Thesis Title	DNA Fingerprinting of *Mycobacterium avium* in HIV-Infected Patients
Author	Mr. Naowarat Kunyanone
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Suchart Punjaisee — Chairperson
	Assoc. Prof. Prasit Palittapongarnpim — Member
	Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai — Member
	Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi — Member

ABSTRACT

Three hundred and ninety-seven HIV-infected patients with prolonged fever of unknown origin for at least 2 weeks or diagnosed as tuberculosis were enrolled from 4 hospitals in Chiang Mai including Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Nakornping Hospital, Sanpatong Hospital and Sansai Hospital during 2001 to 2003. Blood and sputum samples were screened for mycobacterial organisms. Blood were injected into BACTEC MYCO/F Lytic bottles then incubated in BACTEC 9120 system automatic incubator for 6 weeks. The flagged bottles were removed and sub-cultured on solid media and AFB staining was performed. Sputum was submitted to AFB staining and conventional culture. The sputum was decontaminated and digested with NALC-NAOH then cultured on LJ and Middlebrook 7H10 media for 8 weeks. The mycobacteria were identified by PCR-REA method. In case of *M. avium*-infected patients, their environmental samples (soil, waters and stool of live stock) were collected and cultured for mycobacteria. The results showed that three hundred and fifty-six mycobacteria were isolated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

from patients and their environment. Two hundred and eighty-five isolates of slow-growing mycobacteria (*M. tuberculosis* 91, *M. avium* 72, *M. intracellulare* 40, *M. scrofulaceum* 38, unclassified MAC 16, *M. kansasii* 1 and *Mycobacterium* spp. 27 isolates) along with 71 rapid-growing mycobacteria isolates were found. The isolation of *M. avium* and *M. intracellulare* were confirmed by dot blot hybridization with MV222- and MI231- probe, respectively. Most of the environmental mycobacteria isolates were rapid-growing (71 isolates) whereas 57 slow–growing mycobacteria isolates were identified to be *Mycobacterium* spp. (26 isolates), *M. intracellulare* (12 isolates), *M. scrofulaceum* (11 isolates), unclassified MAC (7 isolates) and *M. kansasii* (1 isolate). *M. avium* was not found in environmental samples, therefore its habitat could not be specified. The RFLP of 76 *M. avium* isolates (72 previous isolates and 4 additional isolates) from 39 patients were studied using the IS*1245* hybridization probe. Those varieties of *M. avium* DNA fingerprints could be categorized into 5 groups with 23 clusters based on number of separated bands. The first group included 6 clusters (A-F) carrying 17 isolates from 9 patients, showed 2-4 bands. The second group included 3 clusters (U-W) carrying 9 isolates from 4 patients, showed 8-9 bands. The third group included 4 clusters (Q-T) carrying 9 isolates from 5 patients, showed 13-14 bands. The forth group included 10 clusters (G-P) carrying 21 isolates from 10 patients, showed 17-31 bands. The fifth group carried 20 isolates from 11 patients showed non-existence of IS*1245*. The absence of IS1245 was successfully confirmed by multiplex PCR using the P1 and P2 primers for IS*1245* detection and 16SC and 23SG primers for the mycobacteria genome detection. The cluster C carrying 8 isolates from 4 patients was considered to carry the most number of mycobacteria isolates. It was also observed that one patient was re-infected with cluster U after recovered from cluster C infection.

In conclusion, the IS*1245* RFLP patterns were found to be highly diverse. The diversity was 82%. Therefore, the patients would be more likely infected by environmental *M. avium* than specific *M. avium* outbreak.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Mycobacterium avium* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี
ผู้เขียน	นาย เนาวรัตน์ กันยานนท์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. สุชาติ ปันจัยสีห์ ประธานกรรมการ รศ. นพ. ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ กรรมการ ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย กรรมการ ผศ. ดร. วาสนา ศิริรังษี กรรมการ

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีจำนวน 397 ราย ที่มีอาการเป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุมานานอย่างน้อย 2 สัปดาห์ หรือได้รับการวินิจฉัยตามอาการว่าเป็นวัณโรค ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 4 แห่ง คือ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โรงพยาบาลนครพิงค์ โรงพยาบาลสันป่าตอง และโรงพยาบาลสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง ปี พ.ศ. 2545 โดยนำเลือดและเสมหะของผู้ป่วยไปตรวจหาเชื้อ mycobacteria เลือดได้นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อใน MYCO/F lytic medium ในเครื่อง BACTEC9120 system automatic incubator เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อเครื่องมือตรวจพบความเจริญของเชื้อในขวด hemoculture จะนำเอาเลือดมาเพาะเลี้ยงเชื้อ mycobacteria ในอาหารแข็งและย้อม AFB สำหรับเสมหะนำมาทำการย้อม AFB และเพาะเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมโดยทำการกำจัดเชื้อปนเปื้อนและย่อยด้วย NALC-NaOH และเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร LJ และ Middlebrook 7H10 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อตรวจพบการเจริญของเชื้อ mycobacteria ได้ทำการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR-REA เฉพาะในรายที่ตรวจพบ *M. avium* เท่านั้น ที่ทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเก็บสิ่งส่งตรวจจากสิ่งแวดล้อม เช่น ดินบริเวณพื้นบ้าน, น้ำ และมูลสัตว์ต่างๆ มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ mycobacteria ผลจากการศึกษาพบเชื้อ mycobacteria จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมทั้งหมด 356 isolates เป็นเชื้อในกลุ่ม slow-growing mycobacteria จำนวน 285 isolates ได้แก่ *M. tuberculosis* complex 91 isolates, *M. avium* 72 isolates, *M. intracellulare* 40 isolates, *M. scrofulaceum* 38 isolates, unclassified MAC 16 isolates, *M. kansasii* 1 isolate, *Mycobacterium* spp. 27 isolates และเชื้อในกลุ่ม rapid-growing mycobacteria 71 isolates เมื่อพบเชื้อ *M. avium* และเชื้อ *M. intracellulare* ได้ทำการยืนยันผลโดยวิธี dot blot hybridization โดยใช้ MV222 probe และ MI231 probe, ตามลำดับ สำหรับเชื้อ mycobacteria ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่คือเชื้อในกลุ่ม rapid-growing mycobacteria จำนวน 71 isolates และเชื้อในกลุ่ม slow-growing mycobacteria จำนวน 57 isolates ได้แก่เชื้อ *Mycobacterium* spp. (26 isolates), *M. intracellulare* (12 isolates), *M. scrofulaceum* (11 isolates), unclassified MAC (7 isolates) และ *M. kansasii* (1 isolate) ไม่พบเชื้อ *M. avium* เลย ทำให้ไม่อาจสรุปได้ว่าแหล่งต้นตอของเชื้อนี้อยู่ที่ไหน

เมื่อทำการศึกษาถึง RFLP ของเชื้อ *M. avium* ทั้งหมด 76 isolates (72 isolates จากการศึกษาเบื้องต้น และได้รับเพิ่มเติมมา 4 isolates) จากผู้ป่วยจำนวน 39 ราย โดยใช้ IS*1245* เป็น probe พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกเป็น 23 clusters แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ I ประกอบด้วย 6 clusters (A-F) มีเชื้อจำนวน 17 isolates จากผู้ป่วย 9 ราย มีจำนวน band 2-4 bands, กลุ่มที่ II ประกอบด้วย 3 clusters (U-W) มีเชื้อจำนวน 9 isolates จากผู้ป่วย 4 ราย มีจำนวน band 8-9 bands, กลุ่มที่ III ประกอบด้วย 4 clusters (Q-T) มีเชื้อจำนวน 9 isolates จากผู้ป่วย 5 ราย มีจำนวน band 13-14 bands, กลุ่มที่ IV ประกอบด้วย 10 clusters (G-P) มีเชื้อจำนวน 21 isolates จากผู้ป่วย 10 ราย มีจำนวน band 17-31 bands และกลุ่มที่ V มีเชื้อจำนวน 20 isolates จากผู้ป่วย 11 ราย ซึ่งตรวจไม่พบ IS*1245* เชื้อในกลุ่มนี้ได้รับการตรวจยืนยันว่าไม่พบ IS*1245* จริง โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ที่ใช้ P1 และ P2 เป็น primers สำหรับ IS*1245* และ ใช้ 16SC และ 23SG เป็น primers สำหรับ mycobacteria ทั้งนี้พบว่า Cluster C มีจำนวนเชื้อมากที่สุดคือ 8 isolates จากผู้ป่วย 4 ราย และพบว่ามีผู้ป่วย 1 รายที่ติดเชื้อ Cluster U ซ้ำใหม่ หลังจากที่หายจากการติดเชื้อ Cluster C

สรุปจากการศึกษา RFLP ของเชื้อ *M. avium* ที่แยกได้จากผู้ป่วยพบว่ามีความหลากหลายมาก (82% diversity) แสดงว่าผู้ป่วยน่าจะมีการติดเชื้อโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมมากกว่าจากการแพร่กระจายของเชื้อใดเชื้อหนึ่งโดยเฉพาะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved