

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุขที่สำคัญซึ่งทำให้ประชากรไทยเสียชีวิตประมาณปีละ 2-3 ล้านคน และยังมีปัญหามากขึ้นเมื่อมีการดื้อยาแบบหลายชนิด (Multi-drug resistant หรือ MDR-TB) ของเชื้อวัณโรค ทำให้มีผลต่อการรักษาและการควบคุมโรค ในการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความจำเพาะของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยและสืบหาถิ่นที่บ่งบอกความต้านทานยาปฏิชีวนะ เพื่อที่จะจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาและดื้อต่อยา คณะผู้วิจัยได้รับความร่วมมือจากกองวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข ในการเก็บตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่ไวและดื้อต่อยา หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ทำการสกัดดีเอ็นเอออกมาวิเคราะห์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ลำดับเบสในส่วนของ 16S rRNA, Internal transcribed spacer (ITS) และ *rpoB* gene ผลการทดลองพบว่า ถ้าใช้ไพรเมอร์ 16SF และ 16SR ซึ่งเพิ่มขยายยีนของ 16S rRNA จะได้ชิ้น ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst* I, *Hinc* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III และ *EcoR* I แล้วปรากฏว่าไม่สามารถบอกความแตกต่างของสายพันธุ์ต่างๆ ได้ เมื่อทำ PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ITSF และ ITSR เพื่อเพิ่มขยายดีเอ็นเอในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบส เมื่อนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ava* II, *Hinc* II, *Sua* 3AI, *Sty* I, *Rsa* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Hinf* I, *EcoR* I, *Nde* I, *Kpn* I, *Xba* I, *Dra* III ปรากฏว่าไม่สามารถบอกความแตกต่างได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ได้ทำ PCR-RFLP ส่วนของยีน *rpoB* โดยใช้เอนไซม์ *Sua* 3AI ปรากฏว่าได้ DNA pattern ที่เหมือนกัน การหาลำดับเบสของยีน ITS และ *rpoB* ของเชื้อที่ไวต่อยาและดื้อต่อยา พบว่ามีความแตกต่างกันในลำดับเบส อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าวิธี PCR-RFLP ของ 16S rRNA, ITS และ *rpoB* gene ไม่สามารถบอกความแตกต่างของสายพันธุ์และการดื้อยาได้ เนื่องจากลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่การวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และบ่งบอกถึงการดื้อยาแต่ละชนิดได้ แต่ต้องเลือกยีนที่เป็นสาเหตุของการดื้อยานั้น

Tuberculosis is a health problem disease which cause 2-3 million of Thai death. The more virulence of disease was developed in associated with the outbreak of multi-drug resistance. In this studies we tried to differentiate the *Mycobacterium* strain, a causative agent, and tried to link with the multi-drug resistant. The samples were collected from several provinces of Thailand including sensitive and drug-resistant strains. After culture, the bacterium DNA was isolated and analyzed using PCR-RFLP technique. Three part of bacterium DNA were amplified by specific primers and digested with restriction endonuclease. The Primer 16SF and 16SR amplified 1.5 kilobase of 16S rRNA. After digested with *Pst* I, *Hinc* II, *Hae* III, *Hinf* I, *Hind* III and *EcoR* I. The PCR-RFLP patterns were similar to all strains. The amplification of internal transcribed spacer (ITS) using ITSF and ITSr gave one kilobase DNA fragment. After digested with thirteen restriction endonucleases including *Ava* II, *Hinc* II, *Sua* 3AI, *Sty* I, *Rsa* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Hinf* I, *EcoR* I, *Nde* I, *Kpn* I, *Xba* I, *Dra* III, the DNA pattern could not be differentiated. The PCR-RFLP of *rpoB* gene using *Sau* 3AI, Iso gave similar pattern. The of DNA sequences of ITS and *rpoB* gene of sensitive and resistant strains showed that there were different in DNA sequences because of sequence insertion and deletion. From these results suggested that the PCR-RFLP could not differentiated the strain of *Mycobacterium* but it can be achieved by using DNA sequence analysis .