สารบัญ

หน้า

หลักสูตรวิทศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์

การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* อย่างรวดเร็ว โดยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification 1

ผู้วิจัย EMMANUEL KABALISA

การศึกษาไมโครไบโอตาในอุจจาระของเด็กทารกในจังหวัดอุบลราชธานี 4

ผู้วิจัย JACKSON ALOR MEYIN BELBAK

การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอฟาจจากแหล่งน้ำเสียที่จำเพาะต่อเชื้อ Escherichia coli 6

ผู้วิจัย จุฑามาศ ชุมเสน

ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช 10

ผู้วิจัย ชัยวุฒิ พิศพงษ์

การศึกษาอณูวิทยาและระบาดวิทยาของ *Staphylococcus aureus* ที่มีความไวต่อยา vancomycin ลดลง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12

ผู้วิจัย ลออ จันทริมา

การคัดแยก จำแนก และศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกจากอุจจาระเด็กแรกเกิด เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งวัคซีน 15

ผู้วิจัย ลักษณา เวฬุวนารักษ์

ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ สำหรับการประยุกต์ใช้ทางคลินิกในการพัฒนาโรค ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก 17

ผู้วิจัย อานนท์ วงศ์คำ

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* อย่างรวดเร็ว โดยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification
ผู้วิจัย	:	EMMANUEL KABALISA
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ปราการกมานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวนา พนมเขต
คำสำคัญ	:	*Burkholderia pseudomallei*, LAMP

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแกรมลบที่เป็นสาเหตุก่อโรคเมลิออยโดสิส ซึ่งเป็นโรคที่พบได้บ่อยในประเทศเขตร้อนทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศออสเตรเลีย เมื่อมีการติดเชื้อจะก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่รุนแรง การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีความรวดเร็วจึงมีความจำเป็นอย่างมากที่จะช่วยให้ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที โดยทั่วไปการตรวจหาเชื้อจะอาศัยการเพาะเลี้ยงหรืออาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทั้งสองเทคนิคจำเป็นต้องใช้ประสบการณ์ในการตรวจและเครื่องพีซีอาร์มีบริการเฉพาะบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาการตรวจหาเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* โดยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดด้านเครื่องมือและสามารถพัฒนาต่อไปเป็นการตรวจแบบ point-of-care ได้ ผลการศึกษาพบว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นมีขีดจำกัดการตรวจที่ความเข้มข้น 10 pg/ µl เมื่อทำการศึกษาในสิ่งส่งตรวจทางคลินิกพบว่ามีความไวร้อยละ 100 โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามระหว่างสายพันธ์หรือกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Salmonella spp. Shigella spp. Escherichia coli Klebsiella pneumonia Pseudomonas aeruginosa Burkholderia thailandesis* และ *Burkholderia mallei* (มีความจำเพาะร้อยละ 100) เมื่อพิจารณาถึงผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นสามารถพัฒนาไปสู่การตรวจ point-of-care ได้ต่อไป

ABSTRACT

TITLE : DEVELOPMENT OF RAPID DETECTION FOR *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION.
AUTHOR : EMMANUE L KABALISA
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. PREEDA PRAKRANKAMANANT, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASST. PROF. PAWANA PANOMKET, Ph.D.
KEYWORDS : *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*, LAMP.

Burkholderia pseudomallei, a gram-negative bacteria, is the causative agent of melioidosis, a tropical infectious disease, which is endemic to Southeast Asia and Northeast Australia. Because of its clinical manifestation as septicemic and acute melioidosis which can progress up to a severe infection, a rapid laboratory diagnosis is needed in order to give the effective treatment to the patients confirmed as being infected by *B. pseudomallei* in a timely manner. Culture and PCR assays are commonly used to detect *B. pseudomallei*, but both tests require experienced microbiologists which are only available in a few research laboratories worldwide. Despite the higher sensitivity than culture, PCR assays also require experienced personnel and positive controls which are also relatively costly for resource-limited settings. The aim of this study was to develop a rapid detection for *B. pseudomallei* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) which could be an affordable alternative molecular assay that can be used as a point-of-care diagnostic test applicable in poor resource health systems therefore achieving an effective treatment of patients in case. The LAMP developed in this study was sensitive and specific for the laboratory detection of *B. pseudomallei*. The lower limit of detection was 10 pg/µl and the LAMP developed in this study was positive for 73 clinical samples collected from patients diagnosed with cultured-confirmed melioidosis (analytical sensitivity 100%), but it was negative for other bacteria used in this study including *Salmonella spp., Shigella spp., Escherishia coli*, *Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, B. thailandesis, and B. mallei.* All 18 negative samples for melioidosis by bacterial culture were negative by LAMP (analytical specificity, 100%). The

diagnostic accuracy of LAMP was 100%. Considering the specificity, sensitivity and diagnostic accuracy, the LAMP assay developed in this study can be used in health care systems as a point-of-care laboratory assay for rapid detection of *B. pseudomallei*.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การศึกษาไมโครไบโอตาในอุจจาระของเด็กทารกในจังหวัดอุบลราชธานี
ผู้วิจัย	:	JACKSON ALOR MEYIN BELBAK
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ
คำสำคัญ	:	GUT MICROBIOTA, BIFIDOBACTERIUM GROUPS, GUT COMPOSITION

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจแบคทีเรียสปีชีส์ *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. ในอุจจาระของเด็กแรกเกิดที่เกิดด้วยวิธีธรรมชาติ มีสุขภาพดี และดื่มนมแม่ ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างอุจจาระของเด็กอายุ 2 เดือน ได้จำนวน 50 โคโลนี บนจานเพาะเชื้อ MRS agar ที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคาร์บอเนต ผลการย้อมสีแกรมพบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีรูปร่างคล้ายอักษรตัววายและรูปร่างท่อน การทดสอบเอนไซม์คะตะเลสให้ผลลบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตเป็นเชื้อ *Bifidobacterium* sp. จึงทำการจำแนกเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพร์เมอร์และสภาวะพีซีอาร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Bifidobacterium* sp. ในสปีชีส์ต่าง ๆ ได้แก่ *Bifidobacterium infantis Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium breve* ผลการจำแนกพบว่าทุกไอโซเลตไม่ถูกจัดในสปีชีส์ *B. bifidum* และ *B. longum* เนื่องจากไม่มีแบนดีเอนเอที่จำเพาะเกิดขึ้น สำหรับการจำแนกสปีชีส์ *B. breve* พบดีเอนเอแบนขนาด 288 bp. จากแบคทีเรียไอโซเลต JB1 จึงจำแนกเชื้อเป็น *B. breve* ส่วนการจำแนกสปีชีส์ *B. Infantis* พบว่ายังไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากมีดีเอนเอแบนที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะของพีซีอาร์ให้มีความเหมาะสมต่อไป

ABSTRACT

TITLE : STUDY OF FECAL MICROBIOTA IN HEALTHY INFANT IN UBON RATCHATHANI PROVINCE
AUTHOR : JACKSON ALOR MEYIN BELBAK
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. MARUTPONG PANYA, Ph.D.
CO-ADVISOR : PROF. PONGSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.
KEYWORDS : GUT MICROBIOTA, *BIFIDOBACTERIUM* GROUPS, GUT COMPOSITION

The objective of this study was to investigate the bacterial species of *Bifidobacterium ssp*. and *Lactobacillus ssp.* presented in fecal samples of healthy breastfed infants. The selection of species for the study was based on the predominate species in the human gastrointestinal tract. Overall, one feces sample was collected from a volunteer who was born by cesarean birth. He was two months old of age. Fifty single colonies with a clear zone around their colonies were selected from a MRS agar medium containing calcium carbonate under anaerobic conditions. Gram staining revealed that all bacterial isolates were gram-positive with a Y-like and bacilli shape, catalase negative, which further indicated that all these fifty isolates were possibly of the *Bifidobacterium* species. For these reasons, the specific primers and PCR condition for identification of *Bifidobacterium* species including *Bifidobacterium* infantis, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve* were used. The result demonstrated that all bacterial isolates were not *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium* longum, due to the specific band not being detected from the genomic DNA sample. For *Bifidobacterium breve*, the bacterial isolates JB1 could show the specific band of 288 bp., which indicated that this isolate belonged to B. breve. For identification of *Bifidobacterium infantis*, it was demonstrated that all genomic DNA showed non-specific bands that were still presented in the mixture of the amplified PCR product. Thus, the PCR conditions are required for optimization.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอฟาจจากแหล่งน้ำเสียที่จำเพาะต่อเชื้อ Escherichia coli
ผู้วิจัย	:	จุฑามาศ ชุมเสน
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	รองผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธารินี ไชยวงศ์
	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาริชาติ พุ่มขจร
คำสำคัญ	:	แบคเทอริโอฟาจ, เอสเชอริเชีย, โคไล, ฟาจเทอราปี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคเทอริโอฟาจจากแหล่งน้ำเสีย และเพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอฟาจที่จำเพาะต่อเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกแบคเทอริโอฟาจ จากตัวอย่างน้ำเสียจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำเสียบริเวณกุดปลาขาว (bacteriophage JC01) น้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ (bacteriophage JC02) และน้ำจากบ่อบำบัดน้ำเสียโรงพยาบาลโขงเจียม (bacteriophage JC03) การศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอฟาจต่อการยับยั้งเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล โดยวิธี spot test และ plaque assay พบว่าแบคเทอริโอฟาจสามารถยับยั้งเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ได้อย่างจำเพาะ ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น ๆ พบว่าแบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเฉพาะเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล เท่านั้น ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอฟาจในการยับยั้งเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 กลุ่มขึ้นไป พบว่าแบคเทอริฟาจ JC01 แบคเทอริฟาจ JC02 และแบคเทอริฟาจ JC03 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล ร้อยละ 51.7 (138/267), 52.4 (140/267) และ 28.5 (76/267) ตามลำดับ ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอฟาจในการทนต่อสารเคมีและอุณหภูมิพบว่าแบคเทอริโอฟาจทั้งสามสามารถทนต่อ distilled water และ 0.85% normal saline ได้นานกว่า 40 นาที แต่ไม่สามารถทนต่อสารละลาย 10% ethanol และ 1% hydrogen peroxide ผลการทดสอบความทนอุณหภูมิพบว่าแบคเทอริโอฟาจ JC01 สามารถทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 60 นาที แต่แบคเทอริโอฟาจ JC02 และแบคเทอริโอฟาจ JC03 สามารถทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้เพียง 45 นาที ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจ ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจ JC01 และ JC02 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ DNase สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจ JC03 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I *Hin*dIII และ DNase แต่สารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 ชนิด ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ RNase A ซึ่งสรุปได้ว่าแบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 ชนิด มีสารพันธุกรรมเป็น

double-stranded DNA การศึกษารูปร่างของแบคเทอริโอฟาจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า แบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 ชนิด มีส่วนหัวเป็นรูปหกเหลี่ยม มีหางยาว มีขนาดอนุภาคประมาณ 200 นาโนเมตร เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะและชนิดสารพันธุกรรมของแบคเทอริโอฟาจทั้ง 3 ชนิด พบว่าจัดอยู่ในวงศ์ *Myoviridae* ออร์เดอร์ *Caudovirales* ดังนั้น แบคเทอริโอฟาจที่แยกได้ในงานวิจัยครั้งนี้จึงน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อในขั้นสูงต่อไป

ABSTRACT

TITLE : SCREENING AND CHARACTERIZATION OF ESCHERICHIA COLI-SPECIFIC BACTERIOPHAGE ISOLATED FROM SEWAGE WATER
AUTHOR : JUTHAMAS CHUMSEN
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. MARUTPONG PANYA, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. TARINEE CHAIWONG, Ph.D.
: ASST. PROF. PARICHAT PHUMKHACHORN, Ph.D.
KEYWORDS : BACTERIOPHAGE, ESCHERICHIA COLI, PHAGE THERAPHY

The objectives of this study were to isolate and to characterize bacteriophage specific to *Escherichia coli* from different sources of waste waters. Based on spot test and plaque assay, the result showed that bacteriophages could be isolated from waste water treatment plant Kudprakhow (bacteriophage named JC01), Sappasitthiprasong hospital (bacteriophage named JC02), and Khongjiam hospital (bacteriophage named JC03). Host range determination of bacteriophage revealed that all bacteriophage types had high specific host range only for *E. coli*. Inhibition of clinical isolates *E. coli* with multidrug resistant property showed that bacteriophage JC01, JC02, and JC03 inhibited the growth of *E. coli* at 51.7% (138/267) 52.4% (140/267), and 28.5% (76/267), respectively. Bacteriophage stability in different solutions and heat at different time points demonstrated that all bacteriophages could tolerate 0.85% normal saline and distilled water for more than 40 minutes but could not tolerate 10% ethanol and 1% hydrogen peroxide at every time point. Heat stability showed that bacteriophage JC01 had resisted at 60 °C after 60 minutes of incubation. Bacteriophage JC02 and JC03 showed the ability to resist the temperature of 60 °C after 45 minutes of incubation. The result of bacteriophage classification by genome analysis demonstrated that the extracted DNA of JC01 and JC02 could be digested with *Hind*III and DNase but not for RNase. For bacteriophage JC03, the extracted genome could be digested with *Nco*I, *Hind*III and DNase, but not for RNase. This result indicated that the bacteriophage JC01, JC02, and JC03 genome was a DNA virus and their genome was a double-stranded DNA (dsDNA). In

addition to viral genome analysis, determination of viral particle morphology by transmission electron microscope can also be used to classify bacteriophage group. The result found that all bacteriophages had the viral particle which composed of a head with a hexagonal shape and long tails with contractile. The size from head to tail was approximately 200 nm. Based on Intraclass correlation coefficient (ICC) classification of prokaryotic (bacterial and archaeal), bacteriophage JC01, JC02, and JC03 could be classified in Family *Myoviridae*, Order *Caudovirales*. Therefore, the bacteriophages derived from this study could be used to study their potential use in further advanced steps.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช
ผู้วิจัย	:	ชัยวุฒิ พิศพงษ์
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ดร.รสริน การเพียร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กาญจนา แปงจิตต์
คำสำคัญ	:	ฮีโมโกลบินเอช, ความรุนแรงของโรค, อาการทางคลินิก, เกณฑ์การประเมินคะแนน, ปัจจัยที่ศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอช ได้แก่ อาการทางคลิกนิกของผู้ป่วย ดัชนีการสร้างเรติคูโลไซต์ การแสดงออกของ CD55 และ CD59 บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ระดับของอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดง ระดับของเอนไซม์ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และผลการตรวจเคมีคลินิกในงานตรวจประจำวัน ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคฮีโมโกลบินเอชจำนวน 44 ราย จากการใช้เกณฑ์การประเมินคะแนนในการศึกษาครั้งนี้ สามารถแบ่งระดับความรุนแรงของผู้ป่วยได้ 3 กลุ่มคือ รุนแรงน้อย จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 39) รุนแรงปานกลาง 21 ราย (ร้อยละ 48) และ รุนแรงมาก 6 ราย (ร้อยละ 13) ผลการวิเคราะห์อัลฟาจีโนไทป์ในกลุ่มที่รุนแรงน้อยพบว่าส่วนใหญ่เป็นชนิดดีลีชั่น ขณะที่ในกลุ่มที่รุนแรงมากพบเป็นชนิดนอนดีลีชั่นทั้งหมด แต่จีโนไทป์ชนิดนอนดีลีชั่นพบได้ทั้งกลุ่มที่รุนแรงน้อย ปานกลางและมาก ชี้ให้เห็นถึงความรุนแรงที่หลากหลายในฮีโมโกลบินเอชชนิดนอนดีลีชั่น ผลการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอชพบว่า ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงและสามารถใช้แบ่งผู้ป่วยที่รุนแรงน้อยกับผู้ป่วยที่รุนแรงมากได้ คือ ขนาดของม้าม เอนไซม์แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส และระดับเฟอร์ไรติน ปัจจัยที่น่าจะมีผลต่อความรุนแรงของโรคฮีโมโกลบินเอช ได้แก่ ดัชนีการสร้างเรติคูโลไซต์ เอนไซม์อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส ระดับคอมพลีเมนท์ C3 ระดับบิลลิรูบินทั้งหมด ระดับบิลลิรูบินที่ละลายน้ำ และระดับบิลลิรูบินที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้น่าจะช่วยทำนายความรุนแรงของโรคและมีประโยชน์ในการจัดการดูแลรักษาผู้ป่วยที่เหมาะสมต่อไป

ABSTRACT

TITLE : DETERMINANT FACTOR OF DISEASE SEVERITY IN HB H DISEASE
AUTHOR : CHAIWOOT PISPONG
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ROSSARIN KARNPEAN, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASST. PROF. KANJANA PANGJIT, Ph.D.
KEYWORDS : HB H, DISEASE SEVERITY, CLINICAL COURSE, SCORING CRITERIA, DETERMINANT FACTORS

This study aimed to investigate determining factors for disease severity in patients with Hb H disease including clinical courses, reticulocyte production index (RPI), expression of CD55 and CD59 on red blood cells, reactive oxygen species (ROS) in red blood cells, G-6-PD activity and clinical chemistry analysis. This study was conducted on 44 patients with Hb H disease. From scoring criteria in this study, Hb H patients were categorized into 3 groups of severity: 17 patients (39%) were mild, 21 patients (48%) were moderate, and 6 patients (13%) were severe phenotype. For α-Globin genotype, the deletional type was found majority of the mild cases, whereas for the severe Hb H disease, all genotype was found to be the non-deletional type. Some cases of non-deletional were presented with mild and moderate phenotype, suggesting that non-deletional Hb H disease was remarkably variable, even among patients who had identical genotypes. The investigation of determining factors in this study demonstrated that factors that significantly correlated with severity and were considerably recommended to use to distinguish mild from severe Hb H patients were spleen size, aspartate aminotransferase (AST) and ferritin level. Parameters that might influence severity of Hb H disease included RPI, alanine phosphatase (ALP), complement C3 level, total bilirubin, direct bilirubin and indirect bilirubin, which needs further study to have a more clear understanding of these factors. The wealth of information in this study may provide insight regarding the prediction of clinical courses and could help to formulate proper management for these patients.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การศึกษาอณูวิทยาและระบาดวิทยาของ *Staphylococcus aureus* ที่มีความไวต่อยา vancomycin ลดลง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ผู้วิจัย	:	ลออ จันทริมา
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวนา พนมเขต
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา ปราการกมานันท์
คำสำคัญ	:	*Staphylococcus aureus*, MRSA, Vancomycin, hVISA, VISA

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล และมีปัญหามากกับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ โดยเฉพาะยา methicillin อุบัติการพบเชื้อ methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) มีรายงานทั่วโลก ยาในกลุ่มไกลโคเปปไทด์เป็นยาทางเลือกของการรักษาการติดเชื้อ MRSA ยา vancomycin เป็นยาที่ใช้มากที่สุดในโรงพยาบาลหลายแห่ง vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) ถูกพบในปี 1997 และมีการรายงานในโรงพยาบาลบางแห่งในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา MRSA ที่มีความไวต่อยา vancomycin ลดลงในบุคคลากรทางการแพทย์ ตรวจหาความชุกของเชื้อ hVISA, VISA และ VRSA ในโรงพยาบาลภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และตรวจหายีนดื้อยาชนิด *vanA, vanB, vanC1* และ *vanC2/3* ใน MRSA จาก nasal swab จำนวน 54 ตัวอย่าง ของบุคลากรทางการแพทย์ แยกเชื้อ *S. aureus* ได้ 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.9) เชื้อ *S. aureus* 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.6) เป็น MRSA ด้วยวิธีตรวจคัดกรอง cefoxitin disk เชื้อ MRSA 182 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์และโรงพยาบาลศรีสะเกษ ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนตุลาคม 2561 มี MIC ของยา vancomycin อยู่ในช่วง 1-8 μg/ml มี MIC_{50} และ MIC_{90} คือ 4 μg/ml และมีเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion agar ที่มียา vancomycin 6 μg/ml 117 สายพันธุ์ เป็นเชื้อ hVISA จำนวน 89 สายพันธุ์ และเป็น VISA 10 สายพันธุ์ ไม่พบเชื้อสายพันธุ์ VRSA และไม่พบยีนดื้อยาชนิด *vanA, vanB, vanC1* และ *vanC2/3* ด้วยวิธี PCR

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าพบเชื้อ MRSA ที่แยกได้จาก nasal swab ของบุคลากรทางการแพทย์ และเชื้อ MRSA ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย มี MRSA ที่ลดความไวต่อยา vancomycin ลง ดังนั้นการแพร่กระจายของเชื้อ MRSA จำเป็นต้องให้ความตระหนักและควบคุมการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อตามหลักสากลในบุคลากรทางการแพทย์จึงจำเป็นต้องได้รับการฝึกและจริงจังในการปฏิบัติในงานประจำวัน

ABSTRACT

TITLE : MOLECULAR STUDY AND EPIDEMIOLOGY OF *Staphylococcus aureus* WITH REDUCE SUSCEPTIBILITY TO VANCOMYCIN IN NORTHEASTERN
AUTHOR : LA-OR JUNTRIMA
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. PAWANA PANOMKET, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASST. PROF. MARUTPONG PANYA, Ph.D.
: ASST. PROF. PREEDA PRAKRANKAMANANT, Ph.D.
KEYWORDS : *Staphylococcus aureus*, MRSA, VANCOMYCIN, hVISA, VISA

Staphylococcus aureus is a causative agent of nosocomial infection which has a lot of problems with the resistance of the antimicrobial, especially methicillin. Reports of incidents indicating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was found worldwide. Glycopeptide is the drug of choice for MRSA infection therapy. Vancomycin is mostly used in several hospitals. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) was found in 1997 and has been reported by hospitals in several countries, including Thailand. This study aimed to investigate MRSA with a reduced vancomycin susceptible carrier in the medical personnel, investigate the prevalence of hVISA, VISA and VRSA in the Northeast hospital, and detect *vanA, vanB, vanC* and *vanC2/3* in MRSA. There were fifty-four nasal swab samples. *Staphylococcus aurues* was isolated into 14 samples (25.9%). Three *S. aureus* isolates were methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) positive by the cefoxitin screening method (5.6%). A total of 182 MRSA isolates were collected from patients admitted to Sappasitthiprasong Hospital and Srisakate Hospital from October 2016 to October 2018. Vancomycin MIC were 1-8 µg/ml. MIC_{50} and MIC_{90} were 4 µg/ml. There were 117 isolates grown on the brain heart infusion agar supplemented with 6 µg/ml vancomycin. There were 89 isolates of hVISA and there were 10 isolates of VISA. There were no VRSA. There were no *vanA, vanB, vanC1* and *vanC2/3* genes by PCR.

This study concluded that MRSA was isolated from the nasal swab of the medical personnel. Clinical specimen from patients were MRSA isolated and these isolates had reduced susceptibility to vancomycin. Therefore, the spread of MRSA should be made

more aware of and concerned about. Universal precaution within the medical staff should be practiced and taken more seriously during routine work.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	การคัดแยก จำแนก และศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกจากอุจจาระเด็กแรกเกิด เพื่อใช้เป็นตัวนำส่งวัคซีน
ผู้วิจัย	:	ลักษณา เวฬุวนารักษ์
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารุตพงศ์ ปัญญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ศาสตราจารย์ ดร. พงศักดิ์ รัตนชัยกุณโสภณ
คำสำคัญ	:	*Lactobcillus rhamnosus*, โพรไบโอติก, วัคซีนชนิดกิน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก จำแนก และศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกจากอุจจาระของเด็กแรกเกิดที่เกิดโดยวิธีธรรมชาติและดื่มน้ำนมแม่ คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ศึกษา ได้แก่ การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การทนต่อกรดและเกลือน้ำดี การสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ การเกาะติดเซลล์ลำไส้ และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลำไส้ ผลการศึกษาพบแบคทีเรียโพรไบโอติกจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ LW01 LW02 LW09 และ LW10 การจัดจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* จึงกำหนดเป็น *L. rhamnosus* LW01 *L. rhamnosus* LW02 *L. rhamnosus* LW09 และ *L. rhamnosus* LW10 การทดสอบอิเล็กโตรทรานฟอร์เมชั่นด้วยเวกเตอร์ pRCEID-LC13.9 พบว่าเวกเตอร์สามารถเพิ่มจำนวนและควบคุมการเรืองแสงสีเขียวในเซลล์แบคทีเรีย *L. rhamnosus* 10 ได้ ดังนั้น แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต นี้ จึงเหมาะสำหรับนำไปทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกในขั้นสูงต่อไป เช่น การทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกในระดับสัตว์ทดลอง และการทดสอบใช้ในงานด้านพันธุวิศวกรรมเพื่อพัฒนาตัวนำส่งวัคซีนชนิดกิน

ABSTRACT

TITLE : ISOLATION, IDENTIFICATION, AND CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC BACTERIA'S PROPERTIES FROM INFANT' S FECES FOR POTENTIAL USE AS VACCINE DELIVERY VEHICELS
AUTHOR : LAKSANA WELOOWANARAK
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST.PROF. MARUTPONG PANYA, Ph.D.
CO-ADVISOR : PROF. PONSAK RATTANACHAIKUNSOPON, Ph.D.
KEYWORD : *Lactobcillus rhamnosus*, PROBIOTIC, VACCINE DELIVERY VECTOR

This study aimed to isolate, identify and characterize probiotic bacteria properties from feces of breast-fed infants who were born by vagina delivery. These properties include hemolysis, bile salt and acid tolerance, antimicrobial activity, antibiotic susceptibility, adhesion and cytotoxicity to intestinal cells. The study found that there were four bacterial isolates including LW01, LW02, LW09 and LW10. Bacterial species were identified by 16S rRNA sequence analysis. It demonstrated that the four isolates were *Lactobacillus rhamnosus*. Therefore, they were identified as L. *rhamnosus* LW01, *L.rhamno*sus LW02, *L. rhamnosus* LW09, and *L. rhamnosus* LW10. For the electrotransformation of plasmid pLC13.9:pLDH-PRO1:GFPuv to *L. rhamnosus* LW10 isolate, the result showed that the plasmid was able to duplicate and control the expression of green fluorescent protein (GFP) gene in all *L. rhamnosus* isolates. For these results, these candidate probiotic bacteria should be considered for the further study of probiotic properties in animal models and determination of genetic engineering for the development of a delivery vehicle of oral vaccines.

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ สำหรับการประยุกต์ใช้ทางคลินิกในการพัฒนาโรคของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก
ผู้วิจัย	:	อานนท์ วงศ์คำ
ชื่อปริญญา	:	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	:	ชีวเวชศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ แว่นรัมย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา ปราการกมานันท์
คำสำคัญ	:	รูปแบบของไวรัส, การกลายพันธุ์ของจีน *PI3KCA*, มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกมีอุบัติการณ์สูงในสตรีเพศทั่วโลก ซึ่งสาเหตุสำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัสแปปิลโลมาในมนุษย์ (Human papillomavirus; HPV; เอชพีวี) ปัจจัยของตัวเชื้อไวรัสและกลไกการป้องกันด้วยภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ความผิดปกติทั้งในระดับพันธุกรรมและนอกเหนือพันธุกรรม มีบทบาทสำคัญต่อการดำเนินโรคที่รุนแรงขึ้น ปัจจุบันตัวบ่งชี้ทางชีวภาพมีความสำคัญต่อการรักษา การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *PI3KCA* ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งและมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลาม จำนวน 53 ราย ด้วยเทคนิคโพลิเมอเรสเชนรีแอคชัน (PCR) ตรวจหารูปแบบของการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีด้วยเทคนิค Real-time PCR และทำนายความสัมพันธ์ในตัวบ่งชี้ชนิดไมโครอาร์เอ็นเอที่เป็นเป้าหมายของการกลายพันธุ์ในยีน *PIK3CA* ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ชีวสารสนเทศ ผลการศึกษาในผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งปากมดลูก กลุ่ม CIN I พบการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ร้อยละ 93.8 (15/16 ราย) กลุ่ม CIN II-III-CIS พบการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ร้อยละ 64.7 (11/17 ราย) สำหรับการกลายพันธุ์ที่ exon 20 พบร้อยละ 5.8 (1/17 ราย) และไม่พบการกลายพันธุ์ของทั้งสอง exon 20 ร้อยละ 29 (5/17 ราย) ผลการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามพบการกลายพันธุ์ที่ exon 9 ร้อยละ 70 (14/20 ราย) พบการกลายพันธุ์ที่ exon 20 ร้อยละ 20 (4/20 ราย) แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ของทั้งสอง exon ร้อยละ 20 (4/20 ราย) ผลการศึกษารูปแบบของไวรัสเอชพีวี ชนิด 16 และ 18 ในผู้ป่วยระยะก่อนมะเร็งปากมดลูก กลุ่ม CIN I พบมีรูปแบบไวรัสเป็น episome, integrated และ mixed ร้อยละ 31.3 (5/16 ราย) ร้อยละ 1.3 (2/16 ราย) และ ร้อยละ 56.0 (9/16 ราย) ตามลำดับ ในกลุ่ม CIN II-III-CIS พบ episome, integrated และ mixed ร้อยละ 23.0 (4/17 ราย), ร้อยละ 42.0 (7/17 ราย) และ ร้อยละ 35.0 (6/17 ราย) ตามลำดับ สำหรับผลการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกระยะลุกลามพบมีรูปแบบของไวรัสเป็น episome, integrated และ mixed ร้อยละ 35.0 (7/20 ราย), ร้อยละ 30.0 (6/20 ราย) และ ร้อยละ 35 (7/20 ราย) ตามลำดับ และผลการศึกษาการทำนายตัวบ่งชี้ชนิดไมโครอาร์เอ็นเอที่เป็นเป้าหมายของการกลายพันธุ์ในยีน *PIK3CA* พบตัวแทนไมโครอาร์เอ็นเอ 3 ชนิด ประกอบด้วย miR-124-3p, miR-381-3p

และ miR-339-5p การประยุกต์ใช้ตัวบ่งชี้ระหว่างรูปแบบของการติดเชื้อไวรัสเอชพีวีและการกลายพันธุ์ของยีน *PIK3CA* ที่มีตัวบ่งชี้สำคัญในชนิดไมโครอาร์เอ็นเอ น่าจะสามารถใช้เพื่อพยากรณ์โรคในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

ABSTRACT

TITLE : BIOLOGICAL MARKER FOR CLINICAL APPLICATION IN DEVELOPMENT OF CERVICAL PATIENTS
AUTHOR : ANON VONGKAM
DEGREE : MASTER OF SCIENCE
MAJOR : BIOMEDICAL SCIENCES
ADVISOR : ASST. PROF. SURASAK WANRAM, Ph.D.
CO-ADVISOR : ASST. PROF. PREEDA PRAKRANKAMANANT, Ph.D.
KEYWORDS : PHYSICAL STATUS, *PI3KCA* MUTATION, CERVICAL CANCER

Cervical cancer, a high incidence of death in women cancer worldwide, is caused by the human papilloma virus (HPV) infection. Abnormality of HPV pathogens and host immune response on both genetic and epigenetic is important during cervical carcinogenesis. Recently, a study of biological markers has been essential for effective treatments and are still required. The objectives of this study were to determine *PIK3CA* gene mutation in 53 clinical samples of preinvasive lesions and invasive cervical cancer patients by PCR. Investigation of the physical status of HPV16 and 18 by real time PCR and prediction of micro-RNA (miR) related to *PIK3CA* gene mutation by bioinformatic tools were performed. Results of *PIK3CA* exon 9 mutation on preinvasive lesion group CIN I and CIN II+III+CIS were at 93.8% (15/16 cases) and 64.7% (11/17 cases), respectively, whereas *PIK3CA* exon 20 mutation on preinvasive lesion group CIN I and CIN II+III+CIS were at 5.8% (1/17 cases) and 29.0% (5/17 cases), respectively. In invasive cervical cancer, *PIK3CA* exon 9 mutation was at 70.0% (14/20 cases), *PIK3CA* exon 20 mutation was at 20.0% (4/20 cases), whereas no mutation of both exon 9 and 20 was at 20.0% (4/20 cases). The results of physical status HPV16 and 18 on preinvasive lesion CIN I, episomal, integrated, and mixed viral form were found at 31.3% (5/16), 1.3% (2/16), and 56.0% (9/16), respectively. In preinvasive lesion CIN II+III+CIS, episomal, integrated, and mixed viral form were found at 23.0% (4/17), 42.0% (7/17), and 35.0% (6/17), respectively. The results of the invasive cervical cancer, episomal, integrated, and mixed viral form were found at 35.0% (7/20), 30.0% (6/20), and 35.0% (7/20), respectively. The predicted result of miRs on *PIK3CA* target gene was found on 3 candidate miRs including miR-124-3p, miR-381-3p, and miR-

339-5p. The application usage of the biological markers among HPV physical status and target gene mutation with candidate miRs regulation could be used for further prognosis outcome of cervical cancer patients, efficiently.