม้กระทั่งการใช้ความร้อนจากร่างกาย (57)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RPA มีจุดเด่นที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องมือทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วยได้ เนื่องจากมีราคาถูก มีความไวและความจำเพาะสูง ขั้นตอนการออกแบบ Primer และการทดสอบง่ายไม่ซับซ้อน ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไม่สูงมากซึ่งสามารถควบคุมได้ง่าย ประหยัดเวลา และไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเพาะ (57) การศึกษาที่ผ่านมามีการนำเทคนิค RPA ไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ หลายชนิด อาทิ เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อปรสิต เชื้อรา เชื้อไวรัส เซลล์มะเร็ง และสิ่งมีชีวิตที่มีการตัดแต่งพันธุกรรมหรือ Genetically Modified Organisms (GMOs) และพบว่าเทคนิค RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เป็นทั้ง DNA และ Ribonucleic acid (RNA) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (57) จากการศึกษา ก่อนหน้าของ Nuntita และคณะ ได้นำเทคนิค RPA ตรวจวิเคราะห์หายีน IS1081 และยีน IS6110

ซึ่งเป็นยืนยันเป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่าสามารถวินิจฉัยเชื้อได้โดยมีความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 100% (14) การศึกษาของ Ma และคณะ ทำการตรวจหาเชื้อ MTBC โดยใช้เทคนิค RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ lateral flow ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และพบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ MTBC ได้ โดยมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 97.92% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบเชื้อได้ (Limit of detection : LOD) เท่ากับ 25 fg และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น (63) การศึกษาของ Hou และคณะ ทำการพัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Lateral flow dipstick (LFD) เพื่อการวินิจฉัยเชื้อไวรัส Bovine ephemeral fever (BEFV) โดยใช้ RPA primers และ Lateral flow probes ที่ออกแบบอย่างจำเพาะด้วยยีน G พบว่าวิธี RPA-LFD ในการศึกษาครั้งนี้ให้ค่าความไวเท่ากับ 97.89% และความจำเพาะเท่ากับ 90.91% ซึ่งเป็นค่าที่สูงเมื่อเทียบกับเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) แบบดั้งเดิม และสามารถสังเกตผลที่ได้บน LFD ด้วยตาเปล่าภายในระยะเวลาอันสั้น (64) การศึกษาของ Zhao และคณะ พัฒนาเทคนิค RPA ร่วมกับการใช้แผ่นทดสอบ Lateral flow dipstick ในการตรวจสอบผลผลิต เพื่อการตรวจหา DNA ของเชื้อ *M. avium subsp. paratuberculosis* พบว่าเมื่อเทียบกับเทคนิค Quantitative-PCR วิธีนี้ให้ค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 97.63% ตามลำดับ โดยข้อดีของเทคนิคนี้คือไม่ต้องใช้ software ในการออกแบบ Primer ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา RPA ทำให้ไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และสามารถนำไปใช้ในประเทศกำลังพัฒนาได้ (65)

13. การตรวจสอบผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นเทคนิค PCR หรือเทคนิค Isothermal amplification จำเป็นต้องมีการตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้น เพื่อวินิจฉัยตามจุดประสงค์ของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ปัจจุบันมีเทคนิคสำหรับตรวจสอบผลผลิตดังกล่าวมากมายหลายชนิด ดังรายละเอียดที่ยกตัวอย่างด้านล่าง

13.1 การตรวจสอบผลผลิตด้วย Agarose gel electrophoresis

เทคนิคการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้วุ้นเป็นตัวกลางค้ำจุนเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการแยกสารชีวภาพประเภทโปรตีน RNA หรือ DNA โดยปกติในการแยกสารพันธุกรรมชนิด RNA และ

DNA มักใช้วุ้น Agarose เป็นตัวกลางค้ำ หรือเรียกว่าเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งโมเลกุลของสารพันธุกรรมจะถูกแยกตามขนาดภายใต้สนามกระแสไฟฟ้า โมเลกุลสารพันธุกรรมมีคุณสมบัติเป็นประจุลบจะเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วประจุบวก โดยสารพันธุกรรมที่มีโมเลกุลเล็กหรือน้ำหนักน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสารพันธุกรรมที่มีโมเลกุลใหญ่หรือน้ำหนักมากกว่า (66) ซึ่งสารพันธุกรรมที่ถูกแยกจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบ ณ ตำแหน่งต่างๆ บนวุ้นตัวกลางค้ำจูน ซึ่งตรวจสอบได้ผ่านเครื่องบันทึกภาพ โดยอาศัยการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดจากสีที่ย้อมโมเลกุลของสารพันธุกรรม

เทคนิค Agarose gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสีย้อม และเหมาะในการใช้แยกสารพันธุกรรมขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวมีข้อเสียบางประการเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ อาทิเช่น หากสารพันธุกรรมมีโมเลกุลต่ำหรือขนาดเล็กอาจถูกแยกได้ไม่ดี เนื่องจากวิธีนี้มีค่าความสามารถในการแยกรายละเอียด (resolving power) ที่ต่ำ อาจเกิดการฟุ้งของผลผลิต ทำให้การอ่านผลจากแถบสารพันธุกรรมไม่ชัดเจน (18) มีราคาแพงเนื่องจากต้องใช้อุปกรณ์จำเพาะหรืออุปกรณ์ในการจ่ายไฟฟ้า (power supply) ใช้เวลาในการตรวจสอบผลผลิตนานมากกว่า 45 นาทีขึ้นไป และจำเป็นต้องมีขั้นตอนการย้อมสารพันธุกรรมด้วยสีย้อม ทำให้มีขั้นตอนยุ่งยาก (67)

13.2 การตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I

สี SYBR green I เป็นสีย้อมชนิด asymmetric monomethine cyanine มักใช้ในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาทั่วไป (68) เพื่อตรวจสอบผลผลิตหลังการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรม (14) โดยอาศัยหลักการของสี SYBR green ที่เข้าจับตรงตำแหน่ง minor groove ของ DNA สายคู่ (69) ในระหว่างขั้นตอนสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (Elongation) (70) ทำให้ดูดกลืนแสงสีน้ำเงินได้ดีที่มีความยาวคลื่น 497 nm จากนั้นจึงปล่อยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สีเขียวออกมาที่มีความยาวคลื่นสูงสุด 520 nm (71) ดังนั้นหากมีปริมาณ DNA สายคู่ในปฏิกิริยามากเท่าใด ยิ่งส่งผลให้มีการเข้าจับของสี SYBR green I มากยิ่งขึ้น และช่วยเพิ่มสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนส์ด้วยเช่นกัน (69) แสงสีเขียวที่เกิดขึ้นสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่หากสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตจะเห็นการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ (20) ข้อดีของการใช้สี SYBR green I ในการตรวจสอบผลผลิตภายหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ได้แก่ ความปลอดภัยไม่เป็นพิษ สามารถปฏิบัติได้ง่ายขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ราคาไม่แพง (70) สังเกตผลการทดลองได้ด้วยตาเปล่า (20) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัดบางประการ อาทิเช่น ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบ

Multiplex amplification ได้ (19) อีกทั้งไม่สามารถจำแนกการเกิดผลบวกปลอม (false positive) ที่เกิดจาก Primer-dimer หรือผลผลิตที่เป็น non-specific ออกจากผลผลิตที่แท้จริงได้ เนื่องจากสี SYBR green สามารถเข้าจับ DNA สายคู่อย่างไม่จำเพาะ ซึ่งทำให้การแปลผลการทดสอบมีความจำเพาะต่ำ (21) การศึกษาของ Nuntita และคณะ ใช้เทคนิค RPA เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ยีน IS1081 และยีน IS6110 ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้สี SYBR green I เป็นเทคนิคในการตรวจสอบผลผลิต พบว่าสามารถอ่านผลการทดสอบได้ทันทีภายหลังการเติมสี จึงทำให้การทดสอบมีความรวดเร็ว อ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า และยังมีความไวสูง เหมาะสำหรับการใช้เป็นเครื่องมือ Point-of-care testing (POCT) ในพื้นที่ห่างไกลความเจริญ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบผลผลิตด้วยสี SYBR green I พบข้อจำกัดบางประการซึ่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์ อาทิเช่น การเกิดผลบวกปลอมเนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ 300 ng ถึง 2 μ g จึงจะสามารถมองเห็นผลการทดสอบด้วยตาเปล่าได้ (14)

13.3 การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิคของไหลจุลภาค (Microfluidic)

เทคนิค Microfluidic อาศัยหลักการไหลของสิ่งตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นของเหลวหรือก๊าซจากแรง Capillary บน Lab-on-a-chip (LOC) ซึ่งผสมผสานกระบวนการตรวจวิเคราะห์ที่หลากหลาย อาทิเช่น การสุ่มเลือกสิ่งตัวอย่าง (Sampling) การรักษาสภาพสิ่งตัวอย่าง (Sample treatment) การทำปฏิกิริยาของสิ่งตัวอย่าง (Reaction) การตรวจสอบสิ่งตัวอย่าง (Detection) และการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) เข้าด้วยกันบน LOC ขนาดเล็ก (22) ภายในประกอบด้วยโครงสร้างที่เหลื่อมกันไปมาคล้ายกังปลาและมีช่องทางไหลขนาดเล็กแตกต่างกันหลายท่อ โดยแต่ละท่อถูกประดิษฐ์ให้มีความจำเพาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารและสิ่งตัวอย่าง เทคนิค Microfluidic ใช้ปริมาณสิ่งตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเนื่องจากชุดอุปกรณ์ทั้งหมดมีขนาดเล็ก จึงทำให้การตรวจวิเคราะห์เป็นไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังมีความไวสูงจึงเหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อก่อโรค (72) อย่างไรก็ตามเทคนิค Microfluidic นั้นมีราคาแพง ใช้เวลานานในการขึ้นแบบพิมพ์บน Chip และมีการจำกัดขนาดของการออกแบบแท่นพิมพ์บน Chip ซึ่งอาจทำให้แท่นพิมพ์มีขนาดเล็กและไม่เพียงพอสำหรับการตรวจวิเคราะห์ (22) การศึกษาของ Rosenfeld และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ

M. tuberculosis ด้วยเทคนิค Microfluidics โดยอาศัยการทำงานของ Probe ที่ติดฉลากด้วยสี

ฟลูออเรสเซนส์เป็นตัวตรวจวัดสัญญาณ พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ในระยะเวลาอันสั้น โดยมีค่าความไวและความจำเพาะสูง และสามารถใช้ได้ในพื้นที่ที่มีอุปกรณ์จำกัด (73)

13.4 การตรวจสอบผลผลิตด้วยกล้องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ (Real time fluorescence detection system)

เทคนิค Real-time PCR หรือ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิค PCR ที่สามารถตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมได้ตลอดการดำเนินปฏิกิริยา (74) วิธีการตรวจแบบ Real-time ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์และแสดงความยาวคลื่นเมื่อจับกับผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วเท่านั้น โดย Detector ในระบบ Real-time PCR มีหลายชนิด อาทิเช่น สี SYBR green โดยจะเข้าแทรกในโมเลกุลของ DNA สายคู่และทำให้เกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ออกมา สี SYBR green มีความไวสูง แต่ไม่มีความจำเพาะต่อการทำปฏิกิริยา เนื่องจากสามารถเข้าจับกับโมเลกุลของ DNA สายคู่ทั้งที่เป็นผลผลิต PCR และ Primer-dimer ได้ (75) ในขณะที่ Molecular beacon probe มีโครงสร้างเป็นห่วง Hairpin loop (76) ใช้หลักการของตัวส่งสัญญาณแสง (Fluor) และตัวระงับสัญญาณแสง (Quencher) ซึ่งอยู่ตำแหน่งที่ใกล้กันบน Probe ทำให้ Fluor ส่งผ่านพลังงานจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตไปยัง Quencher และไม่เกิดการเรืองแสง อย่างไรก็ตามหากมีลำดับเบสเป้าหมายซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ลำดับเบสเป้าหมายนั้นจะจับแบบคู่สมกับเบสของ Molecular beacon probe ส่งผลให้ Fluor และ Quencher แยกออกจากกันและเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนส์ (75) ลักษณะเด่นของ Real-time PCR ที่แตกต่างจากเทคนิค PCR แบบดั้งเดิมคือ การวิเคราะห์ Melting curve ของโมเลกุลผลผลิตหลังเสร็จสิ้นกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยใช้หลักการที่ผลผลิตแต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่ทำให้เบสคู่สมของนิวคลีโอไทด์แยกออกจากกันครึ่งหนึ่งจากความยาวทั้งหมด ซึ่งมีประโยชน์สำหรับการแยกผลผลิตที่มีความใกล้เคียงกันมาก อาทิเช่น การแยกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อกลุ่ม (Nontuberculosis mycobacteria : NTM) (77) การศึกษาของ Rathore และคณะ ทำการตรวจหาการดื้อยาต้านวัณโรคหลายขนานของเชื้อ *M. tuberculosis* ในประชากรประเทศอินเดีย โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน IS6110 ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้สี SYBR green ช่วยในการตรวจจับผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และอาศัยการวิเคราะห์ผลของรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาจากหลักการวิเคราะห์ Melting curve พบว่าสามารถตรวจ

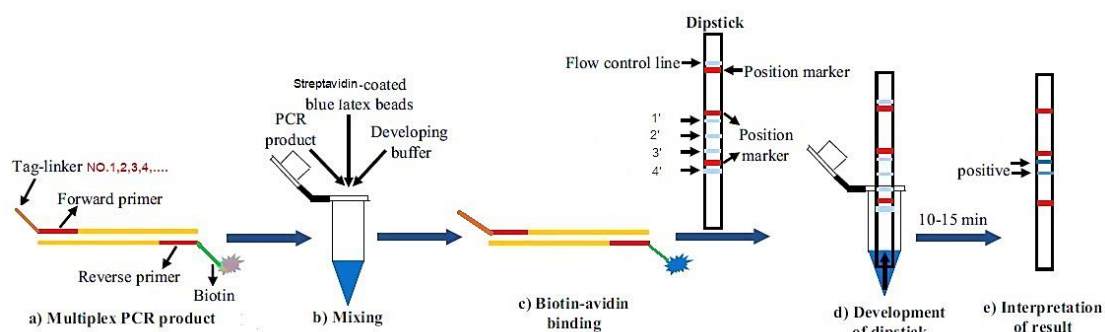
วินิจฉัยการดื้อยาต้านวัณโรคหลายขนานของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ด้วยความรวดเร็ว และมีความไวสูงถึง 100% (78)

13.5 การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Lateral flow

พื้นฐานของเทคนิค Lateral flow อาศัยหลักการของ Chromatography โดยให้สิ่งตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดที่เป็นของเหลวเคลื่อนที่โดยปราศจากแรงภายนอกผ่านบริเวณต่างๆ ของแผ่นทดสอบ (Strip) ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถจับกับสารที่ต้องการตรวจวัดเคลื่อนอยู่ (23) แผ่นทดสอบ Lateral flow ประกอบด้วยแผ่นเมมเบรน (Membrane) ที่มีส่วนที่ซ้อนทับกันติดไว้บนแผ่นรองรับ เพื่อให้มีความเสถียรและการควบคุมการไหลของสารจากแรง Capillary ที่ดียิ่งขึ้น ในการทดสอบปลายด้านหนึ่งของแผ่นทดสอบตรงตำแหน่งแผ่นรองรับ (Sample pad) จะสัมผัสกับสิ่งตัวอย่าง และดูดซับสิ่งตัวอย่างไว้โดยจะถูกทำให้ชุ่มด้วยบัฟเฟอร์และสารลดความตึงผิว ซึ่งช่วยให้สิ่งตัวอย่างพร้อมสำหรับการเคลื่อนที่ในระบบตรวจวัดได้อย่างสมบูรณ์ บริเวณแผ่นรองรับสิ่งตัวอย่างจะมีอนุภาคของตัวส่งสัญญาณ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอนุภาคทองคำหรืออนุภาค Microsphere Conjugate เพื่อให้สิ่งที่ต้องการตรวจวัดเข้ามาจับก่อนการเคลื่อนไปตามแผ่นทดสอบ เมื่อสิ่งตัวอย่างเคลื่อนผ่านแผ่นทดสอบ บริเวณที่ใช้อ่านผลหรือ Test line ที่มีการพันสารสำหรับจับกับสิ่งที่ต้องการตรวจวัดลงบนเมมเบรน และทำหน้าที่ตรึงโมเลกุลของสารเหล่านั้นไว้กับที่ ณ บริเวณ Test line และแสดงผลให้เห็นเป็นสีที่ปรากฏอยู่บริเวณแถบนั้น ในขณะที่บริเวณ Control line เป็นตัวบ่งชี้การไหลของสิ่งตัวอย่างผ่านแผ่นทดสอบว่ามีสิ่งผิดพลาดหรือไม่ ส่วนแผ่นดูดซับ (Absorbent pad) เป็นบริเวณที่ทำหน้าที่ดูดซับน้ำยาที่เหลือจากการทำปฏิกิริยาและป้องกันการไหลย้อนกลับของน้ำยาเหล่านั้น โดยการไหลของสิ่งตัวอย่างตลอดแผ่นทดสอบนั้นเกิดขึ้นได้จากแรง Capillary ในวัสดุของแผ่นทดสอบ (79)

เมื่อไม่นานมานี้ มีการพัฒนาแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยบริษัท Tohoku Bio-Array จำกัด ประเทศญี่ปุ่น (80) ซึ่งอาศัยหลักการ Lateral flow (24) โดยผลผลิตที่ถูกนำมาตรวจสอบ ต้องถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Forward primer ซึ่งบริเวณปลาย 5' ถูกออกแบบให้มีการติดฉลากนิวคลีโอไทด์ (Tag-linker sequence) และ Reverse primer ซึ่งบริเวณปลาย 5' ถูกติดฉลากด้วย Biotin ดังนั้นผลผลิตที่เกิดขึ้นจึงมีทั้งฉลากนิวคลีโอไทด์และ Biotin ติดอยู่ นำผลผลิตผสมกับ Modified dilution buffer ซึ่งประกอบด้วยเกลือ NaCl_2 ความเข้มข้นได้แก่ 0 และ 300 mM ในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดย Buffer ดังกล่าวทำหน้าที่ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ จากนั้นนำไปผสมกับ Latex solution ที่มีเม็ด Latex-streptavidin สีฟ้า ซึ่งจะจับกับ

โมเลกุลของ Biotin ที่อยู่บนผลผลิต เมื่อนำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในหลอดทดลองที่มีผลผลิตดังกล่าว ผลผลิตที่มีฉลากนิวคลีโอไทด์และ Latex-streptavidin-biotin จะเคลื่อนที่ไปบนแผ่นทดสอบและจับกับฉลากนิวคลีโอไทด์คู่สมที่ถูกตรึงอยู่บนแผ่นทดสอบ โดยฉลากนิวคลีโอไทด์บนแผ่นทดสอบนี้เป็นฉลากนิวคลีโอไทด์คู่สมของฉลากนิวคลีโอไทด์บน Forward primer ทำให้มองเห็นเป็นแถบสีฟ้าเนื่องมาจากเม็ด Latex-streptavidin บนแผ่นทดสอบ ภายในเวลา 10 - 15 นาที (รูปที่ 3) (80, 81)



รูปที่ 3 ตัวอย่างเทคนิค PCR-dipstick chromatography

(a) ผลผลิต PCR ซึ่งมีการติดฉลากนิวคลีโอไทด์และ Biotin (b) การผสม Buffer ในหลอดผลผลิต (c) ผลผลิตที่มีฉลากนิวคลีโอไทด์และ Biotin จับกับ Latex-streptavidin สีฟ้า (d) จุ่มแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ลงในสิ่งตัวอย่าง 10 - 15 นาที (e) อ่านผลการทดสอบโดยสังเกตจาก แถบสีฟ้าตามตำแหน่งที่จำเพาะบนแผ่นทดสอบ (80)

ข้อดีของการทดสอบด้วย dipstick chromatography มีหลายประการ ได้แก่ สามารถแปลผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่า ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง ใช้เวลาในการทำการทดสอบน้อยกว่าเทคนิค DNA hybridization หรือแผ่นทดสอบ Lateral flow อื่นๆ และสามารถพัฒนาเป็นเครื่องมือทดสอบ ณ จุดดูแลผู้ป่วย จากการศึกษาท่อนหน้าของ Shanmugakani และคณะ ได้ทำการออกแบบ Dipstick chromatography สำหรับตรวจหาเอ็นที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ได้แก่ ยีน *bla_{NDM}* ยีน *bla_{KPC}* ยีน *bla_{IMP}* และ ยีน *bla_{OXA-48}* และใช้ปฏิกิริยา multiplex PCR ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม พบว่าเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจหาเอ็นที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Carbapenem จากสิ่งตัวอย่างได้โดยตรงอย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแปลผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่าภายใน 15 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สั้นกว่า

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis และสามารถตรวจสอบยีนหลายชนิดได้ภายในเวลาเดียวกัน (80)



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน
 - น้ำยาสำหรับปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย Taq DNA polymerase และ Buffer ยี่ห้อ New England BioLabs จากบริษัท New England BioLabs จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา และ dNTPs ยี่ห้อ จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
 - ผง Agarose ยี่ห้อ Serva จากบริษัท Serva จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
 - สีย้อมดีเอ็นเอ ยี่ห้อ Ultrapower DNA/RNA safe dye จากบริษัท Gellax International Inc. ประเทศญี่ปุ่น
 - น้ำยาปฏิกิริยา RPA ยี่ห้อ TwistDx จากบริษัท TwistDxTM จำกัด ประเทศสหราชอาณาจักร
 - น้ำยาและแถบตรวจสารพันธุกรรม C-PAS-STH Dipstick chromatography ยี่ห้อ TBA จากบริษัท Tohoku Bio-Array จำกัด ประเทศญี่ปุ่น
 - น้ำยาทำ DNA ให้บริสุทธิ์ ยี่ห้อ Favorgen จากบริษัท Favorgen Biotech จำกัด สาธารณรัฐจีน (ไต้หวัน)
 - เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv ATCC ได้รับความอนุเคราะห์จาก คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
 - Tag-linker sequence Primer ยี่ห้อ TBA สั่งเคราะห์จากบริษัท Tohoku Bio-Array ประเทศญี่ปุ่น

2. เครื่องมือ

- เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ ยี่ห้อ BioTek รุ่น Synergy H1 จากบริษัท BioTek จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) ยี่ห้อ Labnet จากบริษัท Labnet international จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง Thermo cycler (PCR) ยี่ห้อ SensoQuest จากบริษัท SensoQuest จำกัด ประเทศ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- เครื่องเขย่าผสมสาร ยี่ห้อ Labnet จากบริษัท Labnet international จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง ยี่ห้อ Eppendorf จากบริษัท Eppendorf จำกัด สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก ยี่ห้อ Labnet จากบริษัท Labnet international จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ยี่ห้อ Bio-Rad จากบริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. การออกแบบงานวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpoB* ด้วยเทคนิค DNA Sequencing

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* บริเวณ RRDRs ซึ่งครอบคลุมโคดอนที่ 459 ถึง 604 ด้วยปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing เพื่อหาตำแหน่งการกลายพันธุ์

- 3.2 การพัฒนาเทคนิค Multiplex allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC) พัฒนาเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับการตรวจวัดผลผลิตด้วย Dipstick chromatography โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมจากการทำปฏิกิริยาทั้งหมดใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 เป็นตัวแทนในการพัฒนา
- 3.3 การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิกด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC นำ DNA ที่สกัดได้จากโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก มาตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516, 526 และ 531 ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC
- 3.4 การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค MAS-RPA-DC ในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* นำผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516, 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก ที่ทดสอบด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC มาคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ และค่าความสอดคล้อง โดยเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing และการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิคทางพีโนไทป์

4. วิธีการทดลอง

4.1 การคำนวณหาจำนวนกลุ่มตัวอย่าง

กำหนดระดับความเชื่อมั่นของการวิจัย และคำนวณหาจำนวนของกลุ่มตัวอย่างที่จะใช้ในการศึกษาวิจัย โดยอาศัยข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้า ร่วมกับการใช้สูตรของ Buderer และคณะ (82) ดังรายละเอียดด้านล่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความไว

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

การคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบความจำเพาะ

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

โดยกำหนดให้

- N1 และ N2 = จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัย
- $Z_{\alpha/2}$ = ระดับความเชื่อมั่นที่กำหนด (ผู้วิจัยกำหนดให้มีความเชื่อมั่นที่ 95%) = 1.96 (82)
- W = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (0.05)
- P = ค่าประมาณความชุกของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin ในประเทศไทยเท่ากับ 6.4% (54)
- SN = ค่าความไวของวิธีมาตรฐาน (DNA sequencing) สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin = 96% (83)
- SP = ค่าความจำเพาะของวิธีมาตรฐาน (DNA sequencing) สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin = 99% (83)

จากผลการคำนวณตัวอย่างด้วยสูตรข้างต้น ได้จำนวนตัวอย่างเท่ากับ 922 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม เมื่อนำข้อมูลการกำหนดตัวอย่างทั้งหมดมาพิจารณาพร้อมกับความเหมาะสมของระยะเวลาการศึกษาและการศึกษาและงบประมาณ ประกอบกับข้อจำกัดของการเก็บตัวอย่างในช่วงทำการศึกษาที่มีการ

แพร่ระบาดของโรคโควิด-19 จึงได้กำหนดขนาดตัวอย่างของการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 141 ตัวอย่าง ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้าของ Prammananan และคณะ (7) ที่ได้พัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในประเทศไทย และได้กำหนดขนาดตัวอย่างเท่ากับ 154 ตัวอย่าง

4.2 การพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติพิจารณารับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ COA.MURA2021/70

4.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอย่าง DNA จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย 1. DNA ที่สกัดมาจากโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ (Left over specimen) ของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกันจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย จำนวน 99 ตัวอย่าง 2. DNA ที่สกัดมาจากโคลนของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 26 ตัวอย่าง และ 3. DNA เหลือใช้ที่ได้จากห้องปฏิบัติการสังกัดกรุงเทพมหานคร ซึ่งไม่ได้รับอนุญาตให้เปิดเผยแหล่งที่มา จำนวนทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งเป็น DNA ที่สกัดได้จากโคลนของ *M. tuberculosis* จำนวน 11 ตัวอย่าง และ DNA ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะโดยตรง จำนวน 5 ตัวอย่าง ตัวอย่าง DNA ทั้งหมดถูกนำมากำหนดรหัสใหม่ และไม่มีข้อมูลใดที่สามารถสืบค้นกลับไปยังรายละเอียดของผู้ป่วยได้

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกนำมาสกัด DNA ได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้น ดังนี้ 1. เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกนำมาสกัด DNA จำนวน จำนวน 99 ตัวอย่าง ถูกวินิจฉัยจำแนกเชื้อ และทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test (บริษัท Alere จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเทคนิค BACTEC™ Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT) 960 (บริษัท Becton Dickinson จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ตามลำดับ จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล 2. เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกนำมาสกัด DNA จำนวน 26 ตัวอย่าง ถูกวินิจฉัยจำแนกเชื้อ และทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสและเทคนิค BACTEC™ MGIT 960 ตามลำดับ จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น และ 3. เชื้อ *M. tuberculosis* และสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ถูกนำมาสกัด DNA จำนวน 16 ตัวอย่าง ถูกวินิจฉัยจำแนกเชื้อด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test (บริษัท Alere จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) จากห้องปฏิบัติการสังกัดกรุงเทพมหานคร

4.4 เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน

เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย

4.5 เชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531

เชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 จำนวนรวมทั้งสิ้น 3 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* และต่อยา Rifampicin ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT 64 SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test และเทคนิค BACTEC™ MGIT 960 ตามลำดับ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ถูกยืนยันการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ในการศึกษาครั้งนี้นำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.6 การสกัด DNA ของ *M. tuberculosis*

โคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมดถูกนำมาสกัด DNA ด้วยวิธีการต้ม โดยห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA ในขณะที่ส่งตรวจเสมหะ ถูกสกัด DNA โดยเครื่องสกัดอัตโนมัติซึ่งใช้หลักการสกัดด้วย Magnetic Beads โดยห้องปฏิบัติการสังกัดกรุงเทพมหานคร DNA ที่สกัดได้ทั้งหมดถูกนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader) (บริษัท BioTek จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.7 Primer ที่ใช้ในการศึกษา

Primer ที่ใช้ในการศึกษา ได้ถูกอ้างอิงมาจากการศึกษาก่อนหน้า (84) ซึ่งถูกออกแบบโดยใช้ลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (GenBank accession no. NC_000962) เป็นต้นแบบในการออกแบบ ถูกตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) และถูกใช้ในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของ *M. tuberculosis* จากการศึกษาที่ผ่านมา โดย Singpanomchai และคณะ (14, 84) ประกอบไปด้วย

4.7.1 Primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpoB* เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา PCR

Primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpoB* (*rpoB* PCR primer) ถูกออกแบบสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing โดยออกแบบกำหนดให้ Primer จับที่ยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 459 ถึง 604 ซึ่งครอบคลุมบริเวณ RRDRs ขนาด 81 bp ที่มีพบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* รายละเอียดของ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpoB* สำหรับปฏิกิริยา PCR ดังแสดงในตารางที่ 1

4.7.2 Primer เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา RPA

Primer ทั้งหมดที่ใช้ในปฏิกิริยา RPA ถูกออกแบบเพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับปฏิกิริยาดังกล่าว กล่าวคือได้ถูกออกแบบให้ Primer มีความยาวประมาณ 30 ถึง 35 bp เพื่อเพิ่มความจำเพาะ และไม่ให้ความยาวมากกว่า 45 bp เนื่องจากมีโอกาสเกิด Primer-dimer สูง นอกจากนี้ Primer ได้ถูกออกแบบให้ปลายด้าน 5' (ประมาณ 3 ถึง 5 นิวคลีโอไทด์แรก) เป็นเบสกลุ่ม Pyrimidines (Cytosine หรือ Thymine) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อขยายสายของ DNA และหลีกเลี่ยงการออกแบบ Primer ที่มีเบส Guanines ซ้ำกันภายในเส้น ในขณะที่ Primer ถูกออกแบบให้มีเบส Cytosine และ Guanines ที่ปลายทางด้าน 3' เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกันระหว่าง Primer และเบสคู่สมของ DNA ต้นแบบ ทำให้เพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยาให้ดีขึ้น และได้ออกแบบให้มีปริมาณของ GC ของ Primer อยู่ระหว่าง 30 ถึง 70% ในขณะที่ขนาดของผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา RPA ควรมีความยาวประมาณ 100 ถึง 200 bp (57)

ในการศึกษานี้ได้ดัดแปลง Primer ทั้งหมดที่ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา RPA เพื่อให้สามารถเพิ่มผลผลิตที่จะนำไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ กล่าวคือ ที่ปลายด้าน 5' ของ Forward primer แต่ละเส้นถูกติดด้วยฉลากลำดับเบส (Tag-linker sequence) ที่แตกต่างกันออกไป และเป็นฉลากลำดับเบสที่จำเพาะกับฉลากลำดับเบสคู่สมที่ถูกตรึงอยู่เป็นแถบตำแหน่งต่างๆ บนพื้นเมมเบรนของแผ่นทดสอบ ในขณะที่ปลายด้าน 5' ของ Reverse primer แต่ละเส้นมี Biotin ติดอยู่ ดังนั้นผลผลิต RPA ที่เกิดขึ้นจะมีทั้งฉลากลำดับเบสและ Biotin ติดอยู่ ซึ่งสามารถจับกับแถบฉลากลำดับเบสบนแผ่นทดสอบ

Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา RPA ทั้งหมด ประกอบไปด้วย

4.7.2.1 Primer ที่จำเพาะต่อ IS1081

Primer ที่จำเพาะต่อ IS1081 (IS1081 primer) ถูกออกแบบสำหรับใช้ในการวินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยปฏิกิริยา RPA ทั้งนี้ Primer ดังกล่าวถูกออกแบบให้มีความยาว 30-35 bp เพื่อให้เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยา RPA รายละเอียดของ Primer ที่จำเพาะต่อ IS1081 สำหรับปฏิกิริยา RPA ดังแสดงในตารางที่ 1

4.7.2.2 Allele-specific (AS) primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน

rpoB ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531

AS primer ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ถูกออกแบบให้สามารถวินิจฉัยการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียวของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอนที่พบได้บ่อยสุดสามอันดับแรก ได้แก่ โคดอน 516 526 และ 531 ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* การออกแบบ AS primer อาศัยหลักการของ Yaku-Bonczyk (85) โดยอ้างอิงลำดับเบสจาก DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (GenBank Accession no. NC_000962) โดยออกแบบปลายด้าน 3' ของ AS primer ให้ลำดับเบสตำแหน่งสุดท้ายจับอย่างจำเพาะกับลำดับเบสที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ณ โคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ในขณะที่ตำแหน่งลำดับเบสถัดจากตำแหน่งร่องสุดท้ายถูกออกแบบให้มีการเพิ่มลำดับเบสที่ไม่ใช่คู่สม (Mismatch) ซึ่งไม่จำเพาะต่อลำดับเบสของ DNA ต้นแบบทั้งชนิดที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ (รูปที่ 4)

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

X คือ ลำดับเบสที่ไม่จำเพาะต่อทั้ง DNA ที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์

Y คือ ลำดับเบสที่จำเพาะต่อทั้ง DNA ที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์

Z คือ ลำดับเบสที่จำเพาะต่อ DNA ที่ไม่มี การกลายพันธุ์ (site specific)

รูปที่ 4 ตัวอย่างการออกแบบ Allele-specific primer ตามวิธีของ Yaku-Bonczyk

(85)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

ดังนั้นเมื่อนำ AS primer ที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 (*rpoB*516 primer *rpoB*526 primer และ *rpoB*531 primer ตามลำดับ) มาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มี การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใด AS primer จะสามารถจับกับ DNA ต้นแบบได้อย่างจำเพาะ ส่งผลให้เกิด การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ AS primer แต่ละเส้นได้ ในทางตรงกันข้ามหากเชื้อมีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนใดตำแหน่งหนึ่ง AS primer ซึ่งถูกออกแบบอย่างจำเพาะต่อตำแหน่งโคดอน ที่กลายพันธุ์จะไม่สามารถเข้าจับ DNA ต้นแบบ ส่งผลให้ไม่เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ AS primer เส้นนั้น รายละเอียดของ Primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 สำหรับปฏิกิริยา RPA ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ยีน	Primer	ปฏิกิริยา	ลำดับเบส	ขนาด ของผลผลิต (bp)	ที่มา
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> F <i>rpoB</i> R	PCR และ Sequencing	Forward GCTGATCCAAAACCAGATCC Reverse ACACGATCTCGTCGCTAACC	440	(14)
IS1081	IS1081 F IS1081 R	RPA	Forward Tag1- CCTCTTCTCATTTATCGACGCCGAGCAGC Reverse Biotin- CTGATTGGACCGCTCATCGCTGCGTTCGC	173	ดัดแปลง จาก (84)
<i>rpoB516</i> primer	<i>rpoB516</i> F <i>rpoB</i> R'2	RPA	Forward Tag2- TCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATCGA Reverse Biotin- ACACGATCTCGTCGCTAACCACGCCGTCG	297	ดัดแปลง จาก (84)
<i>rpoB526</i> primer	<i>rpoB526</i> F <i>rpoB</i> R'2	RPA	Forward Tag3- CCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACTCA Reverse Biotin- ACACGATCTCGTCGCTAACCACGCCGTCG	266	ดัดแปลง จาก (84)
<i>rpoB531</i> primer	<i>rpoB531</i> F <i>rpoB</i> R'2	RPA	Forward Tag4- TCGGGGTTGACCCACAAGCGCCGACTCTC Reverse Biotin- ACACGATCTCGTCGCTAACCACGCCGTCG	250	ดัดแปลง จาก (84)

หมายเหตุ Tag1 - 4 คือ ฉลากเบสที่ถูกติดลงบน Primer

4.8 การวิเคราะห์หาลำดับเบสเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ

M. tuberculosis

นำ DNA ต้นแบบที่สกัดได้ในการทดสอบขั้นตอน 4.6 จากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* และสิ่งส่งตรวจเสมหะ รวมจำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA sequencing ดังรายละเอียดด้านล่าง

4.8.1 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ด้วยปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpoB* ดังแสดงในตารางที่ 1 ในปฏิกิริยา 1 หลอดมีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 μl ประกอบไปด้วย Standard buffer *Taq* reaction ความเข้มข้น 1 เท่า Forward primer และ Reverse primer ความเข้มข้น 0.2 μM dNTPs ความเข้มข้น 200 μM Magnesium chloride (MgCl_2) ความเข้มข้น 1.5 mM เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U และ DNA ต้นแบบปริมาณ 1 ng โดยมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นหลอดควบคุมลบ และเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv เป็นหลอดควบคุมบวก ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาขั้นถัดไปที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวนทั้งสิ้น 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำผลผลิต PCR ปริมาตร 5 μl ผสมกับ Loading dyes ความเข้มข้น 6x ปริมาตร 1 μl และนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5% ที่มีส่วนผสมของสี Ultrapower DNA/RNA safe dye ความเข้มข้น 100 เท่า (บริษัท Gellex International จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 45 นาที โดยเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 bp บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต วัดความเข้มข้นของผลผลิต PCR ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA (Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader) (บริษัท BioTek จำกัด, ประเทศสหรัฐอเมริกา) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

4.8.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpoB* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

นำผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ที่ได้จากข้อ 4.8.1 ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เตรียมผลผลิต PCR ปริมาตร 35 μl และมีความเข้มข้น DNA ไม่น้อยกว่า 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ พร้อมกับ *rpoB* Forward primer ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท Bioneer sequencing service จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 141 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv (GenBank accession no. NC_000962) เพื่อหาลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ด้วยโปรแกรม MegAlign

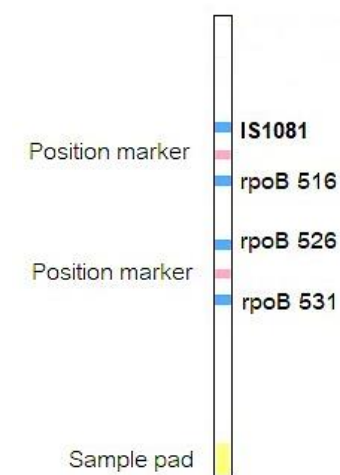
4.9 การพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC)

ทำการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับการตรวจวัดผลผลิตด้วย Dipstick chromatography โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 เป็นตัวแทนในการพัฒนาในขั้นตอนนี้ และเริ่มพัฒนาจากการเตรียมแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับใช้ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-RPA สำหรับใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

4.9.1 การเตรียมแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography

ออกแบบและสังเคราะห์แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จากบริษัท Tohoku Bio-array จำกัด ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้แผ่นทดสอบขนาด 2.5 x 4.5 mm เป็นแผ่นเมมเบรนที่มีการติดฉลากด้วยลำดับเบสคู่สมที่จำเพาะกับลำดับเบสคู่สมของ Tag-linker sequence บน Primer ของผลผลิต MAS-RPA บนพื้นผิวของแผ่นทดสอบ ประกอบไปด้วย 1. แถบ IS1081 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จำเพาะต่อผลผลิต MAS-RPA ของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้วินิจฉัยจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อสายพันธุ์อื่น และ 2. แถบ *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่จำเพาะต่อผลผลิต MAS-RPA ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 และใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอนดังกล่าวตามลำดับ

ในขณะที่บนแผ่นทดสอบแต่ละช่วง มีแถบกำหนดตำแหน่ง (Position marker) ปรากฏอยู่เพื่อช่วยให้
ง่ายต่อการอ่านผล (รูปที่ 5)

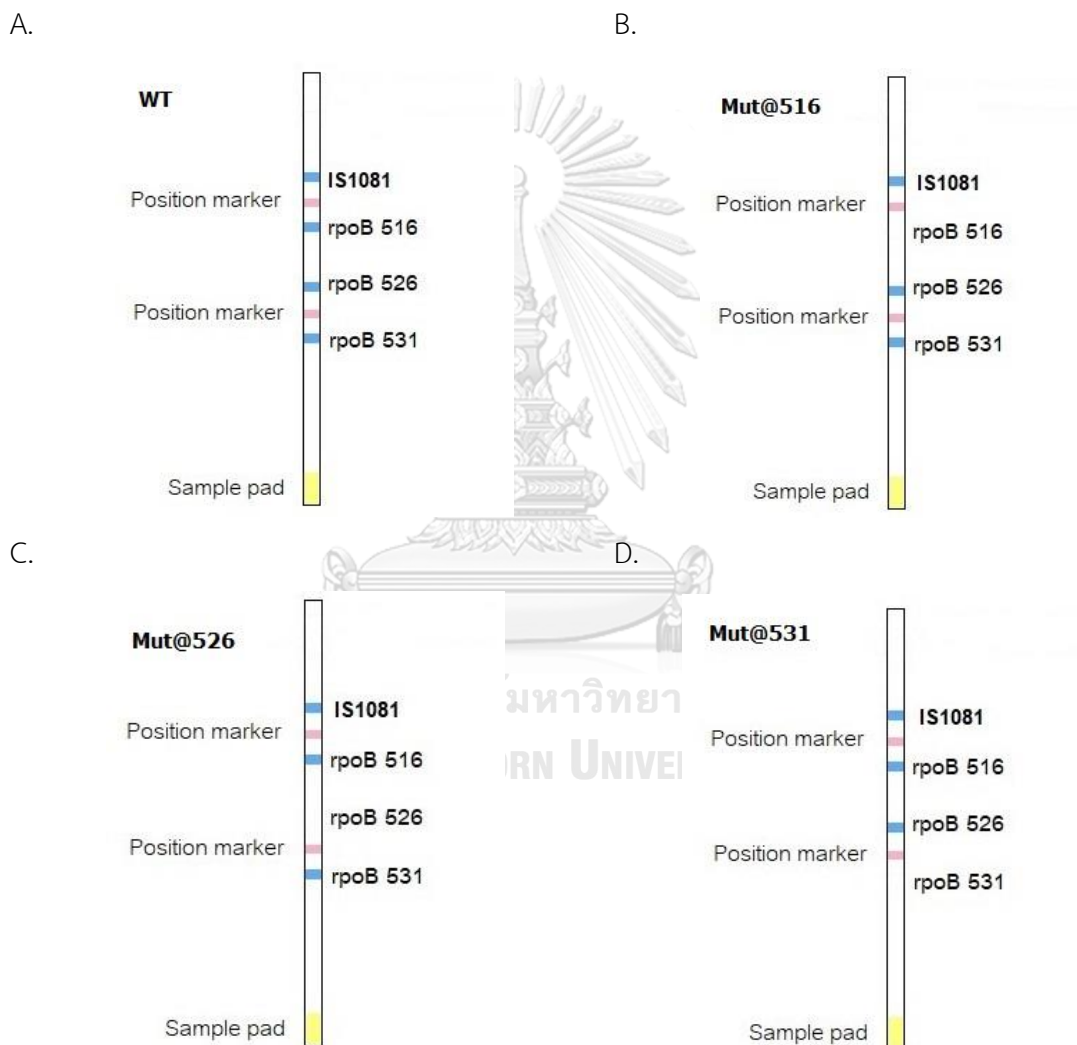


รูปที่ 5 ตัวอย่างจำลองแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อ
M. tuberculosis ที่ดื้อยา Rifampicin

แถบสีน้ำเงินคือแถบ IS1081 rpoB516 rpoB526 และ rpoB531 แถบสีชมพูคือแถบกำหนดตำแหน่ง
แถบสีเหลืองคือบริเวณปลายด้านที่ใช้จุ่มกับผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ถูกใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิตของ
ปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดขึ้นจากภายหลังเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย IS1081 primer rpoB516
primer rpoB526 primer และ rpoB531 primer โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis*
สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์
โดยนำผลผลิต MAS-RPA ปริมาตร 2 μ l ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีปริมาตรสุทธิ
เท่ากับ 10 μ l และผสมกับ Dipstick modified developing buffer (บริษัท Tohoku Bio-array
จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated
blue latex beads (บริษัท Tohoku Bio-array จำกัด, ประเทศญี่ปุ่น) ปริมาตร 1 μ l ผสมให้เข้ากัน
นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปในการละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที
และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่
จำเพาะต่อแต่ละยีน หากตำแหน่งใดบนแผ่นทดสอบมีแถบสีฟ้าปรากฏแสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณสาร
พันธุกรรมของยีนหรือตำแหน่งโคดอนนั้น ในทางตรงกันข้ามหากตำแหน่งใดบนแผ่นทดสอบไม่พบ

แถบสีฟ้าปรากฏ แสดงว่ายีนหรือตำแหน่งโคดอนดังกล่าวไม่มีการถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เนื่องจากไม่พบตำแหน่ง IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* หรือมีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 หรือ 531 ตามลำดับ รูปที่ 6 แสดงตัวอย่างการอ่านผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC สำหรับวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis*



รูปที่ 6 ตัวอย่างการอ่านผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC ของเชื้อ *M. tuberculosis*

สำหรับวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531

A) ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอนทั้งสาม (เชื้อน่าจะไวต่อยา Rifampicin) เนื่องจากแผ่นทดสอบปรากฏแถบสีฟ้าขึ้นครบทุกตำแหน่ง B) ตรวจพบ

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 (เชื่อน่าจะดื้อต่อยา Rifampicin) เนื่องจากแผ่นทดสอบไม่ปรากฏแถบสีฟ้าตรงตำแหน่งโคดอน 516 C) ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 526 (เชื่อน่าจะดื้อต่อยา Rifampicin) เนื่องจากแผ่นทดสอบไม่ปรากฏแถบสีฟ้าตรงตำแหน่งโคดอน 526 D) ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 531 (เชื่อน่าจะดื้อต่อยา Rifampicin) เนื่องจากแผ่นทดสอบไม่ปรากฏแถบสีฟ้าตรงตำแหน่งโคดอน 531

4.9.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Multiplex allele-specific recombinase polymerase ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC)

นำ Primer ที่ถูกออกแบบสำหรับปฏิกิริยา RPA ในข้อ 4.7.2 ซึ่งประกอบไปด้วย IS1081 primer ที่จำเพาะต่อ IS1081 และ *rpoB*516 primer *rpoB*526 primer และ *rpoB*531 primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ มาใช้ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดย Primer ดังกล่าวทั้งหมด สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ DNA ต้นแบบและวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของโคดอนแต่ละตำแหน่งข้างต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพในสถานะที่เป็นปฏิกิริยา RPA แบบ Singleplex จากการศึกษาท่อนำของ Singpanomchai และคณะ (14, 84)

ในการหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-RPA ใช้ชุดน้ำยา RPA TwistAmp® Basic Kit (บริษัท Twist Dx จำกัด, สหราชอาณาจักร) (86) ทำปฏิกิริยากับ IS1081 primer *rpoB*516 primer *rpoB*526 primer และ *rpoB*531 primer โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา ใส่ Primer ทั้งหมด 4 คู่ ในเวลาเดียวกัน และใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่อไปนี้เป็นตัวแทนของการพัฒนาปฏิกิริยา MAS-RPA ได้แก่ เชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งใดๆ ของยีน *rpoB* เป็นตัวควบคุมบวก (หมายถึง Primer สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้) ในขณะที่ใช้เชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เป็นตัวควบคุมลบ (หมายถึง Primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้)

เตรียมปฏิกิริยา MAS-RPA ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา (86) ดังนี้ เตรียม Master mix ซึ่งประกอบด้วย Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 *rpoB* 526 และ *rpoB* 531 ความเข้มข้น 0.12 μM ปริมาตรเส้นละ 0.6 μl Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* R'2 ความเข้มข้น 0.36 μM ปริมาตรเส้นละ 1.8 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μM ปริมาตรเส้นละ 0.6 μl รวมปริมาตรเท่ากับ 4.8 μl ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl เติม DNA ต้นแบบที่ความเข้มข้น 40 ng ปริมาตร 1 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม Magnesium acetate (MgOAc) ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 2 μl ไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography และอ่านผลด้วยตาเปล่า ภายในเวลา 15 นาที

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา MAS-RPA และสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ตามรายละเอียด ต่อไปนี้

4.9.2.1 การทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เจือจาง DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 30, 40, 50, 60 และ 70 ng นำ DNA ต้นแบบในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 μl มาทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค MAS-RPA โดยใช้ Tag-linker sequence forward primer ของแต่ละยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.12 μM ปริมาตรเส้นละ 0.6 μl Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.36 μM ปริมาตรเส้นละ 1.8 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μM ปริมาตรเส้นละ 0.6 μl รวมปริมาตรเท่ากับ 4.8 μl ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตปริมาตร 2 μl ไปตรวจสอบด้วยแผ่น

ทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μ l และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่สามารถสังเกตเห็นแถบของผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่ชัดเจนที่สุดในแต่ละแถบ

4.9.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Primer ในปฏิกิริยา MAS-RPA โดยมีรายละเอียดความเข้มข้นของ Primer แต่ละชุดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงรายละเอียดความเข้มข้นของ Primer แต่ละชุดที่ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม

ชุดที่	Tag-linker sequence Forward Primer								Tag-linker sequence Reverse Primer				รวม (uM)
	<i>rpoB516 F</i>		<i>rpoB526 F</i>		<i>rpoB531 F</i>		IS1081 F		<i>rpoB R'2</i>		IS1081 R		
	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	ความเข้มข้น (uM)	ปริมาตร (ul)	
1	0.12	0.6	0.10	0.5	0.10	0.5	0.16	0.8	0.17	0.85	0.16	0.8	4.05
2	0.12	0.6	0.10	0.5	0.10	0.5	0.16	0.8	0.16	0.8	0.16	0.8	4
3	0.10	0.5	0.08	0.4	0.10	0.5	0.16	0.8	0.17	0.85	0.16	0.8	3.85
4	0.08	0.4	0.06	0.3	0.10	0.5	0.16	0.8	0.17	0.85	0.16	0.8	3.65
5	0.04	0.2	0.05	0.2	0.10	0.4	0.16	0.8	0.17	0.85	0.16	0.8	3.25
6	0.03	0.15	0.05	0.25	0.10	0.5	0.12	0.6	0.17	0.85	0.12	0.6	2.95
7	0.04	0.2	0.04	0.2	0.10	0.5	0.12	0.6	0.17	0.85	0.12	0.6	2.95
8	0.04	0.2	0.04	0.2	0.10	0.5	0.10	0.5	0.17	0.85	0.10	0.5	2.75
9	0.05	0.25	0.05	0.25	0.10	0.5	0.14	0.7	0.17	0.85	0.14	0.7	3.25
10	0.04	0.2	0.04	0.2	0.10	0.5	0.15	0.75	0.17	0.85	0.15	0.75	3.25
11	0.04	0.2	0.04	0.2	0.08	0.4	0.15	0.75	0.17	0.85	0.15	0.75	3.15
12	0.04	0.2	0.05	0.25	0.10	0.5	0.15	0.75	0.17	0.85	0.15	0.75	3.3
13	0.03	0.15	0.04	0.2	0.10	0.5	0.15	0.75	0.17	0.85	0.15	0.75	3.2
14	0.05	0.25	0.07	0.35	0.10	0.5	0.15	0.75	0.17	0.85	0.15	0.75	3.45

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีอาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 โดยใช้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบตามที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl มาทดสอบปฏิกิริยาด้วยเทคนิค MAS-RPA โดยให้ Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนมีความเข้มข้นดังแสดงในตารางด้านบน ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 2 μl ไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าเมื่อครบเวลา โดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกชุดความเข้มข้นของ Primer ที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีอาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.3 การทดสอบหาระยะเวลาบ่มที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนที่มีความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดเจนที่สุดที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนี้ 20 25 30

และ 35 นาที โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิต ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 2 μl ไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าเมื่อครบเวลา โดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dipstick modified developing buffer ในการตรวจสอบผลผลิต

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาที่ได้จากข้อ 4.9.2.3 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 2 μl เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl และผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μl จากนั้นผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 150 160 180 200

220 240 260 280 และ 300 mM ปริมาตร 10 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปนในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer ที่เหมาะสมที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.5 การทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ Streptavidin-coated blue latex beads ในการตรวจสอบผลผลิต

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ได้จากการทดสอบในข้อที่

4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาที่ได้จากข้อ 4.9.2.3 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 2 μl ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตรต่างๆ ตั้งแต่ 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปนในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสมที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis*

สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.6 การทดสอบหาอัตราส่วนการเจือจางผลผลิตที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาที่ได้จากข้อ 4.9.2.3 โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:4 1:9 1:11 1:12 1:13 และ 1:14 และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตรที่ได้ในข้อ 4.9.2.5 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงไปนในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ เลือกปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่เหมาะสมที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.7 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาของ MAS-RPA โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของแต่ละยีนที่ความเข้มข้นที่ให้ผลของปฏิกิริยาชัดที่สุดที่ได้จากการทดสอบในข้อที่ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 35 37 และ 39 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่ได้จาก

ข้อ 4.9.2.3 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์อัตราส่วนที่ได้ในข้อ 4.9.2.6 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตรที่ได้จากข้อ 4.9.2.5 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที และอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าเมื่อครบเวลา โดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.9.2.8 การทดสอบหาระยะเวลากลุ่มแผ่นทดสอบที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลผลิต

นำผลผลิต MAS-RPA อัตราส่วนที่ได้ในข้อ 4.9.2.6 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตรที่ได้จากข้อ 4.9.2.5 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวอ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบที่เหมาะสมในการอ่านปฏิกิริยาที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.10 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค MAS-RPA-DC

นำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC ที่พัฒนาได้จากข้างต้นมาทดสอบกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *M. tuberculosis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มักพบการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella cattarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* และ *Acinetobacter baumannii* โดยใช้ DNA ต้นแบบที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 4.9.2.1 ปริมาตร 1 μl มาทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค M-RPA โดยให้ Tag-linker sequence forward primer ของ IS1081 และแต่ละยีน *rpoB516*, *rpoB526* และ *rpoB531* และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 และยีน *rpoB* มีความเข้มข้นและปริมาตรซึ่งได้จากข้อ 4.9.2.2 จากนั้นผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μl เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μl เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μl และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.9.2.7 เป็นระยะเวลาซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.9.2.3 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นหลอดควบคุมลบ นำผลผลิต MAS-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรที่ได้จากข้อ 4.9.2.6 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตรรวม 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตรที่ได้ในข้อ 4.9.2.5 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบระยะเวลาจากที่ทำการทดลองในข้อ 4.9.2.8 อ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน

4.11 การทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (Limit of detection; LOD) ของ DNA

ต้นแบบที่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

เจือจาง DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน

rpoB ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 30 20 10 1 0.1 และ 0.01 ng ปริมาตร 1 μ l มาทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค MAS-RPA โดยให้ Tag-linker sequence forward primer ของ IS1081 และแต่ละยีนของ *rpoB*516, *rpoB*526 และ *rpoB*531 และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 และยีน *rpoB* มีความเข้มข้นและปริมาตรซึ่งได้จากข้อ 4.9.2.2 ผสมกับ Rehydration buffer 29.5 μ l เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 47.5 μ l เติม MgOAc ปริมาตร 2.5 μ l และผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.9.2.7 เป็นระยะเวลาซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.9.2.3 โดยใช้ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นหลอดควบคุมลบ นำผลผลิต M-RPA ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรที่ได้จากข้อ 4.9.2.6 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้นที่ได้ในข้อ 4.9.2.4 ปริมาตรรวม 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตรที่ได้ในข้อ 4.9.2.5 ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบระยะเวลาจากที่ทำการทดลองในข้อ 4.9.2.8 อ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน เลือกความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตของ IS1081 และยีน *rpoB* โคดอน 516 526 และ 531 ที่เกิดขึ้นและมีความแตกต่างกันระหว่างเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.12 การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

นำ DNA ต้นแบบที่สกัดได้ในการทดสอบขั้นตอน 4.5 จากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล รวมจำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง มาทำการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC โดยใช้

สถานะที่พัฒนาได้จากการทดสอบข้อที่ 4.9.2 ภายหลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำผลผลิตไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด kit Gel/PCR purification ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต นำผลผลิต MAS-RPA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นผสมกับ Dipstick modified developing buffer และ Streptavidin-coated blue latex beads ตามรายละเอียดที่พัฒนาได้จากการทดสอบข้อที่ 4.9.2.6 4.9.2.4 และ 4.9.2.5 ตามลำดับ นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลาตามขั้นตอนข้อที่ 4.9.2.8 อ่านผลทันทีด้วยตาเปล่าโดยสังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบ อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน ในการทดสอบแต่ละครั้งใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวกของเชื้อสายปกติ และใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 เป็นตัวควบคุมบวกของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวแทนควบคุมลบ

4.13 การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa ของเทคนิค MAS-RPA-DC

ผลการตรวจวินิจฉัยหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งหมด 141 ตัวอย่าง ถูกนำมาเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางจีโนมไทป์ เพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ โดยมีวิธีการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 3

นอกจากนี้ เชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ได้ถูกนำผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีทางพีโนไทป์ มาเปรียบเทียบกับผลการตรวจวินิจฉัยหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ด้วยเทคนิค MAS-

RPA-DC และเทคนิค Sanger DNA sequencing เพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ โดยมีวิธีการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค DNA sequencing ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง

	พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing	ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing
พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค M-RPA-DC	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง

	เชื้อดื้อต่อยาเมื่อตรวจด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960	เชื้อไวต่อยาเมื่อตรวจด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960
พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบด้วยเทคนิค DNA sequencing เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง

	เชื้อดื้อยาเมื่อตรวจด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960	เชื้อไวต่อยาเมื่อตรวจด้วย เทคนิค BACTEC MGIT 960
พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing	ผลบวกจริง (a)	ผลบวกปลอม (b)
ไม่พบการกลายพันธุ์เมื่อตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing	ผลลบปลอม (c)	ผลลบจริง (d)

ความไวของการทดสอบ

$$= a/(a+c)$$

ความจำเพาะของการทดสอบ

$$= d/(b+d)$$

ค่าทำนายผลบวก

$$= a/(a+b)$$

ค่าทำนายผลลบ

$$= d/(c+d)$$

4.13.1 การประเมินค่าความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบด้วยสถิติ Kappa

วิเคราะห์ค่าความสอดคล้องระหว่างผลการทดสอบจากเทคนิค MAS-RPA-DC เปรียบเทียบกับเทคนิค DNA sequencing ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง ผลการทดสอบจากเทคนิค MAS-RPA-DC เปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง และ ผลการทดสอบจากเทคนิค DNA sequencing เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค BACTEC MGIT 960 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง ด้วยสถิติ Kappa โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% และระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ โดยใช้โปรแกรม GraphPad คำนวณ (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>)

ตารางที่ 6 ตารางแสดงตัวอย่างของผลการทดสอบที่แตกต่างกัน 2 วิธี

วิธีการทดสอบที่ 2	วิธีการทดสอบที่ 1		ผลรวม
	ผลการทดสอบบวก	ผลการทดสอบลบ	
ผลการทดสอบบวก	n_1	n_2	r_1
ผลการทดสอบลบ	n_3	n_4	r_2
ผลรวม	c_1	c_2	n

สูตรที่ใช้สำหรับการคำนวณค่าสถิติ Kappa (87)

$$K = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

โดยที่ P_0 หมายถึงค่าความสอดคล้องที่สังเกตได้จริง คำนวณได้จาก $P_0 = \frac{n_1 + n_4}{n}$

P_e หมายถึงโอกาสที่จะสอดคล้องกัน คำนวณได้จาก $P_e = \frac{r_1 c_1 + r_2 c_2}{n^2}$

ค่า K ที่คำนวณได้จะมีค่าระหว่าง 0-1 นำค่า K ไปเปรียบเทียบกับตารางการแปลผลความสอดคล้องกันทางสถิติ Kappa ตามตารางที่ 7 (87)

ตารางที่ 7 การแปลผลความสอดคล้องกันทางสถิติ Kappa ตามแนวทางของ Cohen

ค่าสถิติ Kappa	การแปลผลระดับความสอดคล้อง
น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0	อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่มี ความสอดคล้องกัน (No agreement)
0.01-0.20	อยู่ในเกณฑ์ที่มีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (None to slight)
0.21-0.40	อยู่ในเกณฑ์ที่มีความสอดคล้องกันพอใช้ (Fair)
0.41-0.60	อยู่ในเกณฑ์ที่มีความสอดคล้องกันปานกลาง (Moderate)
0.61-0.80	อยู่ในเกณฑ์ที่มีความสอดคล้องกันดี (Substantial)
0.81-1.00	อยู่ในเกณฑ์ที่มีความสอดคล้องกันดีมาก (Almost perfect)

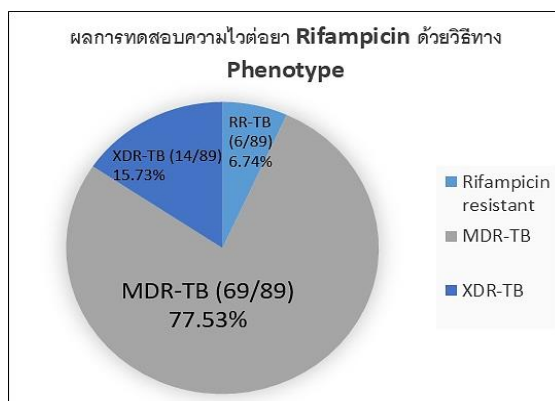
บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. ผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อตัวอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษา

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ถูกนำมาสกัด DNA เพื่อใช้ในการศึกษาค้างนี้ เป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้ (Leftover specimen) ของผู้ป่วยที่ไม่ซ้ำกัน จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเชื้อที่มีผลทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC™ MGIT 960 จำนวน 125 ตัวอย่าง (จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย 99 ตัวอย่าง และจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 26 ตัวอย่าง) และเชื้อที่ไม่มีผลทดสอบความไวต่อยาดังกล่าวด้วยวิธีทางพีโนไทป์ จำนวน 16 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อที่ไวต่อยาจำนวน 36 ตัวอย่าง (คิดเป็น 28.8%) และเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin รวมทั้งหมด 89 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วย เชื้อที่ดื้อยา Rifampicin เพียงชนิดเดียว (Rifampicin-resistant TB, RR-TB) จำนวน 6 ตัวอย่าง (คิดเป็น 6.74 % จาก 89 ตัวอย่าง) เชื้อที่ดื้อต่อยาต้านเชื้อวัณโรคหลายขนานหรือ Multidrug-resistant TB (MDR-TB) จำนวน 69 ตัวอย่าง (คิดเป็น 77.53 % จาก 89 ตัวอย่าง) และเชื้อดื้อต่อยาต้านเชื้อวัณโรคหลายขนานชนิดรุนแรงมาก หรือ Extensively drug-resistant TB (XDR-TB) จำนวน 14 ตัวอย่าง (คิดเป็น 15.73 % จาก 89 ตัวอย่าง) ดังแสดงในรูปที่ 7

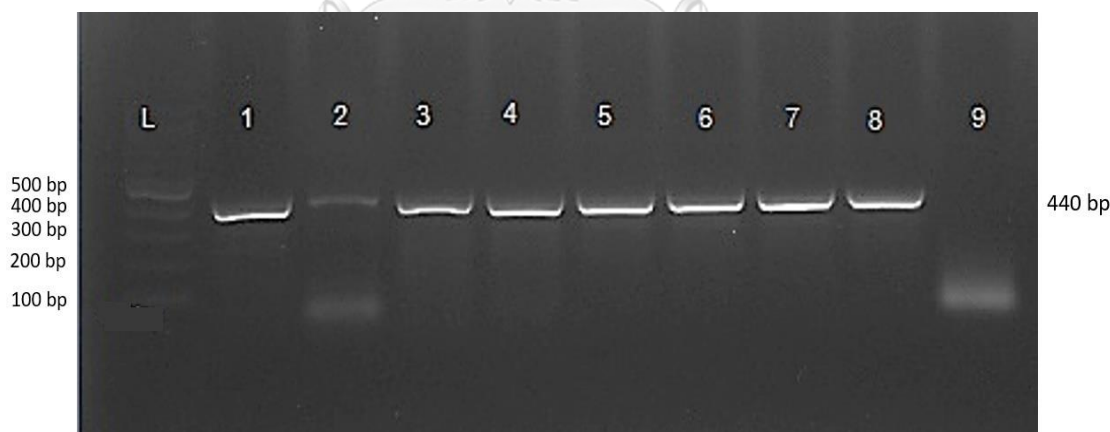


รูปที่ 7 ผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางฟีโนไทป์ของเชื้อ *M. tuberculosis*

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpoB* ด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing

2.1 ผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ด้วยเทคนิค PCR

ภายหลังกนำ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* บริเวณ RRDRs ตั้งแต่ตำแหน่งโคดอน 459 ถึง 604 ได้ผลผลิตขนาด 440 bp ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 การตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpoB* ของเชื้อ

M. tuberculosis บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 1.5 %

แถว L คือ DNA มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส แถว 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถวที่ 2 ถึง 8 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก พบแถบของผลผลิตของยีน *rpoB* มีขนาด 440 bp และ แถว 9 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ เป็นตัวควบคุมลบ

2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิต PCR

เมื่อนำลำดับเบสของผลผลิต PCR ของยีน *rpoB* ขนาด 440 bp ข้างต้น ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ด้วยโปรแกรม MegAlign ผลการวิเคราะห์รูปแบบของการกลายพันธุ์ที่พบแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือผลการวิเคราะห์จาก DNA จำนวน 125 ตัวอย่าง ที่มาจากเชื้อที่มีผลทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์ โดยเชื้อที่ไวต่อยา Rifampicin จำนวน 36 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 34 ตัวอย่าง และพบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 2 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่งที่โคดอน 511 จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งร่วมกัน ได้แก่ โคดอน 490, 494, 517 และ 527 จำนวน 1 ตัวอย่าง ในขณะที่เชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin จำนวน 89 ตัวอย่าง ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 6 ตัวอย่าง และพบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 83 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง จำนวน 78 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 531 จำนวน 47 ตัวอย่าง ที่โคดอน 526 จำนวน 19 ตัวอย่าง ที่โคดอน 516 จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่โคดอน 513 จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่โคดอน 522 จำนวน 2 ตัวอย่าง และโคดอน 533 จำนวน 2 ตัวอย่าง เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งร่วมกัน จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 511 ร่วมกับ 562 จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่โคดอน 512 ร่วมกับ 519 จำนวน 1 ตัวอย่าง และที่โคดอน 515 ร่วมกับ 516 จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งร่วมกัน ได้แก่ โคดอน 509, 510, 511 และ 512 จำนวน 2 ตัวอย่าง

กลุ่มที่สองคือผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่มาจากเชื้อที่ไม่มีผลทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 3 ตัวอย่าง และพบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* จำนวน 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 531 จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่โคดอน 526 จำนวน 1 ตัวอย่าง โคดอน 516 จำนวน 1 ตัวอย่าง และที่โคดอน 513 จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งร่วมกัน ได้แก่ โคดอน 527 ร่วมกับ 533 และ 556 จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 สรุปรูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบนลำดับเบสของยีน *rpoB* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing

โคดอนที่พบการกลายพันธุ์ยีน <i>rpoB</i>	นิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป (Substitution)	กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป	เชื้อที่ติดต่อยา Rifampicin (N=89)	เชื้อที่ไวต่อยา Rifampicin (N=36)	รวม (ตัวอย่าง)
1. <i>M. tuberculosis</i> ที่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin (125 ตัวอย่าง)					
1.1 ไม่พบการกลายพันธุ์	-	-	6	34	40
1.2 พบการกลายพันธุ์ 1 ตำแหน่ง					
-โคดอน 531	ไม่สามารถระบุได้	Serine (S) → Leucine (L)	10		47
	TCG → TTG	Serine (S) → Leucine (L)	33		
	TCG → TGG	Serine (S) → Tryptophan (W)	2	-	
	TCG → TTT	Serine (S) → Phenylalanine (F)	1		
	TCG → CAG	Serine (S) → Glutamine (Q)	1		
-โคดอน 526	ไม่สามารถระบุได้	Histidine (H) → Aspartate (D)	1		19
		Histidine (H) → Serine (S)	1		
	CAC → TAC	Histidine (H) → Tyrosine (Y)	9	-	
	CAC → GAC	Histidine (H) → Aspartate (D)	4		
	CAC → CGC	Histidine (H) → Arginine (R)	3		
	CAC → TGC	Histidine (H) → Cysteine (C)	1		
-โคดอน 516	ไม่สามารถระบุได้	Aspartate (D) → Glycine (G)	1		7
		Aspartate (D) → Valine (V)	5	-	
	GAC → GTC	Aspartate (D) → Valine (V)	1		
-โคดอน 511	CTG → CCG	Leucine (L) → Proline (P)	-	1	1
-โคดอน 513	ไม่สามารถระบุได้	Glutamine (Q) → Proline (P)	1	-	1
-โคดอน 522	ไม่สามารถระบุได้	Serine (S) → Leucine (L)	1	-	2

	TCG → CAG	Serine (S) → Glutamine (Q)	1		
-โคดอน 533	ไม่สามารถระบุได้	Lucine (L) → Proline (P)	1	-	2
	CTG → CCG	Lucine (L) → Proline (P)	1		
1.3 พบการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งร่วมกัน					
-โคดอน 511 และ 562	ไม่สามารถระบุได้	Lucine (L) → Proline (P) และ Glutamine (Q) → Alanine (A)	1	-	1
-โคดอน 512 และ 519	AGC → GGC	Serine (S) → Glycine (G) และ	1	-	1
	AAC → AAA	Asparagine (N) → Lysine (K)			
-โคดอน 515 และ 516	ATG → ATC	Methionine (M) → Isoleucine (I) และ	1	-	1
	GAC → TAC	Aspartate (D) → Tyrosine (Y)			
1.4 พบการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งร่วมกัน					
-โคดอน 509, 510, 511 และ 512	AGC → TG(GAT)*C	Serine (S) → Tryptophan (W), Isoleucine (I)	2	-	2
	CAG → CAC	Glutamine (Q) → Histidine (H)			
	CTG → CAG	Leucine (L) → Glutamine (Q)			
	AGC → ATC	Serine (S) → Isoleucine (I)			
-โคดอน 490, 494, 517 และ 527	CAG → CAT	Glutamine (Q) → Histidine (H)	-	1	1
	AAC → ATC	Asparagine (N) → Isoleucine (I)			
	CAG → CAA	Glutamine (Q) → Glutamine (Q)			
	AAG → AAC	Lysine (K) → Asparagine (N)			
รวมตัวอย่างที่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์			89	36	125
2. <i>M. tuberculosis</i> ที่ไม่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin (16 ตัวอย่าง)					
2.1 ไม่พบการกลายพันธุ์			-	-	3
2.2 พบการกลายพันธุ์					
1 ตำแหน่ง					

-โคดอน 531	TCG → TTG	Serine (S) → Leucine (L)	-	-	9
-โคดอน 526	CAC → GAC	Histidine (H) → Aspartate (D)	-	-	1
-โคดอน 516	GAC → GTC	Aspartate (D) → Valine (V)	-	-	1
-โคดอน 513	CAA → AAA	Glutamine (Q) → Lysine (K)	-	-	1
2.3 พบการกลายพันธุ์ 3 ตำแหน่งร่วมกัน					
-โคดอน 527, 533 และ 556	AAG → AAA CTG → CCG GGC → GGA	Lysine → Lysine (K) Lucine (L) → Proline (P) Glycine (G) → Glycine (G)	-	-	1
รวมตัวอย่างที่ไม่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์			-	-	16
รวมทั้งหมด (ตัวอย่าง)					141

หมายเหตุ * = นิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบแทรกเพิ่ม (Insertion)

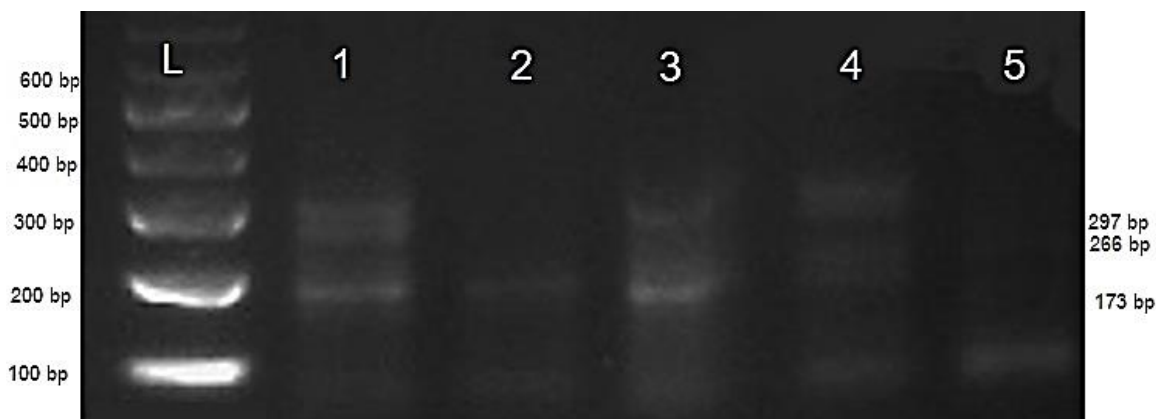
การกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่พบและสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง ที่ทราบผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่งด้วยการแทนที่ (Substitution) มีเพียงเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่างที่เกิดการกลายพันธุ์จากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ด้วยการเพิ่มขึ้น (Insertion) ซึ่งเกิด ณ ตำแหน่งโคดอน 509 โดยตำแหน่งโคดอนที่พบว่ามีกรกลายพันธุ์มากที่สุด 3 อันดับแรกในเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin จำนวน 89 ตัวอย่างคือโคดอน 531 จำนวน 47 ตัวอย่าง (52.8 %) โคดอน 526 จำนวน 19 ตัวอย่าง (21.3 %) โคดอน 516 จำนวน 7 ตัวอย่าง (7.9 %) ในขณะที่ตำแหน่งโคดอนอื่นที่พบว่าสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin แต่พบในอัตราความชุกที่ต่ำ ได้แก่ โคดอน 513 โคดอน 515 โคดอน 516 โคดอน 519 และโคดอน 562 จำนวนโคดอนละ 1 ตัวอย่าง (โคดอนละ 1.1 %) โคดอน 509 โคดอน 510 โคดอน 522 และโคดอน 533 จำนวนโคดอนละ 2 ตัวอย่าง (โคดอนละ 2.2 %) และโคดอน 511 และโคดอน 512 จำนวนโคดอนละ 3 ตัวอย่าง (โคดอนละ 3.4 %)

การศึกษาครั้งนี้ยังพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ได้แก่ โคดอน 490 โคดอน 494 และโคดอน 517 ที่พบในเชื้อที่ไวต่อยา Rifampicin โคดอน 527 ที่พบทั้งในเชื้อที่ไวต่อ

ยาและเชื้อที่ไม่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin และโคดอน 556 ที่พบในเชื้อที่ไม่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin

3. การพัฒนาเทคนิค Multiplex Allele-specific recombinase polymerase amplification ร่วมกับ Dipstick chromatography (MAS-RPA-DC)

ภายหลังนำ IS1081 primer *rpoB*516 primer *rpoB*526 primer และ *rpoB*531 primer มาทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยใน 1 หลอดปฏิกิริยา ใส่ Primer ทั้งหมด 4 คู่ และใช้สภาวะมาตรฐานเบื้องต้นตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตน้ำยา ประกอบด้วย Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531 ความเข้มข้น 0.24 μ M Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* R'2 ความเข้มข้น 0.24 μ M Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μ M ผสมกับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีกรกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ที่ความเข้มข้น 20 ng บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 % สามารถสังเกตเห็นผลผลิตของ IS1081 ยีน *rpoB* 516 ยีน *rpoB* 526 และยีน *rpoB* 531 ซึ่งมีขนาด 173 297 266 และ 250 bp ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แต่ไม่สามารถจำแนกรกลายพันธุ์ได้ เนื่องจากตำแหน่งของผลผลิตบนเจลแยกออกจากกันไม่ชัดเจน (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA ด้วย IS1081 primer *rpoB*516 primer *rpoB*526 primer และ *rpoB*531 primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 %

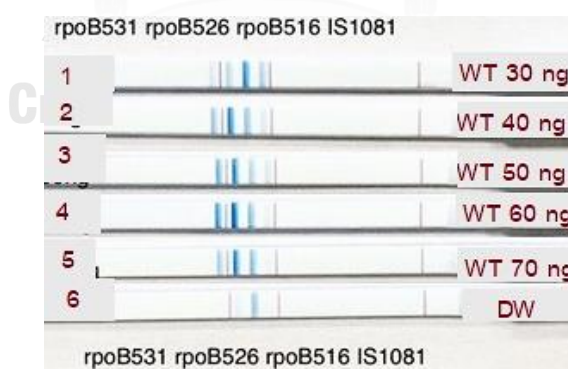
แถว L แสดง DNA มาตรฐานขนาด 100 bp แถวที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวกที่ไม่มีการกลายพันธุ์ แถวที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถวที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

ดังนั้น เพื่อให้ปฏิกิริยา MAS-RPA สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและจำแนกการกลายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน จึงทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ในการทำปฏิกิริยา และใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวกที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (หมายถึง Primer สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้) และเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing เป็นตัวควบคุมลบของแต่ละโคดอน (หมายถึง Primer ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้) และเรียกว่า Mutant 516 Mutant 526 และ Mutant 531 (MT516 MT526 และ MT531) ตามลำดับ รายละเอียดผลการทดสอบสภาวะต่างๆ ดังอธิบายด้านล่าง

3.1 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบเฉพาะของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv ที่เป็นตัวแทนบวก เพื่อประเมินความเข้มข้นของ DNA ที่สามารถเป็นต้นแบบให้กับปฏิกิริยา

MAS-RPA ในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายตำแหน่งต่างๆ ได้ทุกตำแหน่ง การทดสอบใช้ความเข้มข้น DNA เท่ากับ 30 40 50 60 และ 70 ng และใช้ Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.12 μM Tag-linker sequence forward primer ของแต่ละยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.12 μM Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.36 μM ภายหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางผลผลิต MAS-RPA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที พบว่าที่ DNA ความเข้มข้น 40 ng สามารถสังเกตเห็นแถบผลผลิตครบทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งของ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* และมีความชัดของแถบยีนใกล้เคียงกันทุกตำแหน่ง ความเข้มข้น 30 ng พบแถบผลผลิตเข้มเฉพาะบางแถบ ความเข้มข้น 50 60 และ 70 ng พบแถบผลผลิตบางแถบหายไป อย่างไรก็ตามที่ตัวควบคุมลบยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* ซึ่งเป็นผลบวกปลอม (รูปที่ 10) ดังนั้นจึงเลือกใช้ DNA ที่ความเข้มข้น 40 ng ร่วมกับการปรับความเข้มข้น Primer เพื่อให้มีความเหมาะสม และลดการเกิดผลบวกปลอมในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 10 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับ DNA ต้นแบบความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ความเข้มข้นที่ 30 40 50 60 และ 70 ng โดยแถบ *IS1081* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของ *IS1081* ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis*

ตามลำดับ แถบที่ 1-5 คือ DNA ความเข้มข้น 30 40 50 60 และ 70 ng ตามลำดับ ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 6 คือ น้ำกลั่น ปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของ Primer ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

จากผลการทดสอบความเข้มข้น DNA ที่เหมาะสมเท่ากับ 40 ng จำเป็นต้องปรับความเข้มข้นของ Primer แต่ละคู่ เพื่อให้เกิดผลบวกของแต่ละยีนที่ชัดเจนใกล้เคียงกัน และลดผลบวกปลอมที่แถบผลผลิตของตัวควบคุมลบ จึงได้ปรับเพิ่มความเข้มข้น Primer สำหรับคู่ที่พบแถบผลผลิตบาง และลดความเข้มข้น Primer สำหรับคู่ที่พบผลบวกปลอมบนแถบผลผลิต โดยประเมินผลจาก DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ภายหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และได้ใช้ผลการตรวจสอบผลผลิตจากแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เท่านั้น โดยเจือจางผลผลิต MAS-RPA ด้วยน้ำกลั่น ปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μ l และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที ซึ่งมีรายละเอียดผลการทดสอบความเข้มข้น Primer ที่เหมาะสมดังแสดงด้านล่าง

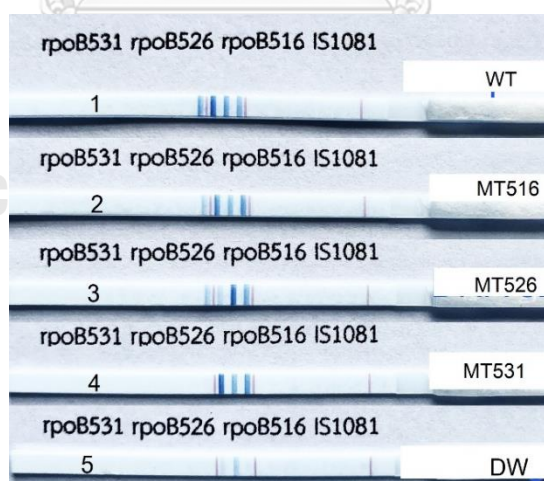
3.2.1 Primer ชุดที่ 1

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.12 0.10 และ 0.10 μ M ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μ M Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.16 μ M เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 11)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB* 516 *rpoB* 526 และ *rpoB* 531

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง ยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาผลความเข้มข้นของ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ลงเพื่อลดผลบวกปลอมที่เกิดขึ้นของยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ในตัวควบคุม MT516 MT526 และ MT531 ตามลำดับ และตัวควบคุมลบ



รูปที่ 11 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 1 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.12 0.10 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer

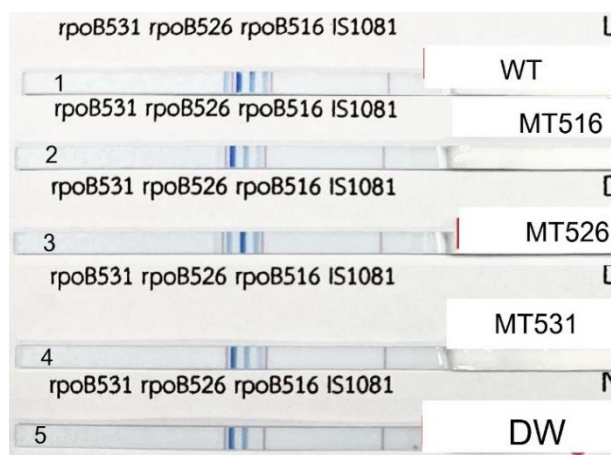
และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.16 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.2 Primer ชุดที่ 2

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.12 0.10 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.16 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.16 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 12)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB* 516 *rpoB* 526 และ *rpoB* 531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB* 516 *rpoB* 526 และ *rpoB* 531 (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB* 516 *rpoB* 526 และ *rpoB* 531 (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB* 516 และ *rpoB* 526 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 531 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *rpoB* 516 และ *rpoB* 526

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *rpoB526* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* และ *rpoB526* ที่กลายพันธุ์ในตัวควบคุม MT516 และ MT526 ตามลำดับ และตัวควบคุมลบ



รูปที่ 12 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.12 0.10 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.16 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน IS1081 ความเข้มข้น 0.16 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

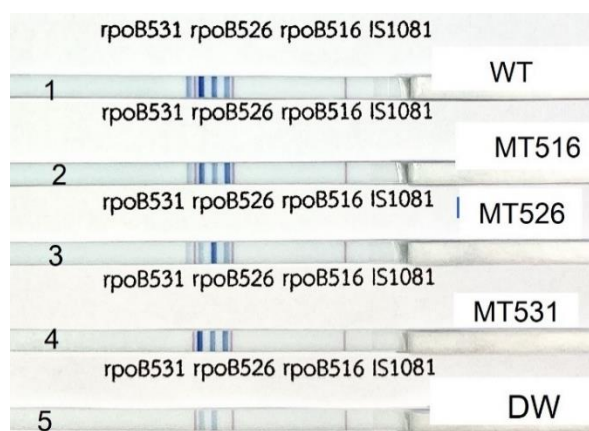
3.2.3 Primer ชุดที่ 3

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 3 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.10 0.08 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17

μ M Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ ยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μ M เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 13)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *rpoB516* และ *rpoB526*

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาลดความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *rpoB526* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* และ *rpoB526* ที่กลายพันธุ์ในตัวควบคุม MT516 และ MT526 ตามลำดับ และตัวควบคุมลบ



รูปที่ 13 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 3

ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.10 0.08 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.4 Primer ชุดที่ 4

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 4 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.08 0.06 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 14)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่

พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง ยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* (แถบจาง) *rpoB516* และ *rpoB526*

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *rpoB526* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* และ *rpoB526* ที่กลายพันธุ์ในตัวควบคุม MT516 และ MT526 ตามลำดับ และตัวควบคุมลบ



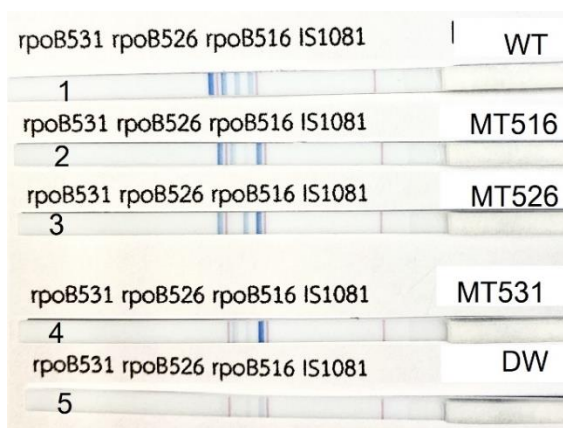
รูปที่ 14 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 4 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.08 0.06 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.5 Primer ชุดที่ 5

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 5 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04, 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 15)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาผลความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *IS1081* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* ที่กลายพันธุ์ และ *IS1081* ในตัวควบคุม MT516 และตัวควบคุมลบ



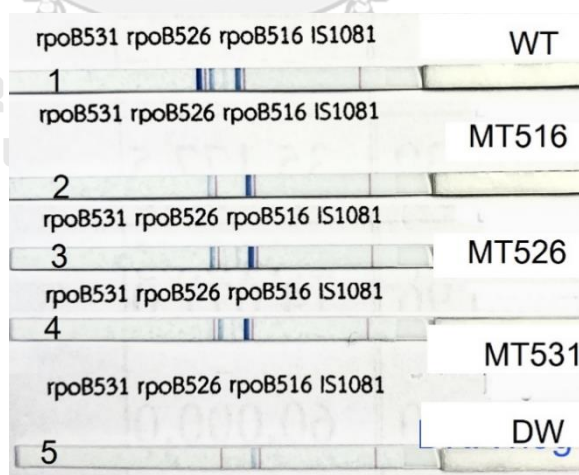
รูปที่ 15 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 5 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.16 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.6 Primer ชุดที่ 6

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 6 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.03 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.12 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 16)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ *rpoB516* primer เพื่อเพิ่มความเข้มของแถบผลผลิตยีนดังกล่าว และลดความเข้มข้นของ *rpoB526* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB526* ที่กลายพันธุ์ ในตัวควบคุม MT526



รูปที่ 16 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 6 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516*, 526 และ 531 เท่ากับ 0.03 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse

primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

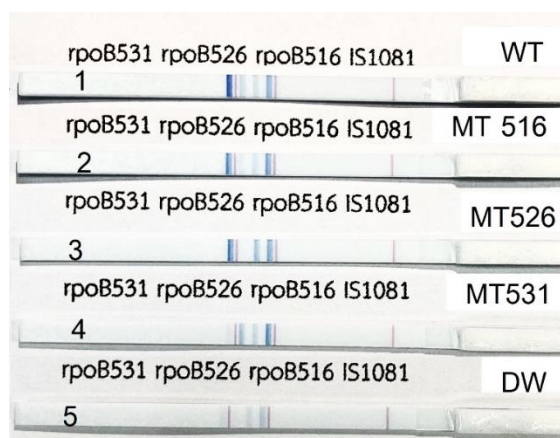
3.2.7 Primer ชุดที่ 7

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 7 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 17)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 และ *rpoB*531 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 526 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531 (แถบจาง)

- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 และ *rpoB*531 (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาลดความเข้มข้นของ IS1081 primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของ IS1081 ในตัวควบคุมลบ



รูปที่ 17 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 7 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB*516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.10 μ M ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μ M Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.12 μ M บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

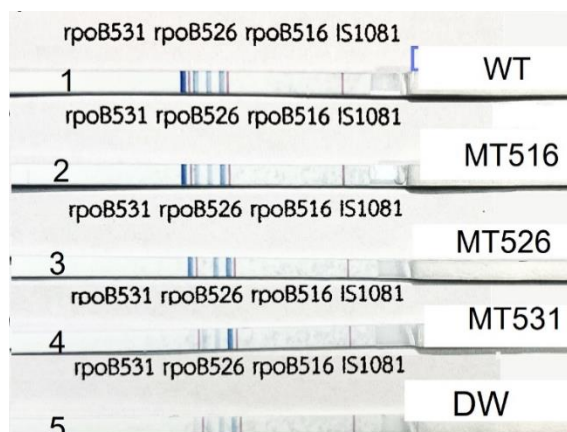
3.2.8 Primer ชุดที่ 8

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 8 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ

0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.10 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 18)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ *rpoB516* primer *rpoB526* primer และ *IS1081* primer ปรับให้ความเข้มข้น Primer ดังกล่าวสมดุลในปฏิกิริยา เนื่องจากพบว่า หาก Primer บางเส้นมีความเข้มข้นน้อยเกินไป อาจส่งผลให้ Primer คู่อื่นเกิดผลพลวกปลอมได้



รูปที่ 18 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 8 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.10 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

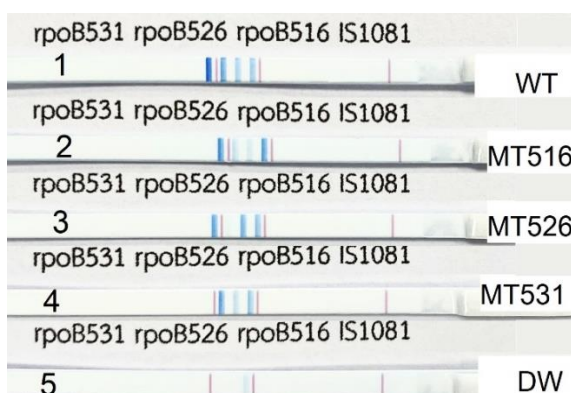
3.2.9 Primer ชุดที่ 9

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 9 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516, 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.14 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 19)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาลดความเข้มข้นของ *rpoB516* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* ที่กลายพันธุ์ในตัวควบคุม MT516 พร้อมกับเพิ่มความเข้มข้นของ IS1081 primer และลดความเข้มข้น *rpoB526* primer ลง เพื่อปรับให้ความเข้มข้น Primer ให้สมดุลในปฏิกิริยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 19 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 9

ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.14 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

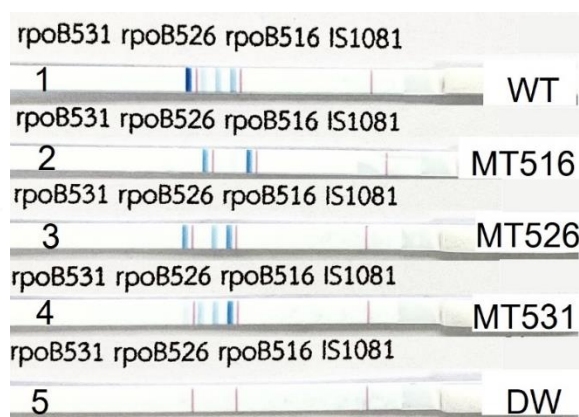
3.2.10 Primer ชุดที่ 10

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 20)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 *rpoB*516 และ *rpoB*531 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB*526 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531 (แถบจาง)

- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาความเข้มข้นของ *rpoB531* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ในตัวควบคุม MT531



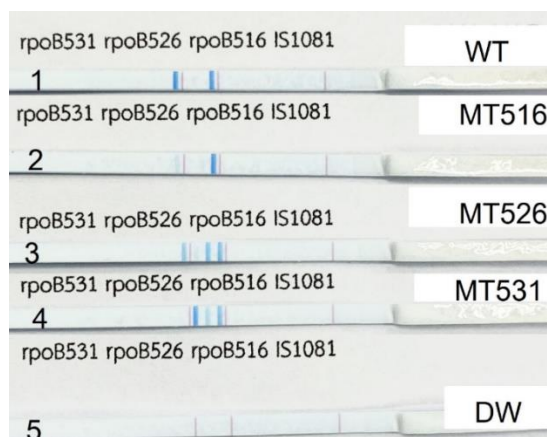
รูปที่ 20 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 10 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.11 Primer ชุดที่ 11

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 11 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.08 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 21)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* และ ยีน *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ *IS1081* ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ *rpoB526* primer และ *rpoB531* primer เพื่อเพิ่มความเข้มของแถบผลผลิตยีนดังกล่าว



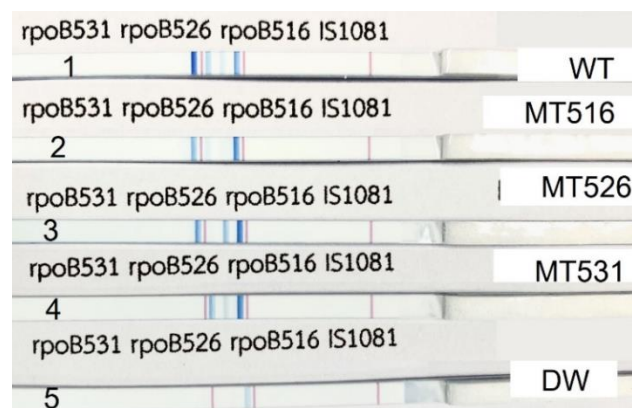
รูปที่ 21 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 11 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.04 และ 0.08 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.12 Primer ชุดที่ 12

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 12 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 22)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาลดความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *rpoB526* primer ลง เพื่อลดผลบวกปลอมของ Primer ดังกล่าว เนื่องจากยังคงพบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* primer ในตัวควบคุมลบ และ ยีน *rpoB526* ที่กลายพันธุ์ในตัวควบคุม MT526



รูปที่ 22 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 12

ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.04 0.05 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

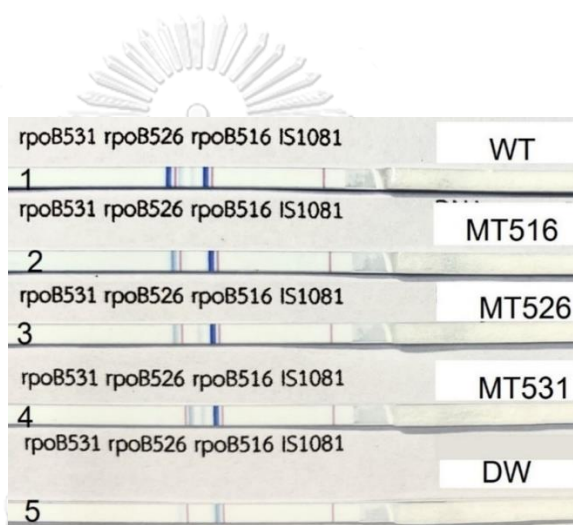
3.2.13 Primer ชุดที่ 13

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 13 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.03 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 23)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB*516 (แถบจาง) และ *rpoB*531 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB*526 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* และ *rpoB531* (แถบจาง)

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงพิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของ *rpoB516* primer และ *rpoB526* primer ขึ้น เพื่อเพิ่มความเข้มของแถบผลผลิตยีนดังกล่าว และเพื่อปรับให้ความเข้มข้น Primer ให้สมดุลในปฏิกิริยา



รูปที่ 23 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 13 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.03 0.04 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.2.14 Primer ชุดที่ 14

ผลของปฏิกิริยา MAS-RPA ที่เกิดจากการใช้ Primer ชุดที่ 14 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM เมื่อตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ได้ผลดังนี้ (รูปที่ 24)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) *rpoB*526 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531 (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB*516 (แถบจาง)

ดังนั้นจึงพิจารณาใช้ความเข้มข้นของ Primer ชุดที่ 14 เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก ในขณะที่เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์ พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน แต่ยังคงพบแถบผลผลิตของยีนที่กลายพันธุ์มีลักษณะจาง และตัวควบคุมลบยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมมีลักษณะจาง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะในขั้นตอนต่อไปเพื่อกำจัดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมดังกล่าว



รูปที่ 24 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA เมื่อใช้ Primer ชุดที่ 14 ซึ่งมีความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 ผลการทดสอบหาระยะเวลาบ่มที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ *IS1081* ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 20 25 30 และ 35 นาที และตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography โดยเจือจางผลผลิต MAS-RPA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μ l และผสมกับ Dipstick modified developing buffer ความเข้มข้น 300 mM ปริมาตร 10 μ l จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที พบว่า

ที่ระยะเวลา 20 นาที (รูปที่ 25ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 ไม่พบแถบผลผลิต
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ที่ระยะเวลา 25 นาที (รูปที่ 25ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่

พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*

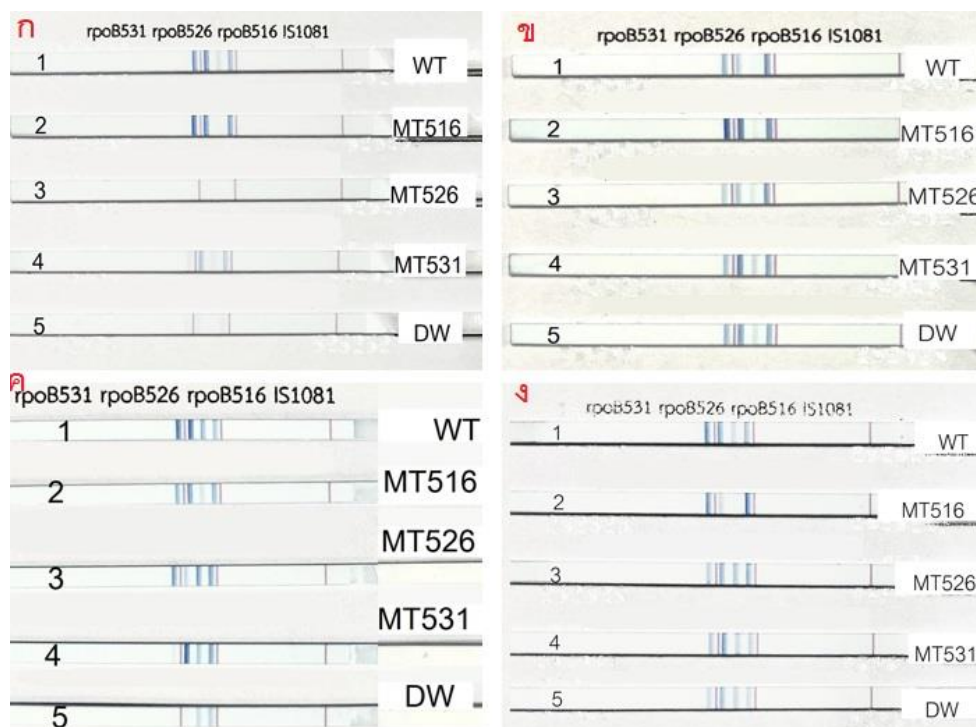
ที่ระยะเวลา 30 นาที (รูปที่ 25ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ระยะเวลา 35 นาที (รูปที่ 25ง)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)

ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาที่ 30 นาที เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก ในขณะที่เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์ พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน แต่ยังคงพบแถบผลผลิตของยีนที่กลายพันธุ์มีลักษณะจาง และตัวควบคุมลบยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมมีลักษณะจาง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะในขั้นตอนต่อไปเพื่อกำจัดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมดังกล่าว



รูปที่ 25 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ
ระยะเวลาปฏิกิริยา
ที่ (ก) 20 นาที (ข) 25 นาที และ (ค) 30 นาที และ (ง) 35 นาที โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะ
ต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ
M. tuberculosis ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน
ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลาย
พันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจาก
เชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.4 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Dipstick modified developing buffer ในการตรวจสอบผลผลิต ด้วย Dipstick chromatography

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์

มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นำผลผลิต MAS-RPA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ

10 μ l และผสมกับ Dipstick modified developing buffer โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ความเข้มข้นชุดแรก

ได้แก่ 0 150 และ 300 mM และความเข้มข้นชุดที่ 2 ได้แก่ 160 180 200 220 240 260 และ 280 mM จากนั้นผสม Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ที่ความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer ชุดแรก พบว่า

ที่ความเข้มข้น 0 mM (รูปที่ 26ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB 531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB531* (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081

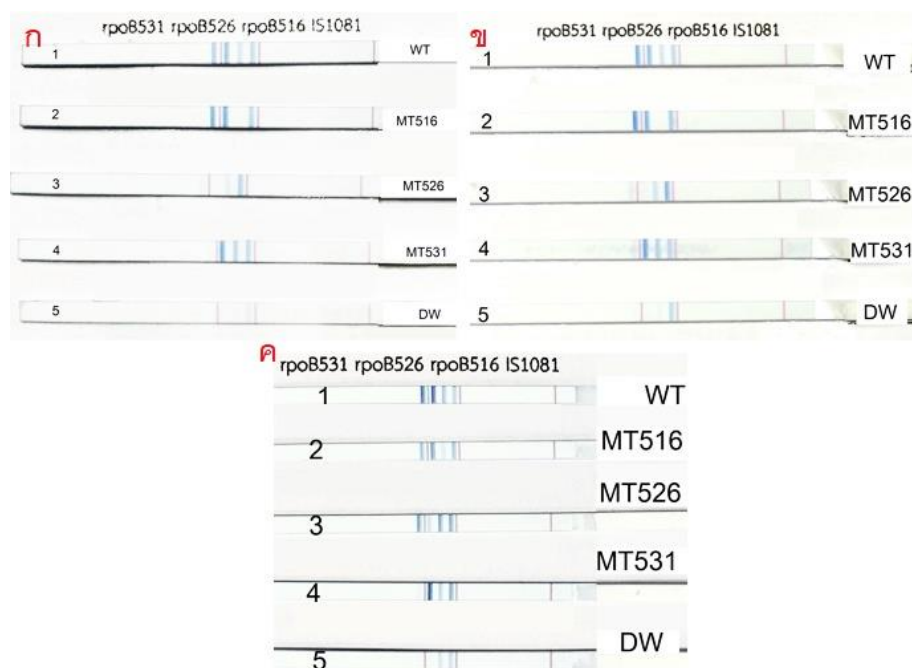
ที่ความเข้มข้น 150 mM (รูปที่ 26ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 300 mM (รูปที่ 26ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37RV พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB516*



รูปที่ 26 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 0 150 และ 300 mM (26ก ถึง 26ค ตามลำดับ) โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของ IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

จึงทำการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อ โดยใช้ความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer ชุดที่ 2 พบว่า

ที่ความเข้มข้น 160 mM (รูปที่ 27ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 516 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 180 mM (รูปที่ 27ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 200 mM (รูปที่ 27ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 220 mM (รูปที่ 27ง)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 240 mM (รูปที่ 27จ)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 260 mM (รูปที่ 27ฉ)

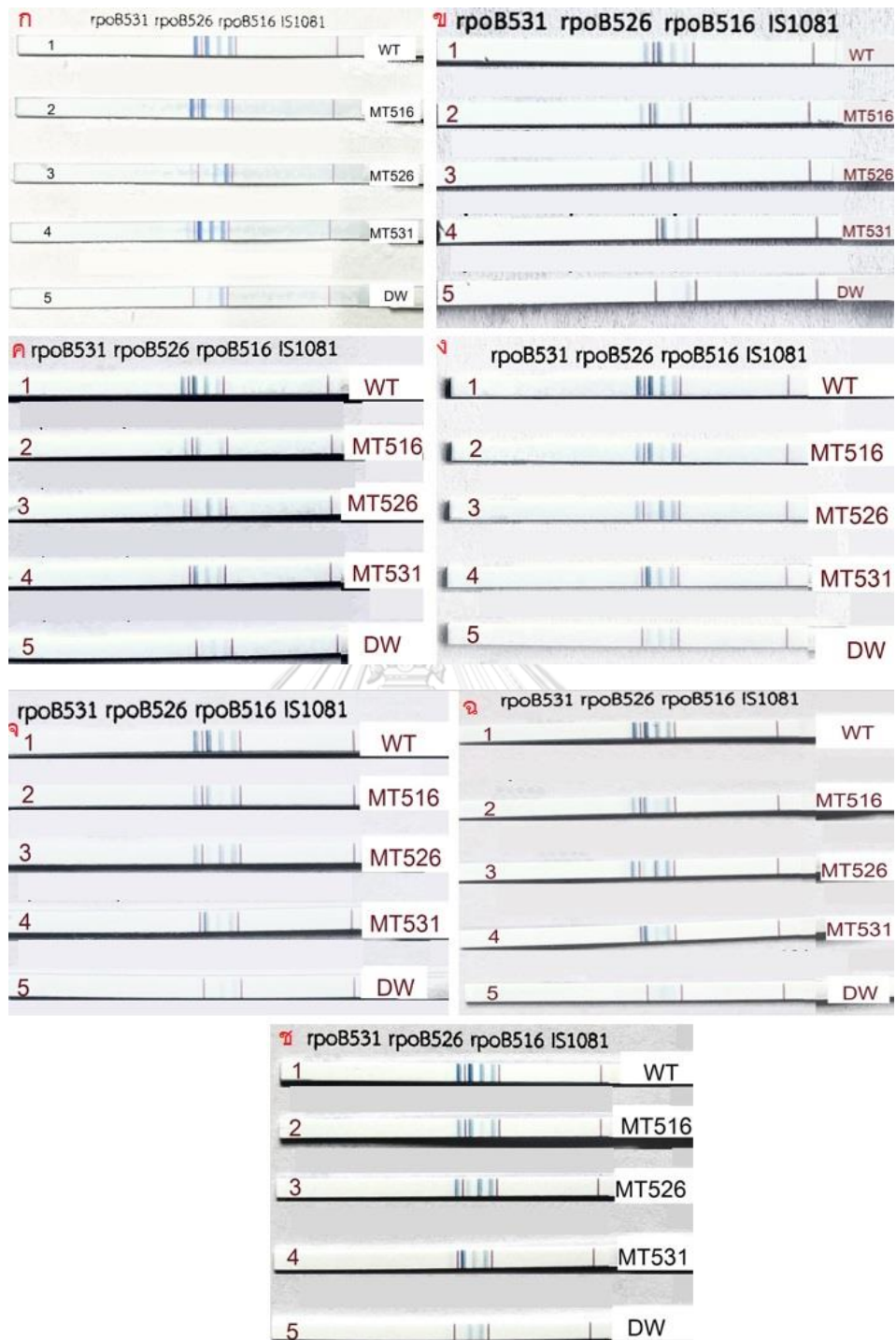
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ที่ความเข้มข้น 280 mM (รูปที่ 27ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง)
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) และ ยีน *rpoB516* (แถบจาง)

ดังนั้นจึงเลือกใช้ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก ในขณะที่เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์ พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* และ *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ยกเว้นเฉพาะตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 และตัวควบคุมลบ ที่ยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมมีลักษณะจาง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะในขั้นตอนต่อไปเพื่อกำจัดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมดังกล่าว



รูปที่ 27 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 160 180 200 220 240 260 และ 280 mM

(รูปที่ 27ก ถึง 27ข ตามลำดับ) โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของ IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ rpoB516 rpoB526 และ rpoB531 เป็นแถบที่จำเพาะ

ต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.5 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ Streptavidin-coated blue latex beads ในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผลผลิต MAS-RPA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 10 μl ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่า

ที่ Streptavidin-coated blue latex beads 0.2 μl (รูปที่ 28ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) *rpoB*526 และ *rpoB*531

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531* (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่ Streptavidin-coated blue latex beads 0.4 μ m (รูปที่ 28ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่ Streptavidin-coated blue latex beads 0.6 μ l (รูปที่ 28ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 516 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531* (แถบจาง)
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่ Streptavidin-coated blue latex beads 0.8 μ l (รูปที่ 28ง)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

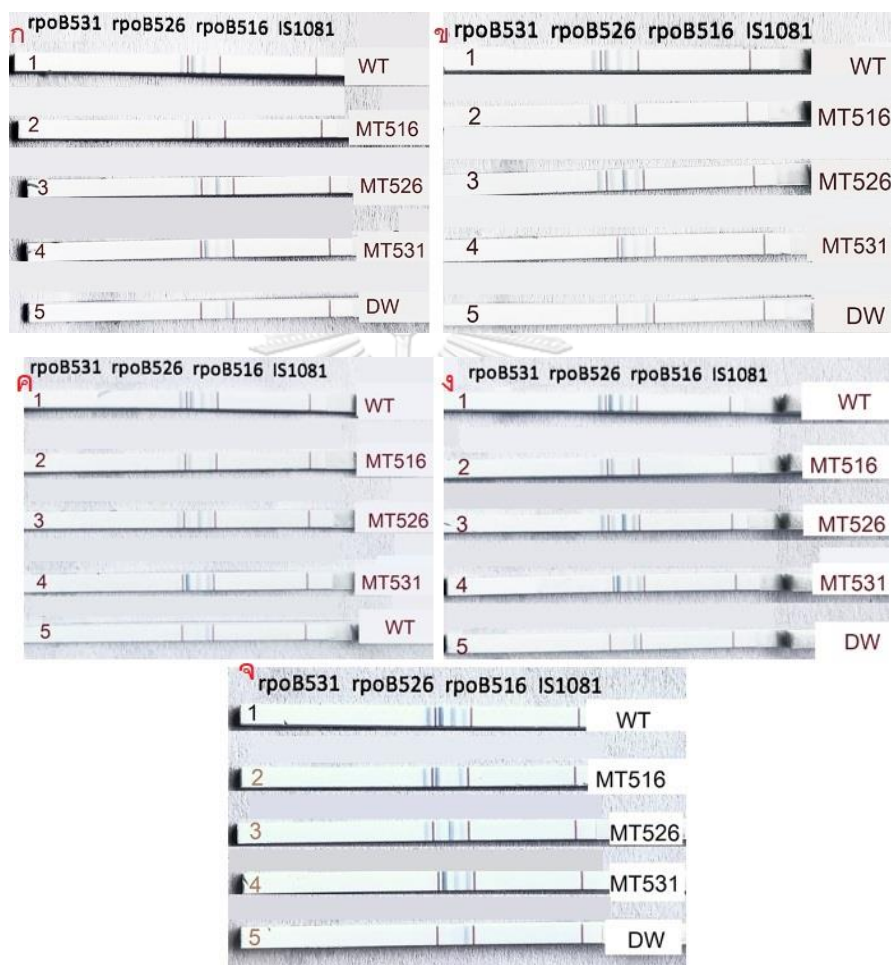
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l (รูปที่ 28จ)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 516 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 *rpoB516* *rpoB526* (แถบจาง) และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ดังนั้นจึงเลือกใช้ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ l เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก ในขณะที่เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์ พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516*

และ *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ยกเว้นเฉพาะตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 และตัวควบคุมลบ ที่ยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมมีลักษณะจาง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะในขั้นตอนต่อไปเพื่อกำจัดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมดังกล่าว



รูปที่ 28 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM กับ Streptavidin-coated blue latex beads

ปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 μ l (รูปที่ 28ก ถึง 28จ ตามลำดับ) โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลาย

พันธุของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.6 ผลการทดสอบหาอัตราส่วนการเจือจางในการตรวจสอบผลผลิตที่เหมาะสมจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำผลผลิต MAS-RPA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:4 1:9 1:11 1:12 1:13 และ 1:14 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM ปริมาตร 10 μL จากนั้นผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตร 1 μL ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่า

ที่อัตราส่วนเจือจาง 1:4 และ 1:9 (รูปที่ 29ก และ 29ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*526 และ *rpoB*531 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB*516 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 (แถบจาง) และ *rpoB*531

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง)

ที่อัตราส่วนเจือจาง 1:11 (รูปที่ 29ค)

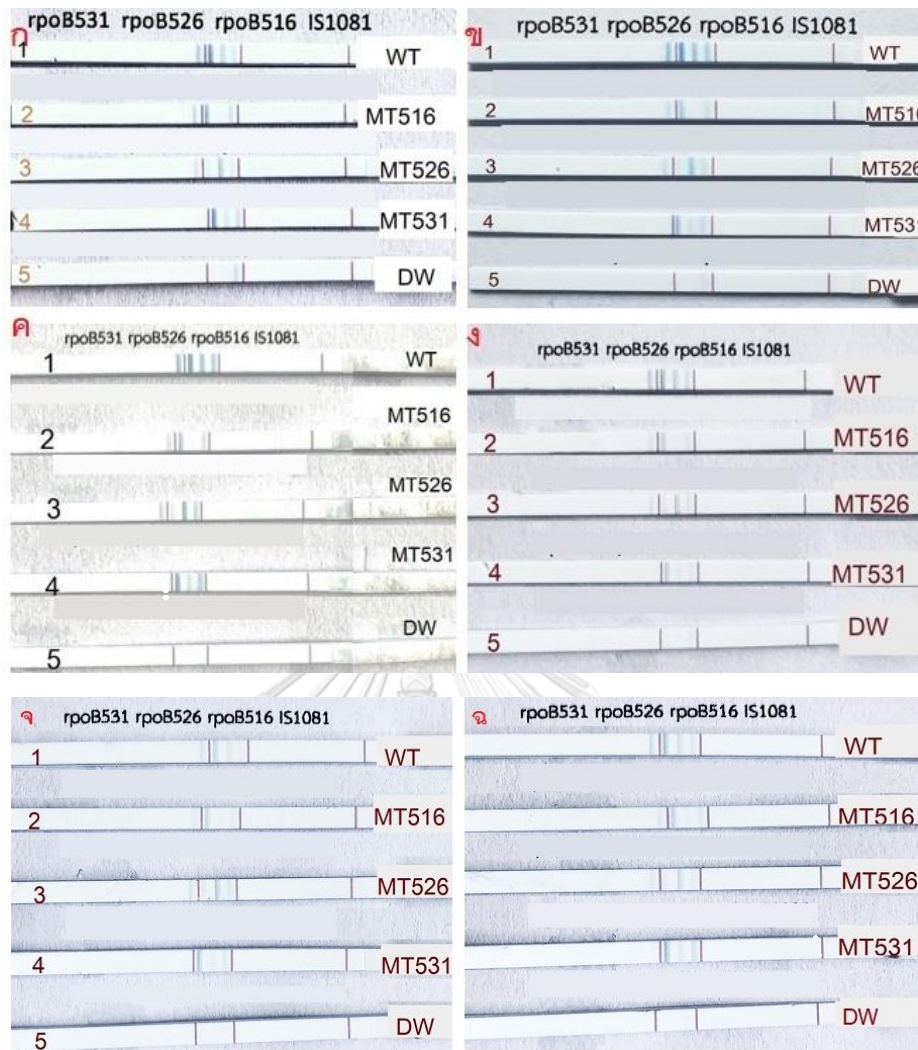
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB 516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ที่อัตราส่วนเจือจาง 1:12 1:13 และ 1:14 (รูปที่ 29ง ถึง 29ฉ)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 (แถบจาง) ยีน *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ดังนั้นจึงเลือกใช้ อัตราส่วนเจือจาง 1:11 เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบชัดเจนทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก ในขณะที่เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์ พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* และ *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ยกเว้นเฉพาะตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 และตัวควบคุมลบ ที่ยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมมีลักษณะจาง ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการปรับสภาวะในขั้นตอนต่อไป เพื่อกำจัดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมดังกล่าว



รูปที่ 29 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อเจือจาง

ผลผลิต MAS-RPA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ในอัตราส่วน 1:4 1:9 1:11 1:12 1:13 และ 1:14 (รูปที่ 29ก ถึงรูปที่ 29จ) ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM กับ Streptavidin-coated blue latex beads ปริมาตร 1 μ โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของ IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ rpoB516 rpoB526 และ rpoB531 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน rpoB ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน rpoB ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.7 ผลการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB* 516 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของ IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 37 และ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำผลผลิต MAS-RPA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:11 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM ปริมาตร 10 μl จากนั้นผสมกับ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตร 1 μl ผสมให้เข้ากัน นำแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography จุ่มลงในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องภายในระยะเวลา 15 นาที เมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography พบว่า

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 30ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 *rpoB*526 และ *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 และ ยีน *rpoB*526 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB* 516 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว และที่ตำแหน่งยีน *rpoB*531
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 และ *rpoB*531 (แถบจาง) แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB*526 ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB*516 (แถบจาง) และ

rpoB526 แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตใดๆ

ที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 30ข)

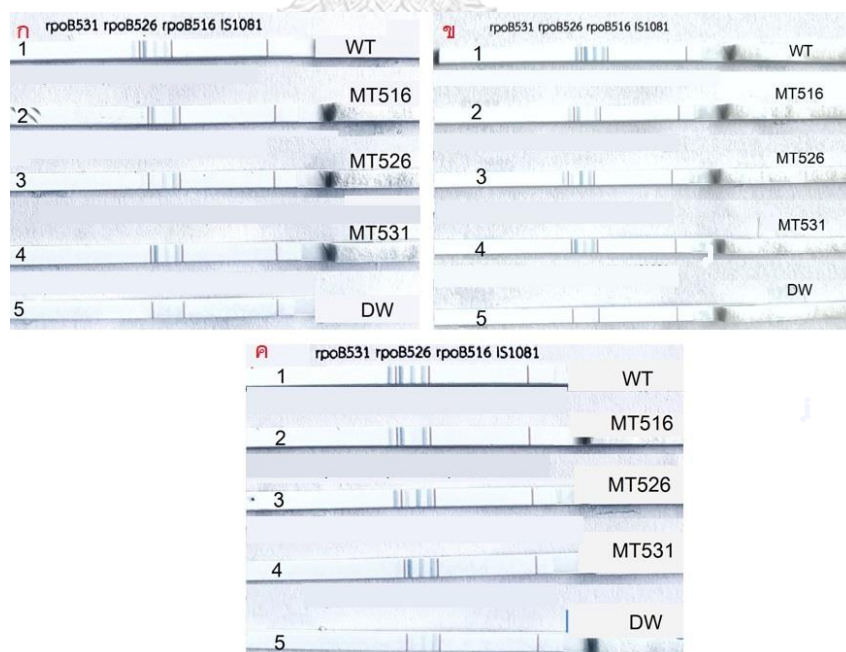
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ IS1081 ยีน *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่งยีน *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ที่อุณหภูมิต่ำ 39 องศาเซลเซียส (รูปที่ 30ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* (แถบจาง)

ดังนั้นจึงเลือกใช้แอนติบอดีในการบ่งปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบชัดเจนทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ในขณะที่ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตเกิดขึ้น



รูปที่ 30 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิในการบ่งปฏิกิริยา

(ก) 35 องศาเซลเซียส (ข) 37 องศาเซลเซียส และ (ค) 39 องศาเซลเซียส โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของ IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.8 ผลการทดสอบระยะเวลาในการจุ่มแผ่นทดสอบที่เหมาะสมในการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography

ภายหลังได้ความเข้มข้น DNA ต้นแบบเท่ากับ 40 ng และความเข้มข้นของ Tag-linker sequence forward primer ของยีน *rpoB516* 526 และ 531 เท่ากับ 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน *rpoB* ความเข้มข้น 0.17 μM Tag-linker sequence forward primer และ Tag-linker sequence reverse primer ของยีน IS1081 ความเข้มข้น 0.15 μM ตามลำดับ นำ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก และเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 ทำปฏิกิริยา MAS-RPA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำผลผลิต MAS-RPA มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:11 ผสมกับ Dipstick modified developing buffer ที่ความเข้มข้น 180 mM ปริมาตร 10 μL และ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ปริมาตร 1 μL เมื่อตรวจสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography หลังจุ่มแผ่นทดสอบเป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 นาที พบว่า

ที่ระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบ 5 นาที (รูปที่ 31ก)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081 rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081 rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* (แถบจาง) *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ พบแถบผลผลิต 1 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* (แถบจาง)

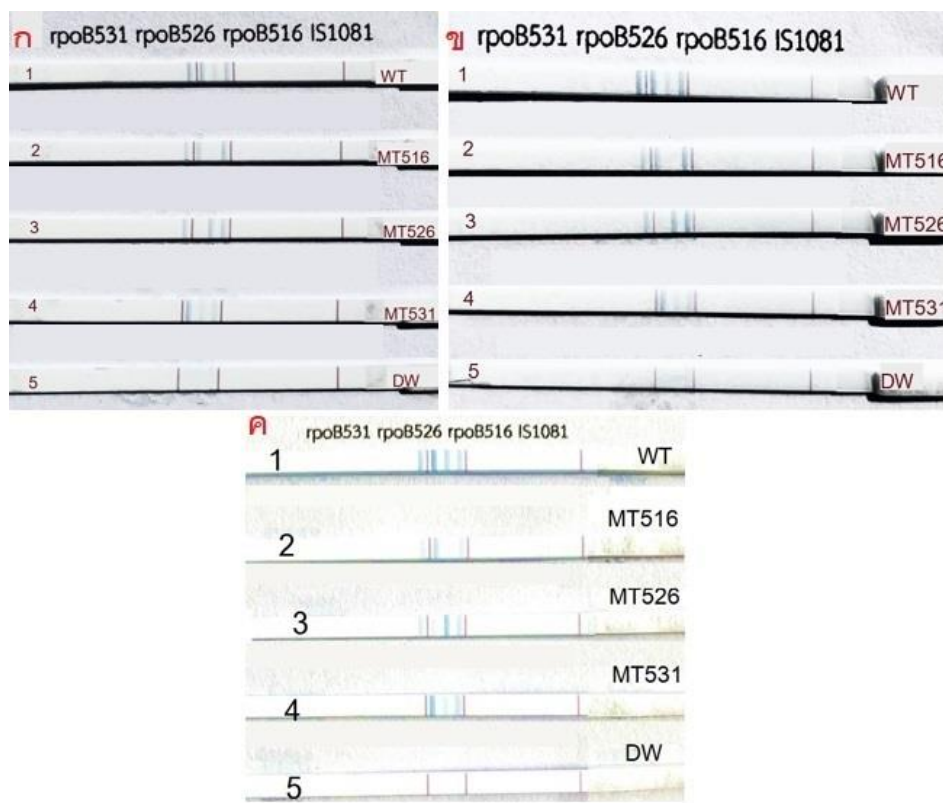
ที่ระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบ 10 นาที (รูปที่ 31ข)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081 rpoB516* (แถบจาง) *rpoB526* และ *rpoB531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081 rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081 rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* (แถบจาง) *rpoB516* (แถบจาง) และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ที่ระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบ 15 นาที (รูปที่ 31ค)

- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv พบแถบผลผลิต 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB 531*
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 516 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB526* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB516* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 526 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* และ *rpoB531* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB526* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่งโคดอน 531 พบแถบผลผลิต 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน IS1081 *rpoB516* และ *rpoB526* แต่ไม่พบแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง *rpoB531* ซึ่งบ่งบอกการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าว
- ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิต

ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาจุ่มแผ่นทดสอบ 15 นาที เนื่องจากพบแถบผลผลิตของยีนครบชัดเจนทั้ง 4 แถบในตัวควบคุมบวก เชื้อตัวแทนที่มีการการกลายพันธุ์พบแถบผลผลิตของยีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ครบถูกต้องทุกยีน และไม่พบแถบผลผลิตของยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ที่กลายพันธุ์ ในขณะที่ตัวควบคุมลบ ไม่พบแถบผลผลิตเกิดขึ้น



รูปที่ 31 การตรวจสอบผลผลิต MAS-RPA บนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เมื่อทดสอบ
หาระยะเวลาในการจุ่มแผ่นทดสอบ

ที่ (ก) 5 นาที (ข) 10 นาที และ (ค) 15 นาที โดยแถบ IS1081 เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน IS1081 ของเชื้อ *M. tuberculosis* และแถบ *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เป็นแถบที่จำเพาะต่อผลผลิตของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามลำดับ แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

3.9 สรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531* ของเชื้อ *M. tuberculosis*

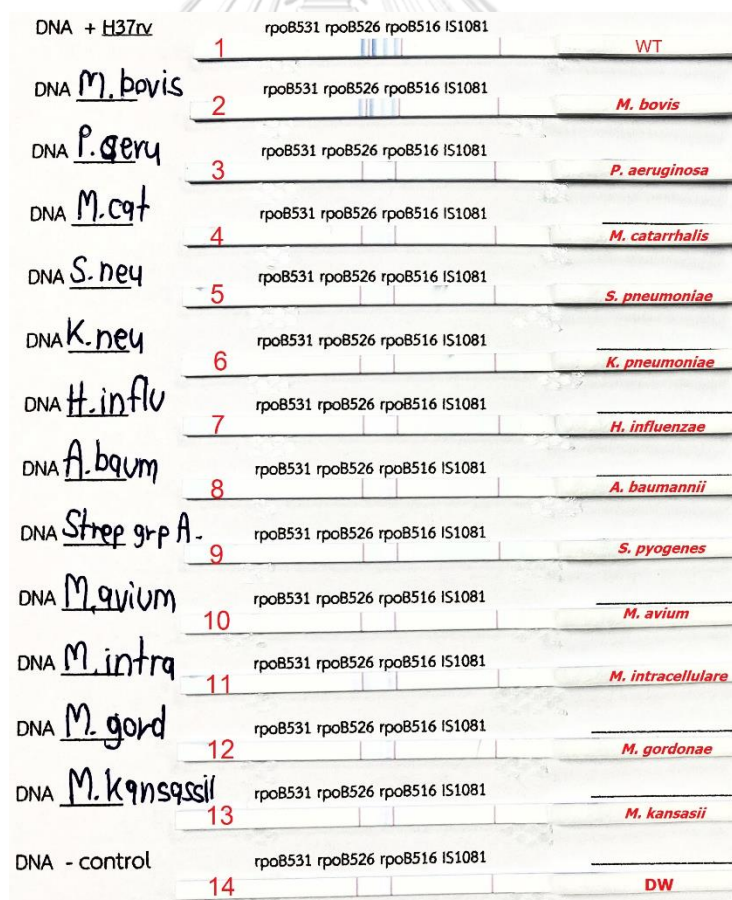
ภายหลังทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมตามขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้นของ DNA ความเข้มข้นของ Primer ระยะเวลาทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads อุณหภูมิการทำปฏิกิริยา สัดส่วนการเจือจางผลผลิต และเวลาการจุ่มแผ่นทดสอบ ได้ผลสรุปลักษณะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 สภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค MAS-RPA ร่วมกับแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography สำหรับวินิจฉัยเชื้อและการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531* ของเชื้อ *M. tuberculosis*

สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-RPA ร่วมกับทดสอบด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography	ยีน				
	IS1081 F และ IS1081 R	<i>rpoB516</i> F	<i>rpoB526</i> F	<i>rpoB531</i> F	<i>rpoB</i> R2
ความเข้มข้นของ Primer	0.15 μm	0.05 μm	0.07 μm	0.10 μm	0.17 μm
ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ	40 ng				
อุณหภูมิ ในการทำปฏิกิริยา MAS-RPA	37 °C				
ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา MAS-RPA	30 นาที				
ความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer	180 mM				
ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads	1 μl				
อัตราส่วนในการเจือจางผลผลิต	1:11				
ระยะเวลาการจุ่มสารกับแผ่นทดสอบ	15 นาที				

4. ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค MAS-RPA-DC

ทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC โดยใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่เชื้อ *M. tuberculosis* ได้แก่ *M. bovis* *P. aeruginosa* *M. cattarrhalis* *S. pneumoniae* *K. pneumoniae* *H. influenza* *A. baumannii* *S. pyogenes* *M. avium* *M. intracellulare* *M. gordonae* และ *M. kansasii* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 ng ปริมาตร 1 μ l มาทำปฏิกิริยา สังเกตแถบสีที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นทดสอบพบว่าที่แผ่นทดสอบควบคุมบวกมีการปรากฏของแถบผลผลิตครบทั้ง 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *IS1081* *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* และที่แผ่นทดสอบ DNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *M. tuberculosis* พบว่าไม่มีการปรากฏของแถบผลผลิตที่ตำแหน่งใดๆ ยกเว้นเชื้อ *M. bovis* ที่พบแถบผลผลิตครบทั้ง 4 ตำแหน่งเช่นเดียวกับที่พบในเชื้อ *M. tuberculosis* ในขณะที่ตัวควบคุมลบไม่พบแถบผลผลิตที่ใด รายละเอียดของผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 32



รูปที่ 32 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

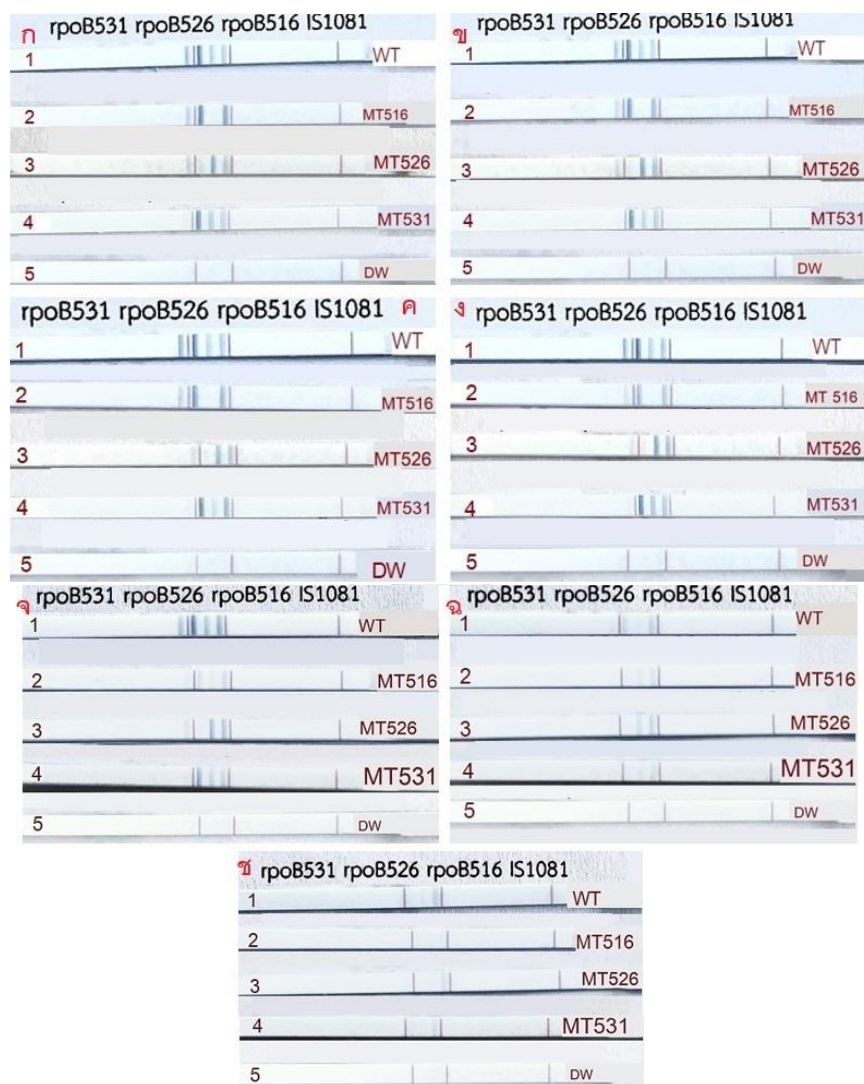
แถบที่ 1 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-13 คือ DNA ของเชื้อ *M. M. bovis* *P. aeruginosa* *M. cattarrhalis* *S. pneumoniae* *K. pneumonia* *H. influenza* *A. baumannii* *S. pyogenes* *M. avium* *M. intracellulare* *M. gordonae* และ *M. kansasii* ตามลำดับ แถบที่ 14 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

5. ผลการทดสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของดีเอ็นเอต้นแบบที่สามารถทดสอบได้ด้วยปฏิกิริยา MAS-RPA-DC (Limit of Detection; LOD)

ทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC โดยเจือจาง DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531* ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 30 20 10 1 0.1 0.01 และ 0.01 ng ปริมาตร 1 μ l พบว่ามีค่า LOD เมื่อวินิจฉัยด้วย IS1081 เท่ากับ 0.1 ng ในขณะที่ยีน *rpoB516* *rpoB526* และยีน *rpoB531* มีค่าเท่ากับ 1 ng (ตารางที่ 10) รายละเอียดของผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 33ก ถึง 33ข

ตารางที่ 10 ตารางแสดงรายละเอียดการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC เพื่อวินิจฉัย IS1081 ยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531*

ค่า LOD/ยีน	IS1081	<i>rpoB516</i>	<i>rpoB526</i>	<i>rpoB531</i>
MAS-RPA-DC	0.1 ng	1 ng	1 ng	1 ng



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 33 การตรวจสอบหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC โดยใช้ DNA ต้นแบบความเข้มข้น 40 30 20 10 1 0.1 และ 0.01 ng (รูปที่ 33ก ถึง 33ช ตามลำดับ) แถบที่ 1 คือ NA ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวก แถบที่ 2-4 คือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของ ยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามลำดับ แถบที่ 5 คือ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

6. ผลการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

นำ DNA ที่สกัดได้จากเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง มาทำการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC อ่านปฏิกิริยาของแถบต่างๆ ที่จำเพาะต่อแต่ละยีน ในการทดสอบแต่ละครั้งใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC H37Rv เป็นตัวควบคุมบวกของเชื้อสายปกติ และใช้ DNA ต้นแบบของเชื้อ *M. tuberculosis* ตัวแทนสายพันธุ์คลินิก 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับการยืนยันว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 หรือ 526 หรือ 531 เป็นตัวควบคุมบวกของเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ และใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ

พบว่า การตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC สามารถตรวจพบแถบ IS1081 ได้ครบทั้งหมด 141 ตัวอย่าง การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB*516 สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ (ไม่พบแถบยีน *rpoB*516 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 15 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (พบแถบยีน *rpoB*516 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 126 ตัวอย่าง การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB*526 สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ (ไม่พบแถบยีน *rpoB*526 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 17 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (พบแถบยีน *rpoB*526 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 124 ตัวอย่าง การตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB*531 สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ (ไม่พบแถบยีน *rpoB*531 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 57 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (พบแถบยีน *rpoB*531 บนแผ่นทดสอบ) จำนวน 84 ตัวอย่าง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สรุปการตรวจพบ IS1081 และการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

เทคนิคที่ใช้ ในการ ตรวจสอบ	การวินิจฉัยเชื้อ <i>M. tuberculosis</i>		การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ที่ตำแหน่งโคดอน516		การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ที่ตำแหน่งโคดอน526		การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ที่ตำแหน่งโคดอน531	
	พบเชื้อ (พบ แถบ IS1081)	ไม่พบเชื้อ (ไม่พบ แถบ IS1081)	กลายพันธุ์ (ไม่พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 516)	ไม่กลาย พันธุ์ (พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 516)	กลายพันธุ์ (ไม่พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 526)	ไม่กลาย พันธุ์ (พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 526)	กลายพันธุ์ (ไม่พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 531)	ไม่กลาย พันธุ์ (พบ แถบยีน <i>rpoB</i> 531)
MAS-RPA- DC	141	0	15	126	17	124	57	84
รวม	141		141		141		141	

เมื่อวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC สามารถตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* อย่างน้อย ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของโคดอน 516 526 หรือ 531 ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ได้ทั้งหมด 71 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *rpoB*516 จำนวน 10 ตัวอย่าง ยีน *rpoB*526 จำนวน 14 ตัวอย่าง ยีน *rpoB*531 จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยไม่พบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *rpoB*516 ยีน *rpoB*526 และ ยีน *rpoB*531 ทั้งสองหรือสามตำแหน่งร่วมกัน ในขณะที่พบเชื้อจำนวน 54 ตัวอย่างเป็นเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ทั้งตำแหน่ง 516 526 และ 531 ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 สรุปผลการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 จำนวน 125 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC

เทคนิคที่ใช้ในการวินิจฉัย	การแปลผลการทดสอบ								ไม่สามารถแปลผลได้	รวม
	เชื้อ <i>M.tuberculosis</i> ที่มีการกลายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin									
	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB516</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB526</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB531</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB516</i> ร่วมกับ <i>rpoB526</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB516</i> ร่วมกับ <i>rpoB531</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB526</i> ร่วมกับ <i>rpoB531</i>	กลายพันธุ์ที่ยีน <i>rpoB516</i> ร่วมกับ <i>rpoB526</i> และ <i>rpoB531</i>	เชื้อที่ไม่พบการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB516</i> 526 หรือ 531		
MAS-RPA-DC	10	14	47	0	0	0	0	54	0	125

7. ผลการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa ของเทคนิค MAS-RPA-DC

เมื่อนำผลการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC เปรียบเทียบกับการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าทางสถิติ Kappa ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 141 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค DNA sequencing	ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนายผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผลลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
		จำนวนที่พบการกลายพันธุ์		จำนวนที่ไม่พบการกลายพันธุ์		
พบการกลายพันธุ์	9	6	100% (66.4-100)	95.5% (90.4-98.3)	60% (40.7-76.6)	100% (-)* (0.524-0.933)
ไม่พบการกลายพันธุ์	0	126				
		<i>rpoB516</i>				0.728
พบการกลายพันธุ์	14	3	70% (45.7-88.1)	97.5% (93-99.5)	82.4% (59.6-93.7)	95.2% (91-97.5) (0.548-0.893)
ไม่พบการกลายพันธุ์	6	118				
		<i>rpoB526</i>				0.956
พบการกลายพันธุ์	55	2	98.2% (90.5-100)	97.7% (91.8-99.7)	96.5% (87.5-99)	98.8% (92.3-99.8) (0.906-1.000)
ไม่พบการกลายพันธุ์	1	83				
		<i>rpoB531</i>				0.956

*หมายความว่า ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 13 เมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ผลบวกปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 100% (95% CI : 66.4-100) ความจำเพาะเท่ากับ 95.5% (95% CI : 90.4-98.3) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 60% (95% CI : 40.7-76.6) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% (95% CI :-) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.728 (95% CI : 0.524-0.933)

การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 526 พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ผลบวกปลอม 3 ตัวอย่าง และให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 70% (95% CI : 45.7-88.1) ความจำเพาะเท่ากับ 97.5% (95% CI : 93-99.5) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 82.4%

(95% CI : 59.6-93.7) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 95.2% (95% CI : 91-97.5) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.720 (95% CI : 0.548-0.893)

การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 531 พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ผลบวกปลอม 2 ตัวอย่าง และให้ผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 98.2% (95% CI : 90.5-100) ความจำเพาะเท่ากับ 97.7% (95% CI : 91.8-99.7) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 96.5% (95% CI : 87.5-99) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.8% (95% CI : 92.3-99.8) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.956 (95% CI : 0.906-1.000)

เมื่อพิจารณาค่าความสอดคล้องทางสถิติ Kappa ของการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนต่างๆ ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC และเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่าการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 และ 526 มีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีทั้งคู่ (สถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.61-0.80) ในขณะที่การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 531 มีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีมาก (สถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.81-1.00)

ภายหลังจากผลการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ/หรือ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC ในตัวอย่างจำนวน 125 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อที่มีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของเทคนิค MAS-RPA-DC กับเทคนิค BACTEC MGIT 960 พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าทางสถิติ Kappa ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960

ผลการทดสอบด้วย MAS-RPA-DC	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย ผลบวก (95% CI)	ค่าทำนายผล ลบ (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	จำนวนที่พบการติดต่อยา Rifampicin	จำนวนที่พบการไวต่อยา Rifampicin					
พบการกลายพันธุ์ของ <i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526 และ/หรือ <i>rpoB</i> 531	71	0	79.78% (69.9-87.6)	100% (90.3-100)	100% (-)*	66.67% (57-75.1)	0.694 (0.57-0.819)
ไม่พบการกลายพันธุ์ ของ <i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526 และ/หรือ <i>rpoB</i> 531	18	36					

*หมายความว่า ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 14 เมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ/หรือ 531 พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ผลลบปลอม 18 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 79.78% (95% CI : 69.9-87.6 %) ความจำเพาะเท่ากับ 100% (95% CI : 90.3-100) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI : -) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 66.67% (95% CI : 57-75.1%) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.694 (95% CI : 0.57-0.819) ซึ่งให้ผลความสอดคล้องของทั้งสองเทคนิคอยู่ในระดับดี (สถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.61-0.80)

เมื่อพิจารณาเฉพาะตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 และมีการกลายพันธุ์เฉพาะในตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 พบว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 108 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของเทคนิค MAS-RPA-DC กับเทคนิค BACTEC MGIT 960 พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าทางสถิติ Kappa ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของเทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นเพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 108 ตัวอย่าง ซึ่งมีการกลายพันธุ์เฉพาะในตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960

ผลการทดสอบด้วย MAS-RPA-DC	ผลการทดสอบด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960		ความไว (95% CI)	ความจำเพาะ (95% CI)	ค่าทำนาย (ทำนาย ผลบวก) (95% CI)	ค่าทำนาย (ทำนาย ผลลบ) (95% CI)	ค่าสถิติ Kappa (95% CI)
	จำนวนที่พบการติดเชื้อต่อยา Rifampicin	จำนวนที่พบการไวต่อยา Rifampicin					
พบการกลายพันธุ์ของ <i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526 และ/หรือ <i>rpoB</i> 531	69	0	93.24% (84.9-97.8)	100% (89.7-100)	100% (-)*	87.18% (74.5-94)	0.897 (0.809-0.985)
ไม่พบการกลายพันธุ์ของ <i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526 และ/หรือ <i>rpoB</i> 531	5	34					

จากตารางที่ 15 เมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ/หรือ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* เฉพาะในตัวอย่างที่มีพบการกลายพันธุ์ของโคดอน 516 526 และ 531 ซึ่งเป็นตำแหน่งโคดอนที่เป็นเป้าหมายของ Primer ที่ใช้ในการศึกษานี้ พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ผลลบปลอมลดลงเหลือเพียง 5 ตัวอย่าง ส่งผลให้มีค่าความไวเท่ากับ 93.24% (95% CI : 84.9-97.8 %) ความจำเพาะเท่ากับ 100% (95% CI : 89.7-100) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% (95% CI : -) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 87.18% (95% CI : 74.5-94%) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.897 (95% CI : 0.809-0.985) ซึ่งให้ผลความสอดคล้องของทั้งสองเทคนิคอยู่ในระดับดีมาก (สถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.81-1.00)

และเมื่อนำผลการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ/หรือ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค Sanger DNA sequencing ในตัวอย่างจำนวน 125 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อที่มีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบของเทคนิค Sanger DNA sequencing กับเทคนิค

BACTEC MGIT 960 พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าทางสถิติ Kappa ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ของเทคนิค Sanger DNA sequencing ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 125 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960

ผลการทดสอบด้วยเทคนิค	ผลการทดสอบด้วย		ความไว	ความจำเพาะ	ค่าทำนาย	ค่า	ค่าสถิติ
DNA sequencing	เทคนิค BACTEC MGIT 960		(95%	(95% CI)	ผลบวก	ทำนาย	Kappa
	จำนวนที่พบการ	จำนวนที่พบการ	CI)		(95% CI)	ผลลบ	(95% CI)
	ต่อต่อยา	ไวต่อยา				(95%	
	Rifampicin	Rifampicin				CI)	
			93.26%	94.44%	97.65%	85%	0.849
พบการกลายพันธุ์ของ	83	2	(85.9-	(81.3-99.3)	(91.5-	(72.3-	(0.748-
<i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526			97.5)		99.4)	92.5)	0.95)
และ/หรือ <i>rpoB</i> 531							
ไม่พบการกลายพันธุ์ของ	6	34					
<i>rpoB</i> 516 <i>rpoB</i> 526							
และ/หรือ <i>rpoB</i> 531							

*หมายความว่า ไม่สามารถคำนวณได้

จากตารางที่ 16 เมื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ/หรือ 531 พบว่าเทคนิค Sanger DNA sequencing ให้ผลบวกปลอม 2 ตัวอย่าง และให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง โดยมีค่าความไวเท่ากับ 93.26% (95% CI : 85.9-97.5) ความจำเพาะเท่ากับ 94.44% (95% CI : 81.3-99.3) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 97.65% (95% CI : 91.5-99.4) ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 85% (95% CI : 72.3-92.5) และค่าความสอดคล้องจากสถิติ Kappa เท่ากับ 0.849 (95% CI : 0.748-0.95) ซึ่งให้ผลความสอดคล้องของทั้งสองเทคนิคอยู่ในระดับดีมาก (สถิติ Kappa อยู่ในช่วง 0.81-1.00)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

สถานการณ์การแพร่ระบาดของวัณโรคเป็นหนึ่งในปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก และเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน โดยในรายงานการประชุมเกี่ยวกับวัณโรคของ WHO ประจำปี พ.ศ.2563 ระบุว่าในปี พ.ศ.2562 มีประชากรจากทั่วโลกถึง 10 ล้านคนติดเชื้อวัณโรค ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศที่มีอัตราผู้ติดเชื้อวัณโรคสูงที่สุดประมาณ 105,000 คน และเป็น 1 ใน 30 ประเทศที่มีอัตราผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ในปี พ.ศ.2562 สูงที่สุดโดยอยู่ที่ประมาณ 2,500 คน ซึ่งหากดูจากแนวโน้มตั้งแต่ปี พ.ศ.2543 จนถึงปี พ.ศ.2562 แม้ประเทศไทยจะมีจำนวนผู้ติดเชื้อและผู้เสียชีวิตจากวัณโรคลดลงก็ตาม แต่จำนวนผู้ป่วยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานในภาพรวมของประเทศยังคงสูง ทำให้วัณโรคยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญและจำเป็นต้องเร่งมือในการกำจัดให้หมดไป การแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนานเกิดจากสองสาเหตุสำคัญ ได้แก่ การแพร่กระจายของโรคโดยการสัมผัสกันจากผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และการที่ผู้ป่วยวัณโรคมีการพัฒนาไปเป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานในภายหลัง เนื่องมาจากได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคที่ไม่เหมาะสม หรือขาดการรักษาอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพจะทำให้สามารถควบคุมการแพร่กระจายของวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้

การศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยา M-RPA ภายใต้อุณหภูมิคงที่ ร่วมกับ AS Primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์แบบตำแหน่งเดียวของยีน *rpoB* ณ ตำแหน่งโคดอนที่พบได้บ่อยสุดสามอันดับแรก ได้แก่ โคดอน 516 526 และ 531 ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* และใช้ แผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ในการตรวจวัดผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยาต้านเชื้อวัณโรคชนิด Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ DNA ซึ่งสกัดแยกได้จากสิ่งส่งตรวจเหลือใช้จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง แบ่งเป็นส่วนแรกคือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีไอน์ไพ่จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค BACTEC™ MGIT 960 จำนวน 125 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่ามีความไวต่อยา Rifampicin จำนวน

36 ตัวอย่าง และเชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin มีจำนวน 89 ตัวอย่าง และส่วนที่สองคือ DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไม่มีผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์จำนวน 16 ตัวอย่าง เนื่องจากไม่ได้รับอนุญาตให้เปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin ทั้งหมด 89 ตัวอย่าง สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของการดื้อยาได้ 3 ระดับ ได้แก่ 1. เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin เพียงชนิดเดียว พบ 6.74% 2. เชื้อที่ดื้อต่อยาด้านเชื้อวัณโรคหลายขนาน หรือ MDR-TB พบทั้งสิ้น 77.53% และ 3. เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาด้านเชื้อวัณโรคหลายขนานชนิดรุนแรงมาก หรือ XDR-TB พบ 15.73% ทั้งนี้ข้อมูลความไวต่อยา Rifampicin และระดับความรุนแรงของการดื้อยาทั้งหมด ได้รับความอนุเคราะห์โดยตรงจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา Osaka Prefectural Institute of Public Health โอซาก้า ประเทศญี่ปุ่น ในขณะที่ผลการทดสอบความไวต่อยาชนิดอื่นไม่สามารถนำมาใช้ประกอบการศึกษาได้ตามข้อจำกัดของหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์ และเนื่องจากวัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้ต้องการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์หลักของยีน *rpoB* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin การเก็บตัวอย่างจึงมุ่งเน้นไปที่เชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin เพื่อใช้เป็นตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ ดังนั้นสัดส่วนของตัวอย่างเชื้อดื้อยาที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ จึงไม่สามารถสะท้อนอัตราความชุกและอุบัติการณ์ของเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นจริงของหน่วยงานที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง DNA ได้

ยา Rifampicin ถูกนำมาใช้เป็นยาด้านวัณโรคกลุ่มแรกร่วมกับยา Isoniazid ยา Pyrizinamide และยา Ethambutol การติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานเกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin และยา Isoniazid ซึ่งเป็นยาด้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดพร้อมกัน อย่างไรก็ตามการดื้อต่อยา Rifampicin มากกว่า 90% มักส่งผลให้มีการดื้อต่อยา Isoniazid ร่วมด้วยในภายหลัง (3) จากรายงานของ WHO พ.ศ. 2563 พบว่าในบรรดาผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin ประมาณ 78% จะพัฒนามากลายไปเป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (1) สาเหตุหลักที่ทำให้ *M. tuberculosis* ดื้อยา Rifampicin เกิดจากการกลายพันธุ์เพียงตำแหน่งเดียวของยีน *rpoB* (4) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์ภายใน 81 bp ณ บริเวณ RRDRs อัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติของยีน *rpoB* ของ *M. tuberculosis* มีค่าเท่ากับ 10^{-8} – 10^{-9} ซึ่งต่ำกว่าอัตราการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยาชนิดอื่น (เช่น ยีน *katG* มีอัตราการกลายพันธุ์เท่ากับ 10^{-7})

$6-10^8$) ดังนั้นหากเชื้อมีการกลายพันธุ์ของ *rpoB* จึงมีโอกาสพบการกลายพันธุ์ของยีนอื่นตามไปด้วย (88) ด้วยเหตุผลทั้งหมดดังกล่าวข้างต้นจึงสามารถใช้ยา Rifampicin เป็นตัวแทน (Surrogate marker) ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (3) ดังนั้นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin เช่น เทคนิค Xpert MTB/RIF จึงถูกนำมาใช้ในวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้เช่นเดียวกัน (11) และเป็นที่มาของการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ในการศึกษาครั้งนี้

การหาลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing เพื่อหาการกลายพันธุ์ภายในยีน *rpoB* บริเวณ RRDRs ขนาด 81 bp ซึ่งครอบคลุมโคดอน 459 ถึง 604 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ถูกวิเคราะห์กับเชื้อทั้งหมด 141 ตัวอย่าง ในกลุ่มตัวอย่างของเชื้อที่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin จำนวน 125 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อที่ไวต่อยาเกือบทั้งหมด (34 จาก 36 ตัวอย่าง) ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ยกเว้นเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่โคดอน 511 จำนวน 1 ตัวอย่าง และมีการกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งร่วมกันที่โคดอน 490 494 517 และ 527 จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยทั่วไปการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 511 พบได้ว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ในระดับต่ำ แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอนดังกล่าว มีโอกาสพบผลการทดสอบเป็นเชื้อที่มีความไวต่อยา Rifampicin ซึ่งถือเป็นผลการทดสอบที่ที่ผิดพลาด เมื่อทำการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เช่น BACTEC™ MGIT 960 (89) การกลายพันธุ์ 4 ตำแหน่งร่วมกันที่โคดอน 490 494 517 และ 527 จากการการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีเพียงการรายงานพบความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอน 490 494 และ 517 กับความไวต่อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* อย่างไรก็ตาม ไม่พบการศึกษาที่ระบุระดับความรุนแรงในการดื้อยาดังกล่าว การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 490 สามารถพบได้ในเชื้อกลุ่มที่ไวและดื้อต่อยา Rifampicin โดยไม่พบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนอื่นร่วมด้วย (90) ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 494 และ 517 เคยมีการรายงานว่าพบในเชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin โดยไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่นร่วมด้วย (91) (92) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 527 เพียงตำแหน่งเดียว โดยไม่พบการกลายพันธุ์ร่วมที่ตำแหน่งโคดอนอื่น ยังไม่เคยถูกพบในการศึกษาที่ผ่านมา เนื่องจากมักพบการกลายพันธุ์ของโคดอน 527 ร่วมกับตำแหน่งโคดอน 512 513 526 และ 531 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบได้บ่อยว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin อยู่แล้ว จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าโคดอน 527 สัมพันธ์กับการดื้อยา

Rifampicin หรือไม่ (93, 94) นอกจากนี้การทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีทางพีโนไทป์ที่ได้จากเทคนิค BACTEC™ MGIT 960 อาจให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับความไวต่อยาจริงของเชื้อ ซึ่งเป็นข้อจำกัดที่พบได้ของการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากการศึกษาที่ผ่านมา (95)

จากผลการศึกษาคั้งนี้เชื้อที่ดื้อยา Rifampicin ส่วนใหญ่ 93.3% (83 จาก 89 ตัวอย่าง) พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* บริเวณ RRDRs จากการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger DNA Sequencing ในขณะที่เชื้อ 6.7% (6 จาก 89 ตัวอย่าง) ไม่พบการกลายพันธุ์ดังกล่าว ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นของยีน *rpoB* เช่น ที่ N-terminal หรือ Cluster II region หรือการกลายพันธุ์ของยีนอื่นที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin รวมไปถึงการมีกลไกอื่นที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Rifampicin ได้ เช่น การจำลองตำแหน่งเป้าหมายของยาทำให้ยาไม่จับกับ *rpoB* การถูกยีน *rbpA* เหนี่ยวนำให้เชื้อดื้อยา ตัวยามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือโครงสร้าง และตัวเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของยา (37)

การกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ที่พบส่วนใหญ่ เกิดขึ้นภายในบริเวณ RRDRs ระหว่างตำแหน่งโคดอนที่ 507-533 ทำให้เกิดการดื้อมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลง (Missense mutation) โดยมีคุณสมบัติที่แตกต่างไปจากกรดอะมิโนเดิม (Non-conservative mutation) เช่น ขนาด ประจุ ความเป็นขั้ว โมเลกุลของหมู่เคมี และการเข้ากับน้ำ (Hydropathy) ซึ่งล้วนมีผลต่อ Backbone amide และหมู่ Carboxyl ของ β -subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase ที่เป็นเป้าหมายสำคัญต่อการเข้าจับของยา Rifampicin ทำให้ยาไม่สามารถจับได้ ดังนั้นกระบวนการถอดรหัสของสารพันธุกรรมของเชื้อจึงยังคงดำเนินต่อไป ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Rifampicin ในระดับที่สูงขึ้น (96) ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อที่ดื้อยา Rifampicin ส่วนใหญ่ 93.3% (83 จาก 89 ตัวอย่าง) พบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* โดยตำแหน่งโคดอนที่พบมากที่สุดสามอันดับแรก เป็นตำแหน่งที่สอดคล้องกับรายงานอื่นในประเทศไทย (7) และในหลายประเทศทั่วโลก (43) ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน 531 (ประมาณ 52.8 %) รองลงมาคือโคดอน 526 (ประมาณ 21.3 %) และโคดอน 516 (ประมาณ 7.9%) ซึ่งการกลายพันธุ์ของทั้งสามโคดอนนี้ พบเฉพาะในเชื้อที่ดื้อยาเท่านั้นและทำให้เชื้อดื้อยา Rifampicin ในระดับสูง (41, 42) ดังนั้นตำแหน่งโคดอนดังกล่าวทั้งสามจึงเป็นที่นิยมนำมาใช้วินิจฉัยการดื้อยา Rifampicin ของวัณโรคในปัจจุบัน รวมถึงนำมาใช้ในการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ในการศึกษาครั้งนี้ ในขณะที่การกลายพันธุ์ของโคดอนอื่นที่พบในเชื้อที่ดื้อยา

Rifampicin ได้แก่ โคดอน 509 โคดอน 510 โคดอน 511 โคดอน 512 โคดอน 513 โคดอน 515 โคดอน 516 โคดอน 519 โคดอน 522 โคดอน 533 และโคดอน 562 ซึ่งพบได้ในอัตราความชุกที่ต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (97) และสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ในระดับต่ำ (41)

การกลายพันธุ์ที่พบของตำแหน่งโคดอน 531 โคดอน 526 และโคดอน 516 ทั้งหมด และตำแหน่งโคดอนอื่นส่วนใหญ่ เป็นการกลายพันธุ์แบบแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin (98-100) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์แบบการเพิ่มขึ้นของของนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งโคดอน 509 ของเชื้อเพียงจำนวน 2 ตัวอย่าง และไม่พบการกลายพันธุ์แบบการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ การศึกษาก่อนหน้าพบว่า การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ การขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์สามารถทำให้เกิด Missense mutation ซึ่งเป็นสาเหตุของการดื้อต่อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ แต่รูปแบบการกลายพันธุ์ที่มักพบได้บ่อยที่สุดและนำไปสู่การดื้อยา คือการกลายพันธุ์แบบแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (98, 100)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ตำแหน่งโคดอน 531 ส่วนใหญ่มักเป็น Serine531-Leucine (7, 43, 101) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Serine เป็น Leucine ซึ่งทำให้กรดอะมิโนจากเดิมที่เป็น Polar uncharged side chain ขนาดเล็กมาก กลายเป็น Non-polar hydrophobic side chain ขนาดใหญ่ และยังพบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 531 แบบอื่น ได้แก่ Serine531-Tryptophan Serine531-Phenylalanine และ Serine531-Glutamine รูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 526 มีความหลากหลายสูง โดยมีรูปแบบ Histidine526-Tyrosine ที่พบมากที่สุดสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (7) และพบว่ายังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงความหนาของผนังเซลล์ของเชื้อ

M. tuberculosis ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการซึมผ่านเข้าออกของยา Rifampicin (102) และยังพบรูปแบบอื่นๆ ได้แก่ Histidine526-Aspartate Histidine526-Arginine Histidine526-Cysteine และ Histidine526-Serine ในขณะที่รูปแบบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 516 ที่พบ ประกอบไปด้วย Aspartate516-Valine ซึ่งพบมากที่สุดและสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (7) รวมไปถึงรูปแบบ Aspartate516-Tyrosine และ Aspartate516-Glycine การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นทั้งหมดที่ตำแหน่งโคดอน 531 โคดอน 526 และโคดอน 516 รวมไปถึงโคดอนอื่นๆ ใน

การศึกษาครั้งนี้ ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์แบบ Missense mutation ทำให้เกิด Non-conservative mutation ที่กรดอะมิโนมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ β -subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase ที่เป็นเป้าหมายของยา Rifampicin ทำให้ยาไม่สามารถจับได้ดังที่ได้อธิบายข้างต้น (100, 103) อย่างไรก็ตามที่ตำแหน่งโคดอน 517 527 และ 556 พบ การกลายพันธุ์แบบ Silent mutation คือมีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน แต่เนื่องจากการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 โคดอนดังกล่าว พบ ร่วมกับการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนอื่นที่เป็นแบบ Missense mutation จึงยังคงทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายใน β -subunit ภายหลังเกิดการกลายพันธุ์

การศึกษาครั้งนี้ยังพบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา

Rifampicin ส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่งเดียวซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบเป็นหลักทั่วโลก (104, 105) โดยพบมากถึง 87.6% (78 จาก 89 ตัวอย่าง) และเกิดที่โคดอนที่พบบ่อยสามอันดับแรก ได้แก่ 531 โคดอน 526 และโคดอน 516 และโคดอนอื่นๆ ได้แก่ โคดอน 513 โคดอน 522 และโคดอน 533 ในขณะที่พบการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์แบบ 2 ตำแหน่งร่วมกัน เท่ากับ 3.4% (3 จาก 89 ตัวอย่าง) ได้แก่ โคดอน 511 ร่วมกับ 562 โคดอน 512 ร่วมกับ 519 จำนวน 1 ตัวอย่าง และโคดอน 515 ร่วมกับ 516 การศึกษาที่ผ่านมาของ Nguyen และคณะจาก ประเทศเวียดนาม (106) พบการกลายพันธุ์แบบ 2 ตำแหน่งร่วมกันที่ตำแหน่งโคดอน 515 และ 516 เช่นเดียวกับการศึกษาใน ในขณะที่การศึกษาของ Marin และคณะ พบการกลายพันธุ์แบบ 2 ตำแหน่งร่วมกัน ที่เกิดจากการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ระหว่างตำแหน่งโคดอน 515 และ 516 (107) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ 4 ตำแหน่งร่วมกันในเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin เท่ากับ 2.2% (2 จาก 89 ตัวอย่าง) ได้แก่ โคดอน 509 ร่วมกับ 510 511 และ 512 ซึ่งเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ร่วมที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Khosravi และคณะที่ผ่านมา (108) ได้พบรูปแบบการกลายพันธุ์แบบ 4 ตำแหน่งร่วมกัน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาครั้งนี้ โดยเป็นการกลายพันธุ์ของตำแหน่งโคดอน 509 ร่วมกับ 510 512 และ 513 ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Rifampicin ทั้งนี้การดื้อยา Rifampicin ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของโคดอนที่กลายพันธุ์และไม่สัมพันธ์กับจำนวนสะสมของโคดอนที่กลายพันธุ์ของเชื้อ โดยหากพบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน เช่น โคดอน 531 โคดอน 526 หรือโคดอน 516 แม้เพียงตำแหน่งเดียว ก็จะส่งผลให้เชื้อดื้อยา Rifampicin ได้ ในขณะที่การกลายพันธุ์ร่วมกันหลายตำแหน่งไม่ได้แปรผันตรงกับค่า MIC ของยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* (103)

การศึกษาครั้งนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ 4 ตำแหน่งร่วมกันของโคดอน 490 ร่วมกับ 494 517 และ 527 ในตัวอย่างเชื้อที่ไวต่อยา Rifampicin และเป็นรูปแบบการกลายพันธุ์ร่วมที่ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามโคดอนแต่ละโคดอนข้างต้นได้เคยถูกพบและพบร่วมกับโคดอนอื่นในเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Nguyen และคณะ (106) Takawira และคณะ (90) Wang และคณะ (92) และ Bostanabad และคณะ (93) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ 3 ตำแหน่งร่วมกันในการศึกษาครั้งนี้ (โคดอน 527 ร่วมกับ 533 และ 556) โดยพบในตัวอย่างเชื้อที่ไม่ทราบผลความไวต่อยา Rifampicin จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ารูปแบบการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีผลอย่างไรต่อความไวของยา

หนึ่งในแนวทางการป้องกันและแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน คือ การตรวจวินิจฉัยที่สามารถเข้าถึงผู้ป่วยทุกคนให้ครอบคลุมมากที่สุด ซึ่งจะช่วยระบุสถานะของโรคในผู้ป่วยแต่ละคน เพื่อให้ได้รับการรักษาที่เหมาะสม การพัฒนาเทคนิคใหม่ทางอณูชีววิทยาสำหรับวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ที่มีความไวและความจำเพาะสูง มีขั้นตอนการทดสอบที่ไม่ซับซ้อน สามารถทำได้รวดเร็ว จึงเหมาะสำหรับ ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่มีข้อจำกัดเรื่องเครื่องมือที่จำเพาะที่ต้องบำรุงรักษาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะช่วยให้การวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานสามารถเข้าถึงผู้ป่วยได้มากยิ่งขึ้น หนึ่งในเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น คือ เทคนิค Recombinase polymerase amplification (RPA) (54) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้อุณหภูมิคงที่ของเทคนิคดังกล่าวร่วมกับ AS-primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 531 โคดอน 526 และโคดอน 516 ของเชื้อ *M. tuberculosis* การศึกษานี้ได้ออกแบบ AS-primer ให้ลำดับเบสถัดจากตำแหน่งร่องสุดท้ายมีการเพิ่มลำดับเบสที่ไม่ใช่คู่สม ซึ่งสามารถใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์แบบแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในกรณีของการใช้ AS-primer เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์แบบการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายของนิวคลีโอไทด์ จำเป็นต้องอาศัยการออกแบบ Primer ให้มีลำดับเบสที่ไม่ใช่คู่สมหลายตำแหน่ง (Multiple base-pair mismatch) จึงจะสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์รูปแบบดังกล่าวได้ (54) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์หลักที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* เกิดจากการกลายพันธุ์แบบแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ในขณะที่การกลายพันธุ์รูปแบบอื่นพบได้ในอัตราที่ต่ำมาก ดังนั้น AS-primer ที่ถูกออกแบบขึ้นและใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีประสิทธิภาพเพียงพอในการใช้วินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อ

การศึกษาคั้งนี้ได้อพัฒนาเทคนิค MAS-RPA ควบคู่ไปกับการตรวจสอบผลผลิตด้วยเทคนิค Dipstick Chromatography (DC) โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าควรใช้ความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสมที่ 40 ng ความเข้มข้นของ Primer *rpoB516* เท่ากับ 0.05 μM *rpoB526* เท่ากับ 0.07 μM *rpoB531* เท่ากับ 0.10 μM *rpoB* reverse 2 เท่ากับ 0.17 μM IS1081 Forward และ Reverse อย่างละ 0.15 μM ทั้งคู่ โดยทำปฏิกิริยาแบบ Multiplex ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วย Dipstick chromatography โดยใช้อัตราส่วนในการเจือจางผลผลิตเท่ากับ 12 เท่า ความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer เท่ากับ 180 mM ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads เท่ากับ 1 μl และจุ่มแถบตรวจเพื่ออ่านปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที การศึกษานี้ได้ใช้ AS-primer ที่ถูกออกแบบโดย Singpanomchai และคณะ (14, 84) และเคยถูกนำมาใช้วินิจฉัยวัณโรคด้วยปฏิกิริยา RPA แบบ Singleplex ร่วมกับการอ่านผลด้วยการเติมสี SYBR ซึ่งพบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะสูง โดยมีค่าความไวต่อ IS6110 และ IS1081 เท่ากับ 97.95 % และ 99.32 % ตามลำดับ และมีค่าความจำเพาะต่อ IS6110 และ IS1081 เท่ากับ 100 % อย่างไรก็ตามการทำปฏิกิริยาแบบ Singleplex อาศัยหลอดปฏิกิริยาทั้งหมดหลายหลอดและต้องดูแลสารละลายเพื่อเติมลงในหลอดปฏิกิริยาหลายครั้ง ทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา ดังนั้นในการศึกษานี้จึงพัฒนาปฏิกิริยาโดยใช้รูปแบบของ Multiplex ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเป้าหมายที่สนใจหลายตำแหน่งพร้อมกันได้ในการปฏิกิริยาเดียวกัน ทำให้ช่วยลดปริมาณงาน ใช้เวลาในการทดลองน้อยลง ลดค่าใช้จ่าย และลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากการเติมสารละลายลงในหลอดปฏิกิริยาหลายครั้ง อย่างไรก็ตามการออกแบบปฏิกิริยา RPA แบบ Multiplex ให้มีความเหมาะสมนั้น จำเป็นต้องอาศัยสภาวะที่เหมาะสมที่แตกต่างจากปฏิกิริยาแบบ Singleplex เนื่องจากมีการใช้ Primer 2 คู่ ขึ้นไป ซึ่ง Primer แต่ละคู่ล้วนมีลักษณะเฉพาะตัวและมีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Primer บางชนิดที่มีประสิทธิภาพในการจับกับ DNA ต้นแบบมากกว่าชนิดอื่นๆ อาจส่งผลให้ค่าความไว (Sensitivity) ของผลผลิตจาก Primer ชนิดอื่นๆ ลดลง (57, 109, 110) จึงเป็นสาเหตุให้ต้องมีการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมก่อนเริ่มปฏิกิริยา เพื่อช่วยป้องกันการแข่งกันจับโปรตีน Recombinase ของ Primer ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ Primer คู่อื่นๆ และนำไปสู่การลดลงของค่าความไวในปฏิกิริยา (62, 111) การพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ในครั้งนี้ ไม่ได้ทำการพิจารณาผลของการพัฒนาแต่ละสภาวะด้วยการทดสอบ Agarose gel electrophoresis เนื่องจากไม่สามารถสังเกตเห็นผลผลิตที่

ชัดเจนได้บนแผ่นเจล จึงตรวจสอบผลของการพัฒนาแต่ละสภาวะด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography เท่านั้น

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะ (112) ซึ่งทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค AS-RPA ได้ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบเมื่อทำปฏิกิริยากับ IS1081 ยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* เท่ากับ 0.1-0.2 ng แต่การศึกษาครั้งนี้ใช้ DNA ต้นแบบที่มีความเข้มข้นสูงถึง 40 ng เนื่องจากเป็นการทำปฏิกิริยา RPA โดยอาศัย Primer หลายคู่ในการทำปฏิกิริยาพร้อมกัน ทำให้มีความจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่สูงขึ้น เพื่อให้เพียงพอสำหรับการจับของ Primer ทั้ง 4 คู่ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kanokudom และคณะ ซึ่งใช้เทคนิค MAS-RPA ในการวินิจฉัยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) ของเชื้อ *E. coli* และใช้ความเข้มข้นของ DNA สูงถึง 50 ng (109) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นสุดท้ายของ IS1081 Forward *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* Forward primer เท่ากับ 0.15 0.05 0.07 และ 0.10 μM ตามลำดับ IS1081 Reverse Primer และ *rpoB* Reverse 2 Primer เท่ากับ 0.15 และ 0.17 μM ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับที่บริษัทผู้ผลิตน้ำยา RPA ที่แนะนำให้ใช้ความเข้มข้นรวมสุดท้ายของ Primer แต่ละข้าง ไม่เกิน 0.48 μM มิฉะนั้นอาจทำให้ปริมาณของผลผลิตที่ได้ลดลงจนไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยทั่วไปแล้วปฏิกิริยา RPA มีเวลาที่จำกัดในการทำปฏิกิริยา โดยสารตั้งต้นมักจะถูกใช้ไปภายในระยะเวลา 25 – 30 นาที และหากใช้เวลาเกินกว่า 30 นาที อาจส่งผลให้สารตั้งต้นถูกใช้จนหมดก่อนเสร็จสิ้นปฏิกิริยา ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Primer ที่ใช้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่ระยะเวลา 20 และ 25 นาที ไม่พบแถบผลผลิตบางแถบทำให้ไม่สามารถแยกแถบผลผลิตบนแผ่นทดสอบได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบที่ระยะเวลา 35 นาที พบว่าเกิดแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมบนแผ่นทดสอบควบคุมลบ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา MAS-RPA เท่ากับ 30 นาที ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-RPA ของการศึกษานี้ อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมตามที่บริษัทผู้ผลิตได้แนะนำคือระหว่าง 37 – 42 องศาเซลเซียส เนื่องจากหากใช้อุณหภูมิที่สูงกว่านี้ในการทำปฏิกิริยาอาจทำให้เอนไซม์ที่ใช้เสียประสิทธิภาพในการร่วมทำปฏิกิริยาและหากใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าช่วงดังกล่าวจะทำให้

ใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่นานขึ้น และอาจส่งผลให้สารตั้งต้นถูกใช้ไปหมดก่อนจบปฏิกิริยา (59)

การอ่านผลผลิตบนแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography มีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อความถูกต้องและชัดเจนในการอ่านปฏิกิริยา MAS-RPA โดย Dipstick developing buffer มีส่วนประกอบหลักเป็นเกลือ (NaCl) และเนื่องจากผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในการศึกษาครั้งนี้ เป็นผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาแบบ Multiplex จึงจำเป็นต้องใช้ Dipstick developing buffer ประเภท Modified ที่มีส่วนประกอบของสารที่ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะจากการทำปฏิกิริยาที่อาศัย Primer หลายคู่ โดยความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer เบื้องต้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำเท่ากับ 150 mM อย่างไรก็ตามหากยังคงพบแถบผลผลิตที่เป็นผลบวกปลอมสามารถลดความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer ลงได้ และในทางกลับกันหากการปรากฏของแถบผลผลิตไม่ชัดเจนสามารถเพิ่มความเข้มข้นของ Dipstick developing buffer ได้เช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer เป็น 180 mM ซึ่งสูงกว่าความเข้มข้นเบื้องต้นที่บริษัทแนะนำ ซึ่งให้ความชัดเจนในการอ่านแถบผลผลิตได้มากกว่า ในขณะที่ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 1 μ l ซึ่งเป็นปริมาตรต่ำที่สุดที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยสามารถอ่านแถบผลผลิตบนแผ่นทดสอบได้ชัดเจน และช่วยลดแถบผลผลิตซึ่งเป็นผลบวกปลอมได้มากกว่าที่ปริมาตร 2 μ l ในกรณีของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี Isothermal amplification เช่น เทคนิค RPA ควรเจือจางผลผลิตด้วย TE Buffer หรือน้ำที่อัตราส่วน 5-10 เท่า โดยในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราส่วนการเจือจางของผลผลิตต่อน้ำที่เหมาะสมอยู่ที่ 12 เท่า (1 : 11) ซึ่งเป็นอัตราส่วนเจือจางที่มากกว่าที่บริษัทแนะนำ เนื่องมาจากการเจือจางในอัตราส่วนที่น้อยกว่านี้ ยังคงสังเกตเห็นผลบวกปลอมที่แถบควบคุมลบ ในขณะที่อัตราส่วนเจือจางที่ 12 เท่านี้ ส่งผลให้การอ่านผลผลิตมีความชัดเจนที่สุดและสามารถกำจัดผลบวกปลอมที่แถบควบคุมลบไปได้ สำหรับระยะเวลาที่เหมาะสมในการอ่านปฏิกิริยาอยู่ที่ 15 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่สอดคล้องกับที่บริษัทแนะนำภายใน 5 - 15 นาที ในขณะที่ระยะเวลา 5 และ 10 นาที สามารถมองเห็นแถบผลผลิตได้เช่นกันแต่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ชัดเจนเท่ากับการอ่านปฏิกิริยาที่ระยะเวลา 15 นาที (113) ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ DNA ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา MAS-RPA-DC เมื่อวินิจฉัยด้วย IS1081 พบว่าเท่ากับ 0.1 ng ซึ่งต่ำกว่ายีน *rpoB516* *rpoB526* และยีน *rpoB531* ที่ใช้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยาได้เท่ากับเท่ากับ 1 ng

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะ (112) ที่ทำการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Rifampicin ที่มีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ DNA ในการทำปฏิกิริยา AS-RPA ที่ตรวจสอบผลผลิตด้วย SYBR green I เมื่อวินิจฉัยด้วย IS1081 พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.05 ng ซึ่งต่ำกว่ายีน *rpoB516* *rpoB526* และยีน *rpoB531* ที่มีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 5 ng การที่ยีน *rpoB516* *rpoB526* และยีน *rpoB531* มีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ DNA สูงกว่า IS1081 อาจเป็นผลมาจากธรรมชาติของยีน *rpoB* ที่พบเพียงจำนวน 1 Copy บนโครโมโซมของเชื้อ ในขณะที่ IS1081 สามารถพบได้สูงถึง 5-7 Copies จึงทำให้แม้มีปริมาณ DNA ต้นแบบที่น้อยกว่าก็สามารถตรวจพบได้ (114, 115) รวมไปถึงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ Multiplex ที่จำเป็นต้องอาศัยความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่สูงกว่าปฏิกิริยาแบบ Singleplex เพื่อปรับสมดุลระหว่าง primer ที่ใช้ทำปฏิกิริยามากกว่า 1 คู่ ต่อ DNA ต้นแบบและช่วยเพิ่มโอกาสให้ Primer ได้เข้าจับกับ DNA ต้นแบบได้มากขึ้น (116) การศึกษาของ Kanokudom และคณะ ได้ตรวจวินิจฉัยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ESBL ของเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค Multiplex-RPA-DC และพบว่ามีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ DNA เท่ากับ 2.5 ng โดยค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของ DNA ในการทำปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับจำนวน Primer ที่ใช้ การจับกันเองภายในสายของ Primer และประสิทธิภาพในการจับกับ DNA ต้นแบบของ Primer แต่ละชนิดซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละการทดลอง (109)

ความจำเพาะของเทคนิค MAS-RPA-DC จากการทดสอบปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (Cross reaction) เมื่อใช้ Primer *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ทำปฏิกิริยากับ DNA ต้นแบบของเชื้อ *Mycobacterium* สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *M. tuberculosis* และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มักพบการก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ ได้แก่ *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* และ *Acinetobacter baumannii* พบว่าไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์เหล่านี้ อย่างไรก็ตามพบว่ามี DNA ของเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยเทคนิค MAS-RPA-DC ได้อย่างชัดเจนกับ DNA ของ *M. tuberculosis* ต้นแบบ คือ *M. bovis* เนื่องจากพบแถบผลผลิตขึ้นบนแผ่นทดสอบทั้งหมด 4 แถบ รวมถึงแถบ IS1081 ซึ่งใช้จำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจาก

เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทั้งนี้มีสาเหตุมาจาก *M. bovis* เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* เช่นเดียวกับกับ *M. tuberculosis* มีความใกล้เคียงกันทางพันธุศาสตร์เป็นอย่างมาก (117) ทำให้ Primer สามารถเข้าจับและทำปฏิกิริยากับ IS1081 ได้ทั้งคู่ (118) ดังนั้นเมื่อนำ *M. bovis* มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย IS1081 ในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาแบบข้ามกลุ่มกันได้ อย่างไรก็ตามในการจำแนกแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดข้างต้นออกจากกันสามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะและอัตราการเติบโตของเชื้อ การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี (117) หรือการวิเคราะห์ลำดับเบส (119) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่วินิจฉัยวัณโรคด้วยเทคนิค Xpert MTB/RIF Ultra โดยใช้ IS1081 ในการช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ไม่สามารถแยกวินิจฉัยได้ถึงสายพันธุ์และแปลผลการทดสอบเพื่อวินิจฉัยเป็นเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* เท่านั้น (120)

เทคนิค MAS-RPA-DC สามารถวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ถูกต้องทั้งหมดกับตัวอย่างที่นำทดสอบ 141 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเทคนิค MPT 64 SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test และเทคนิคการหาลำดับเบสจากการวินิจฉัยเชื้อเบื้องต้นโดยห้องปฏิบัติการที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ โดยแปลผลจากการตรวจสอบพบแถบยีน IS1081 บนแถบตรวจ ในขณะที่การวินิจฉัยว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ตื้อต่อยา Rifampicin จะอาศัยการแปลผลว่าเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* โดยดูจากแถบผลผลิตยีน IS1081 ร่วมกับแถบยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ทั้งนี้หากไม่พบแถบของยีนใดยีนหนึ่ง หมายถึง ยีนเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนดังกล่าว ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin เทคนิค MAS-RPA-DC มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบที่สูง ในการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA Sequencing ในเชื้อจำนวน 141 ตัวอย่าง โดยที่ตำแหน่งโคดอน 516 มีค่าเท่ากับ 100% 95.5% 60% และ 100% ตามลำดับ ที่ตำแหน่งโคดอน 526 มีค่าเท่ากับ 70% 97.5% 82.4% และ 92.5% ตามลำดับ และที่ตำแหน่งโคดอน 531 มีค่าเท่ากับ 98.2% 97.7% 96.5% และ 98.8% ตามลำดับ โดยการวินิจฉัยตำแหน่งโคดอน 531 มีความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมาก ในขณะที่ของตำแหน่งโคดอน 526 และ 516 อยู่ในเกณฑ์ดี จะเห็นได้ว่าการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่มีความไวมากที่สุดคือ ที่ตำแหน่งโคดอน 516 (100%) รองลงมาคือโคดอน 531 (98.2%) และน้อยที่สุดคือโคดอน 526 (70%) ทั้งนี้ค่าความไวของตำแหน่งโคดอน 526 ที่ลดลงมีสาเหตุมาจากการพบตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอมจากเทคนิค MAS-RPA-DC ที่เพิ่มขึ้นมากถึง 6 ตัวอย่าง

ขัดแย้งกับการศึกษาก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะที่พบความไวในการวินิจฉัยยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ด้วย AS-RPA เท่ากับ 100% ทั้ง 3 ยีน (112) ทั้งนี้อาจมีผลมาจากประสิทธิภาพที่ลดลงของ *rpoB526* Primer ซึ่งต้องมีการแข่งขันกันจับ DNA ต้นแบบกับ Primer อื่นๆ ในปฏิกิริยาแบบ Multiplex-RPA ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ในขณะที่การวินิจฉัยการกลายพันธุ์ที่มีความจำเพาะมากที่สุดคือโคดอน 531 และ โคดอน 526 (97.7% และ 97.5% ตามลำดับ) และน้อยที่สุดคือโคดอน 516 (95.5%) การศึกษาก่อนหน้าของ Singpanomchai และคณะพบความจำเพาะในการวินิจฉัยยีน *rpoB516* *rpoB526* และ *rpoB531* ด้วย AS-RPA เท่ากับ 100% ทั้ง 3 ยีน (112) โดยค่าความจำเพาะของโคดอน 516 ที่ลดลงมีสาเหตุมาจากการพบตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่นๆ ทั้งภายในและนอกบริเวณ RRDRs ซึ่งพบการหายไปของแถบผลผลิตที่ตำแหน่ง 516 โดยพบตัวอย่างเหล่านี้มากถึง 6 ตัวอย่าง ทั้งนี้ค่าทำนายผลบวกของตำแหน่งโคดอน 516 ที่ลดลงเป็นผลเนื่องมาจากผลบวกปลอมที่เพิ่มขึ้นมากถึง 6 ตัวอย่างดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น รวมไปถึงค่าทำนายผลลบที่น้อยลงของโคดอน 526 มีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นของตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม 6 ตัวอย่าง ดังที่ได้อธิบายไปข้างต้นเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถวิเคราะห์หาลำดับเบสซ้ำเพื่อทวนสอบผลเพื่อยืนยันความถูกต้อง เนื่องจากตัวอย่าง DNA ต้นแบบเหลือไม่เพียงพอต่อการทดสอบ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบเทคนิค MAS-RPA-DC กับการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 ซึ่งเป็นวิธีทางพีโนไทป์ กับตัวอย่างจำนวน 125 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 79.78% 100% 100% และ 66.67% ตามลำดับ และมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดี ในขณะที่เมื่อนำการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสเปรียบเทียบกับเทคนิค BACTEC MGIT 960 พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 93.26 % 94.44 % 97.65 % และ 85 % ตามลำดับ และมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีมาก ทั้งเทคนิค MAS-RPA-DC และเทคนิคการหาลำดับเบส เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin อย่างไรก็ตามเทคนิค MAS-RPA-DC มีความไวที่น้อยกว่าเทคนิคการหาลำดับเบส โดยไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin ได้ 18 ตัวอย่าง ในขณะที่เทคนิคการหาลำดับเบสไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin ได้ 6 ตัวอย่าง ผลลบปลอมที่เกิดขึ้นทำให้ค่าความไวลดลงอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาแบบ Multiplex ซึ่งอาศัย

Primer หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกัน ซึ่งส่งผลให้เกิดผลบปลอมจากการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาของ Primer แต่ละคู่ได้ (62, 111) นอกจากนี้เทคนิค MAS-RPA-DC สามารถตรวจสอบเฉพาะการกลายพันธุ์ที่บริเวณตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 ตามที่ได้ออกแบบ Primer สำหรับใช้กับแผ่นทดสอบในการศึกษานี้เท่านั้น จึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อที่มีการกลายพันธุ์อยู่นอกบริเวณตำแหน่งโคดอนดังกล่าวทั้งสาม อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบพิจารณาเฉพาะตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีผลความไวต่อยา Rifampicin และมีการกลายพันธุ์เฉพาะในตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 พบว่า MAS-RPA-DC มีผลบปลอมที่ลดลงจาก 18 ตัวอย่างเหลือเพียง 5 ตัวอย่าง ส่งผลให้มีความไวความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ เพิ่มขึ้นเป็น 93.24 % 100 % 100% และ 87.18 % ตามลำดับ และมีค่าความสอดคล้องเพิ่มขึ้นอยู่ในเกณฑ์ดีมาก อย่างไรก็ตามหากทำการทดสอบในความเป็นจริงจะไม่สามารถคาดการณ์ได้ว่า ตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีการกลายพันธุ์เพียงในตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 หรือมีการกลายพันธุ์นอกตำแหน่งโคดอนดังกล่าวทั้งสาม ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตควรพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC ให้ครอบคลุมการวินิจฉัยการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งโคดอนอื่น นอกเหนือจากโคดอน 516 526 และ 531 เพื่อลดโอกาสการเกิดผลบปลอมให้ได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค MAS-RPA-DC มีความจำเพาะที่สูงกว่าเทคนิคการหาลำดับเบสเล็กน้อย เนื่องจากตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อที่ไวต่อยา Rifampicin หรือผลบวกปลอม ในขณะที่เทคนิคการหาลำดับเบสตรวจพบจำนวน 2 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากเทคนิค MAS-RPA-DC อาศัยการตรวจการกลายพันธุ์ของยีนที่โคดอนที่พบได้บ่อยเพียง 3 โคดอน ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน 516 526 และ 531 เท่านั้น จึงไม่สามารถพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นนอกเหนือจากนี้ได้ นอกจากนี้การกลายพันธุ์ทั้ง 3 โคดอนดังกล่าวมักส่งผลให้เชื้อดื้อยาต่อยา Rifampicin เท่านั้น

เทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจคัดกรองหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอนที่สำคัญและสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ด้วยตาเปล่าพร้อมกันทั้ง 3 ยีน ได้แก่ ยีน *rpoB516* ยีน *rpoB526* และยีน *rpoB531* โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนในการตรวจวินิจฉัย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบข้อจำกัดบางประการที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพโดยรวมของการทดลอง เช่น การเกิดผลบวกปลอมบนแผ่นทดสอบเป็นบางระยะ เนื่องจากปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบอาศัย AS-primer ซึ่งอาจมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับ DNA ต้นแบบไม่เท่ากัน ร่วมกับการใช้ปฏิกิริยาแบบ Multiplex ซึ่งอาศัย Primer หลายคู่ในการทำปฏิกิริยา จึงจำเป็นต้องอาศัยการดูผลสารละลายอย่างแม่นยำเพื่อให้มีอัตราส่วนและความเข้มข้นที่

เหมาะสมเท่ากันในทุกครั้ง การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตควรทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของ Primer แต่ละคู่ โดยปรับเพิ่มจำนวน Primer คู่อื่นเข้ารวมกับ Primer ชุดที่ได้สภาวะที่เหมาะสมทีละชุดจนครบทุกชุด หลังจากนั้นจึงปรับอัตราส่วนของ Primer ทุกตัวที่ใช้ให้เข้ากันในปฏิกิริยาเดียว (57) นอกจากนี้แผ่นทดสอบที่ใช้ตรวจหาผลผลิตจาก MAS-RPA ไม่มีแถบควบคุมคุณภาพ (Control line) ทำให้หากเกิดกรณีที่ไม่มีแถบผลผลิตบนแผ่นทดสอบจะไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่ามีสาเหตุมาจากความผิดพลาดของแผ่นทดสอบหรือความผิดพลาดจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนั้นควรมีการกำหนดให้มีแถบควบคุมคุณภาพให้อยู่บนแผ่นทดสอบเพื่อให้การตรวจวิเคราะห์มีประสิทธิภาพและความน่าเชื่อถือสูงที่สุด



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคั้งนี้วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpoB* บริเวณ RRDRs ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 141 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเชื้อจำนวน 16 ตัวอย่างที่ไม่มีผลความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์ และเชื้อจำนวน 125 ตัวอย่างที่มีผลความไวต่อยา Rifampicin ด้วยวิธีพีโนไทป์ โดยใน 125 ตัวอย่าง พบเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin จำนวน 89 ตัวอย่าง ซึ่งตำแหน่งโคดอนที่พบว่ามี การกลายพันธุ์มากที่สุด 3 อันดับแรกในเชื้อที่ดื้อยา Rifampicin ได้แก่ โคดอน 531 (52.8 %) โคดอน 526 (21.3 %) และโคดอน 516 (7.3 %) ในขณะที่ตำแหน่งโคดอนอื่นที่พบว่าสัมพันธ์กับการดื้อยา Rifampicin แต่พบในอัตราความชุกที่ต่ำ ได้แก่ โคดอน 513 โคดอน 515 โคดอน 516 โคดอน 519 และโคดอน 562 (โคดอนละ 1.1 %) โคดอน 509 โคดอน 510 โคดอน 522 และโคดอน 533 (โคดอนละ 2.2 %) และโคดอน 511 และโคดอน 512 (โคดอนละ 3.4 %) ตัวอย่างที่ดื้อต่อยา Rifampicin ส่วนใหญ่พบการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง ด้วยการแทนที่ ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เรียกว่า Missense mutation หรือการกลายพันธุ์ที่ทำให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปจากเดิม ส่งผลต่อเป้าหมายของยาที่เปลี่ยนไปและส่งผลให้เกิดการดื้อยา Rifampicin ในที่สุด โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 531 พบการกลายพันธุ์ 4 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ Serine531-Leucine ตำแหน่งโคดอน 526 พบการกลายพันธุ์ 5 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ Histidine526-Tyrosine และตำแหน่งโคดอน 516 พบการกลายพันธุ์ 3 รูปแบบ โดยรูปแบบที่พบมากที่สุดคือ Aspartate516-Valine ในขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอนอื่นพบเพียงอุบัติการณ์ต่ำ

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการพัฒนาเทคนิค MAS-RPA-DC เพื่อวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ใช้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ 40 ng ความเข้มข้นของ Primer *rpoB* 516 เท่ากับ 0.05 μM *rpoB* 526 เท่ากับ 0.07 μM *rpoB* 531 เท่ากับ 0.10 μM *rpoB* reverse 2 เท่ากับ 0.17 μM IS1081 Forward และ Reverse อย่างละ 0.15 μM ทั้งคู่ อุณหภูมิที่ใช้ตลอดปฏิกิริยา MAS-RPA คือ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที ขั้นตอนการตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา MAS-RPA ด้วย Dipstick chromatography ใช้อัตราส่วนในการเจือจางผลผลิตเท่ากับ 12 เท่า ความเข้มข้นของ Dipstick modified developing buffer เท่ากับ 180 mM ปริมาตรของ Streptavidin-coated blue latex beads เท่ากับ 1 μl และระยะเวลาสำหรับการอ่านผลด้วยตาเปล่าจาก Dipstick chromatography คือ 15 นาที เทคนิค MAS-RPA-DC ที่พัฒนาขึ้นสามารถ

ตรวจสอบ DNA ที่น้อยที่สุดได้เท่ากับ 0.1 ng สำหรับ IS1081 และเท่ากับ 1 ng สำหรับยีน *rpoB516* *rpoB526* และยีน *rpoB531* และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อ *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. gordonae* และ *M. intracellulare*

เทคนิค MAS-RPA-DC สามารถวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่งโคดอน 516 โคดอน 526 และโคดอน 531 ได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sanger DNA sequencing พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 100% 70% และ 98.2% ตามลำดับ ค่าความจำเพาะเท่ากับ 95.5% 97.5% และ 97.7% ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวก เท่ากับ 60% 82.4% และ 96.5% ตามลำดับ และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% 95.2% และ 98.8% ตามลำดับ โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดีถึงดีมาก อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Bactec MGIT 960 พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 83.2% ค่าความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 70.6% โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ในเกณฑ์ดี

ทั้งนี้เทคนิค MAS-RPA-DC เป็นการทำให้ปฏิกิริยาแบบ Multiplex จึงสามารถลดขั้นตอนการเปิดสารและสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายได้หลายตำแหน่งในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ยังอาศัยการทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียสตลอดทั้งปฏิกิริยา จึงใช้เพียงกล่องควบคุมอุณหภูมิ การตรวจสอบผลผลิตด้วยแผ่นทดสอบ Dipstick chromatography ช่วยทำให้ลดขั้นตอนอุปกรณ์ในการอ่านผลของปฏิกิริยาน้อยลง อ่านผลง่ายและรวดเร็วมากขึ้น ดังนั้นเทคนิค MAS-RPA-DC จึงเป็นเทคนิคที่มีขั้นตอนในการทดสอบไม่ซับซ้อน ใช้เวลารวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า และให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ อย่างไรก็ตามในการนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยา Rifampicin สำหรับงานภาคสนามหรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมกับ DNA ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง รวมไปถึงการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิคให้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

บรรณานุกรม

1. World Health O. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020 2020.
2. Khadka P, Dummer J, Hill PC, Das SC. Considerations in preparing for clinical studies of inhaled rifampicin to enhance tuberculosis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018;548(1):244-54.
3. Guenaoui K, Harir N, Ouardi A, Zeggai S, Sellam F, Bekri F, et al. Use of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/rifampicin for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of clinically suspected multi-drug resistance tuberculosis cases. *Annals of translational medicine*. 2016;4(9):168.
4. Heep M, Brandstätter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rüscher-Gerdes S, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(1):107-10.
5. Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, Beckert P, Kabamba Mukadi B, Mathys V, et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated *rpoB* gene mutations in pathogenic mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(3):167-72.
6. Chia BS, Lanzas F, Rifat D, Herrera A, Kim EY, Sailer C, et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. *PloS one*. 2012;7(7):e40456.
7. Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, Yorsangsukkamol J, Phunpruch S, Phdarat P, et al. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(5):446-53.
8. Nakata N, Kai M, Makino M. Mutation analysis of mycobacterial *rpoB* genes and rifampin resistance using recombinant *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial agents*

and chemotherapy. 2012;56(4):2008-13.

9. Hall L, Jude KP, Clark SL, Wengenack NL. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtiter plate format. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(52).
10. Yu F-L, Lee J-C, Wang M-S, Hsu H-L, Chen T-T, Cheng C-L, et al. Evaluation of a modified direct agar proportion method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* from MGIT samples. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2016;49(1):60-5.
11. Vergara Gómez A, González-Martín J, García-Basteiro AL. Xpert® MTB/RIF: Usefulness for the diagnosis of tuberculosis and resistance to rifampicin. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2017;149(9):399-405.
12. Jureen P, Werngren J, Hoffner SE. Evaluation of the line probe assay (LiPA) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2004;84(5):311-6.
13. Cheon SA, Cho HH, Kim J, Lee J, Kim H-J, Park TJ. Recent tuberculosis diagnosis toward the end TB strategy. *Journal of Microbiological Methods*. 2016;123:51-61.
14. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Naked eye detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by recombinase polymerase amplification-SYBR green I assays. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2019;33(2):e22655.
15. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Isothermal recombinase polymerase amplification assay applied to the detection of group B streptococci in vaginal/anal samples. *Clinical chemistry*. 2014;60(4):660-6.
16. Lillis L, Siverson J, Lee A, Cantera J, Parker M, Piepenburg O, et al. Factors influencing Recombinase polymerase amplification (RPA) assay outcomes at point of care. *Molecular and cellular probes*. 2016;30(2):74-8.
17. Rohrman B, Richards-Kortum R. Inhibition of recombinase polymerase amplification by background DNA: a lateral flow-based method for enriching target DNA. *Analytical chemistry*. 2015;87(3):1963-7.
18. Barril P, Nates S. Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities: IntechOpen; 2012.

19. Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Analytical Biochemistry*. 2005;340(1):24-34.
20. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi S-L, et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting *IS6110* for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiological Research*. 2010;165(3):211-20.
21. Fernández F, Gutiérrez J, Sorlózano A, Romero JM, Soto MJ, Ruiz-Cabello F. Comparison of the SYBR Green and the hybridization probe format for real-time PCR detection of HHV-6. *Microbiological Research*. 2006;161(2):158-63.
22. Ong SE, Zhang S, Du H, Fu Y. Fundamental principles and applications of microfluidic systems. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:2757-73.
23. Bahadır EB, Sezgintürk MK. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;82:286-306.
24. Han S, Zhou T, Yin B, He P. A sensitive and semi-quantitative method for determination of multi-drug residues in animal body fluids using multiplex dipstick immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 2016;927:64-71.
25. Chandra M, Rana P, Chandra K, Arora VK. Tuberculosis - Depression syndemic: A public health challenge. *The Indian journal of tuberculosis*. 2019;66(1):197-202.
26. Velayati AA, Farnia P. Chapter 1 - The Species Concept. In: Velayati AA, Farnia P, editors. *Atlas of Mycobacterium Tuberculosis*. Boston: Academic Press; 2017. p. 1-16.
27. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology*. 2018;26(6):555-6.
28. Tang J, Yam WC, Chen Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2016;98:30-41.
29. CDC. Core Curriculum on tuberculosis: what the clinician should know United States: Centers for Disease Control and Prevention, National Center for HIV Viral Hepatitis STD and TB Prevention; 2013 [6:[Available from: <https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/index.htm>.

30. Yates TA, Khan PY, Knight GM, Taylor JG, McHugh TD, Lipman M, et al. The transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in high burden settings. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):227-38.
31. Loto OM, Awowole I. Tuberculosis in pregnancy: a review. *Journal of Pregnancy*. 2012;2012:379271-.
32. Zahrt Thomas C. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes and Infection*. 2003;5(2):159-67.
33. Rendon A, Tiberi S, Scardigli A, D'Ambrosio L, Centis R, Caminero JA, et al. Classification of drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): evidence and perspectives. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(10):2666-71.
34. เปี่ยมลาภ แสงสายัณห์. วัณโรคดื้อยา. *วารสารกรมการแพทย์*. 2561;43(3):5-9.
35. Nusrath Unissa A, Hassan S, Indira Kumari V, Revathy R, Hanna LE. Insights into *RpoB* clinical mutants in mediating rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2016;67:20-32.
36. Dehnavi A, Soleymanpour A. New chemically modified carbon paste sensor for nanomolar concentration measurement of rifampicin in biological and pharmaceutical media. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;94:403-9.
37. Tupin A, Gualtieri M, Roquet-Banères F, Morichaud Z, Brodolin K, Leonetti J-P. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(6):519-23.
38. Wehrli W. Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Reviews of infectious diseases*. 1983;5 Suppl 3:S407-11.
39. Ishikawa J, Chiba K, Kurita H, Satoh H. Contribution of *rpoB2* RNA polymerase beta subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia species*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1342-6.
40. Spanogiannopoulos P, Thaker M, Koteva K, Waglechner N, Wright GD. Characterization of a Rifampin-Inactivating Glycosyltransferase from a Screen of Environmental Actinomycetes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(10):5061.
41. Huitric E, Werngren J, Juréen P, Hoffner S. Resistance levels and *rpoB* gene mutations among in vitro-selected rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

mutants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(8):2860-2.

42. Dutta NK, Karakousis PC. Can the duration of tuberculosis treatment be shortened with higher dosages of rifampicin? *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:1117-.
43. Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of infection and public health*. 2018;11(5):605-10.
44. Qazi O, Rahman H, Tahir Z, Qasim M, Khan S, Ahmad Anjum A, et al. Mutation pattern in rifampicin resistance determining region of *rpoB* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *International Journal of Mycobacteriology*. 2014;3(3):173-7.
45. Madania A, Habous M, Zarzour H, Ghoury I, Hebbo B. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. *Polish journal of microbiology*. 2012;61(1):23-32.
46. Rodrigues CS, Shenai SV, Almeida D, Sadani MA, Goyal N, Vadher C, et al. Use of bactec 460 TB system in the diagnosis of tuberculosis. *Indian journal of medical microbiology*. 2007;25(1):32-6.
47. Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(4):1206-9.
48. Agarwal A, Kumar N, Kishore K. Evaluation of manual Mycobacterium growth indicator tube for isolation and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for implementation in low and medium volume laboratories. *Medical Journal Armed Forces India*. 2018;74(3):220-6.
49. Whyte T, Cormican M, Hanahoe B, Doran G, Collins T, Corbett-Feeney G. Comparison of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 for culture of Mycobacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2000;38(2):123-6.
50. Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R, Ritter C, Böttger EC. Quantitative Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* by Use of MGIT 960 and EpiCenter Instrumentation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(6):1773.
51. Said HM, Kock MM, Ismail NA, Baba K, Omar SV, Osman AG, et al. Comparison between the BACTEC MGIT 960 system and the agar proportion method for

susceptibility testing of multidrug resistant tuberculosis strains in a high burden setting of South Africa. *BMC infectious diseases*. 2012;12:369.

52. Hasan M, Munshi SK, Banu Momi MS, Rahman F, Noor R. Evaluation of the effectiveness of BACTEC MGIT 960 for the detection of mycobacteria in Bangladesh. *International Journal of Mycobacteriology*. 2013;2(4):214-9.

53. Chaidir L, Ruesen C, Dutilh BE, Ganiem AR, Andryani A, Apriani L, et al. Use of whole-genome sequencing to predict *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Indonesia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;16:170-7.

54. Htike Min PK, Pitaksajakul P, Tipkrua N, Wongwit W, Jintaridh P, Ramasoota P. Novel mutation detection IN *rpoB* OF rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using pyrosequencing. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2014;45(4):843-52.

55. Ishige T, Itoga S, Matsushita K. Chapter Two - Locked Nucleic Acid Technology for Highly Sensitive Detection of Somatic Mutations in Cancer. In: Makowski GS, editor. *Advances in Clinical Chemistry*. 83: Elsevier; 2018. p. 53-72.

56. Qi H, Yue S, Bi S, Ding C, Song W. Isothermal exponential amplification techniques: From basic principles to applications in electrochemical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;110:207-17.

57. Mayboroda O, Katakis I, O'Sullivan CK. Multiplexed isothermal nucleic acid amplification. *Analytical Biochemistry*. 2018;545:20-30.

58. Mo Y, Cui F, Li D, Dai Y, Li X, Zhang X, et al. Establishment of a rapid and sensitive method based on recombinase polymerase amplification to detect mts90, a new molecular target of *Mycobacterium tuberculosis*. *RSC Advances*. 2017;7(79):49895-902.

59. TwistDx™. TwistAmp® DNA Amplification Kits Assay Design Manual [June 29, 2019]. Available from: <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf?sfvrsn=29>.

60. Benita Y, Oosting RS, Lok MC, Wise MJ, Humphery-Smith I. Regionalized GC content of template DNA as a predictor of PCR success. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(16):e99-e.

61. Richards SM, Mitchell KJ, Tobler R, Cooper A. Recombinase Polymerase

Amplification (RPA) versus PCR for ancient DNA library amplification. PeerJ Preprints. 2019;7:e27544v1.

62. Lobato IM, O'Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2018;98:19-35.
63. Ma Q, Liu H, Ye F, Xiang G, Shan W, Xing W. Rapid and visual detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strips. Molecular and cellular probes. 2017;36:43-9.
64. Hou P, Zhao G, Wang H, He C, Huan Y, He H. Development of a recombinase polymerase amplification combined with lateral-flow dipstick assay for detection of bovine ephemeral fever virus. Molecular and cellular probes. 2018;38:31-7.
65. Zhao G, Wang H, Hou P, He C, He H. Rapid visual detection of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick. Journal of veterinary science. 2018;19(2):242-50.
66. Yilmaz M, Ozic C, Gok İ. Principles of Nucleic Acid Separation by Agarose Gel Electrophoresis: IntechOpen; 2012. 33-40 p.
67. Drabik A, Bodzoń-Kuśakowska A, Silberring J. 7 - Gel Electrophoresis. In: Ciborowski P, Silberring J, editors. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (Second Edition). Boston: Elsevier; 2016. p. 115-43.
68. Chovelon B, Fiore E, Faure P, Peyrin E, Ravelet C. A lifetime-sensitive fluorescence anisotropy probe for DNA-based bioassays: The case of SYBR Green. Biosensors & bioelectronics. 2017;90:140-5.
69. Elsayed Metawly D, Noby Amer A, Mostafa Mostafa H, El Din Elsayaf G, Abd El Kader O. Low cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV infected patients by SYBR Green I real-time PCR. Alexandria Journal of Medicine. 2018;54(4):481-5.
70. Wei C, Lipton JH, Kamel-Reid S. Chapter 14 - Monitoring of Minimal Residual Hematologic Disease. In: Tubbs RR, Stoler MH, editors. Cell and Tissue Based Molecular Pathology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2009. p. 135-44.
71. Kim J, Lee JS, Lee JB. Investigation of Forster resonance energy transfer (FRET) and competition of fluorescent dyes on DNA microparticles. International journal of molecular sciences. 2015;16(4):7738-47.

72. Jing W, Jiang X, Zhao W, Liu S, Cheng X, Sui G. Microfluidic platform for direct capture and analysis of airborne *Mycobacterium tuberculosis*. *Analytical chemistry*. 2014;86(12):5815-21.
73. Rosenfeld L, Cheng Y, Rao J, Tang SKY. Rapid detection of tuberculosis using droplet-based microfluidics: SPIE; 2014.
74. Collins S, Jorgensen F, Willis C, Walker J. Chapter 8 - Assessing organism viability and interpreting genomic unit versus colony forming unit data for water and food borne microorganisms, such as *Legionella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Listeria*. In: Cook N, D'Agostino M, Thompson KC, editors. *Molecular Microbial Diagnostic Methods*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 155-84.
75. Fairfax MR, Salimnia H. Chapter 1 - Quantitative PCR: An Introduction. In: Grody WW, Nakamura RM, Strom CM, Kiechle FL, editors. *Molecular Diagnostics*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 3-14.
76. Jannetto PJ, Laleli-Sahin E, Wong SH. Chapter 12 - Pharmacogenomics: Methodologies for genotyping and phenotyping. In: Hempel G, editor. *Handbook of Analytical Separations*. 5: Elsevier Science B.V.; 2004. p. 297-319.
77. Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Reischl U, Gordon SM, Procop GW. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(11):5121-6.
78. Rathore M, Pai G, K Jayalakshmi T, Joshi D. Rapid detection of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* by real time PCR based assay in Indian population. *Recent Research in Science and Technology*. 2011;3(3):58-62.
79. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016;60(1):111-20.
80. Shanmugakani RK, Akeda Y, Yamamoto N, Sakamoto N, Hagiya H, Yoshida H, et al. PCR-Dipstick Chromatography for Differential Detection of Carbapenemase Genes Directly in Stool Specimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(6).
81. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N. Rapid and Sensitive PCR-Dipstick DNA Chromatography for Multiplex Analysis of the Oral Microbiota. *BioMed Research International*. 2014;2014:10.
82. Buderer NM. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Academic emergency*

medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine.

1996;3(9):895-900.

83. WHO. The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide 2018 [June 29, 2019]. Available from:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/2744443/WHO-CDS-TB-2018.19-eng.pdf>.

84. Singpanomchai N. Development of Allele specific-recombinase polymerase amplification for detection of Rifampicin and Isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Faculty of Allied Health Sciences: Chulalongkorn University; 2017.

85. Yaku H, Yukimasa T, Nakano S, Sugimoto N, Oka H. Design of allele-specific primers and detection of the human ABO genotyping to avoid the pseudopositive problem. *Electrophoresis*. 2008;29(20):4130-40.

86. TwistDx™. TwistAmp® DNA Amplification Kits Combined Instruction Manual [June 29, 2019]. Available from: https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/RPA-assay-design/ta01cmanual-combined-manual_revo_v1-3b.pdf?sfvrsn=14.

87. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22(3):276-82.

88. McGrath M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Warner DF. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(2):292-302.

89. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas E, Eldeen HS, Joseph S. Occurrence of disputed *rpoB* mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates phenotypically susceptible to rifampicin in a country with a low incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *BMC infectious diseases*. 2019;19(1):3.

90. Takawira FT, Mandishora RSD, Dhlamini Z, Munemo E, Stray-Pedersen B. Mutations in *rpoB* and *katG* genes of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* undetectable using genotyping diagnostic methods. *PanAfrican Medical Journal*. 2017;27:145.

91. Yasmin M, Mujtaba N, Tabassum R. Identification of Single Nucleotide Polymorphism in *rpoB* Gene among *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2014;16:946-50.

92. Wang S, Zhao B, Song Y, Zhou Y, Pang Y, Ou X, et al. Molecular characterization of the *rpoB* gene mutations of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from China. *Journal of Tuberculosis Research*. 2013;Vol.01No.01:8.
93. Zaker Bostanabad S, Fateh A, Seyedi K, Abdolrahimi F, Karimi A, Hadizadeh Tasbiti A, et al. Frequency and Molecular Characterization of Rifampicin-Resistance in *rpoB* Region of Multiple Drug Resistance (MDR) Isolates from Tuberculosis Patients in Southern Endemic Region of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2007;5(4):212-8.
94. Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, Zaha A. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(8):3119-22.
95. Ahmad S, Mokaddas E, Al-Mutairi N, Eldeen HS, Mohammadi S. Discordance across Phenotypic and Molecular Methods for Drug Susceptibility Testing of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in a Low TB Incidence Country. *PloS one*. 2016;11(4):e0153563-e.
96. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell*. 2001;104(6):901-12.
97. Xu K, Bi S, Ji Z, Hu H, Hu F, Zheng B, et al. Distinguishing nontuberculous mycobacteria from multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, China. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(6):1060-2.
98. Brandis G, Hughes D. Mechanisms of fitness cost reduction for rifampicin-resistant strains with deletion or duplication mutations in *rpoB*. *Scientific Reports*. 2018;8(1):17488.
99. Eddabra R, Neffa M. Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Moroccan Patients: Systematic Review. *Interdisciplinary Perspective on Infectious Diseases*. 2020;2020:5185896.
100. Sinha P, Srivastava GN, Tripathi R, Mishra MN, Anupurba S. Detection of mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):284.
101. Bahrmand Ahmad R, Titov Leonid P, Tasbiti Alireza H, Yari S, Graviss Edward A.

- High-Level Rifampin Resistance Correlates with Multiple Mutations in the *rpoB* Gene of Pulmonary Tuberculosis Isolates from the Afghanistan Border of Iran. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(9):2744-50.
102. Campodónico VL, Rifat D, Chuang Y-M, Ioerger TR, Karakousis PC. Altered *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Metabolism and Physiology Associated With *RpoB* Mutation H526D. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:494-.
103. Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, Mizuguchi Y, Nakamura M, Koga T, et al. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 1996;144(1):103-8.
104. Eddabra R, Neffa M. Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Moroccan Patients: Systematic Review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2020;2020:5185896.
105. Ning Q, Wang D, Cheng F, Zhong Y, Ding Q, You J. Predicting rifampicin resistance mutations in bacterial RNA polymerase subunit beta based on majority consensus. *BMC Bioinformatics*. 2021;22(1):210.
106. Nguyen QH, editor Genetic determinants and evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Vietnam : Toward new diagnostic tools 2016.
107. Marín M, García de Viedma D, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(11):4293-300.
108. Khosravi AD, Meghdadi H, Ghadiri AA, Alami A, Sina AH, Mirsaeidi M. *rpoB* gene mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from extrapulmonary sites. *Apmis*. 2018;126(3):241-7.
109. Kanokudom S, Assawakongkarat T, Akeda Y, Ratthawongjirakul P, Chuanchuen R, Chaichanawongsaroj N. Rapid detection of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from fresh pork meat and pig cecum samples using multiplex recombinase polymerase amplification and lateral flow strip analysis. *PloS one*. 2021;16(3):e0248536.
110. Naum M, Lampel KA. Analytical Methods | DNA-Based Assays. In: Fuquay JW,

editor. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 221-5.

111. Larrea-Sarmiento A, Stack JP, Alvarez AM, Arif M. Multiplex recombinase polymerase amplification assay developed using unique genomic regions for rapid on-site detection of genus *Clavibacter* and *C. nebraskensis*. Scientific Reports. 2021;11(1):12017.

112. Singpanomchai N, Akeda Y, Tomono K, Tamaru A, Santanirand P, Ratthawongjirakul P. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric detection. PloS one. 2021;16(6):e0253235.

113. BIO-ARRAY T. Standard protocol for Genetic Testing Using C-PAS series. In: BIO-ARRAY T, editor.

114. Boyle DS, McNerney R, Teng Low H, Leader BT, Pérez-Osorio AC, Meyer JC, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by recombinase polymerase amplification. PloS one. 2014;9(8):e103091.

115. Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. PloS one. 2012;7(2):e30600-e.

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

117. Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(1):152-7.

118. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, van Embden JD. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. Journal of Clinical Microbiology. 1992;30(7):1772-7.

119. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, 2nd, Siddiqui S, Khalaf CN, et al. Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34(8):2007-10.

120. Goosen WJ, Kerr TJ, Kleynhans L, Warren RM, van Helden PD, Persing DH, et al. The Xpert MTB/RIF Ultra assay detects *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) and African elephants (*Loxodonta africana*). Scientific Reports. 2020;10(1):14482.





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาว มัชฐาวี โปธิกนิษฐ
วัน เดือน ปี เกิด	20 สิงหาคม 2535
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่ปัจจุบัน	577 ซอยประดิษฐ์มนูธรรม 9 ถนนประดิษฐ์มนูธรรม เขตวังทองหลาง แขวง สะพานสอง กทม.10310



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY