

**DEVELOPMENT OF
ONE-TUBE MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR
FOR IDENTIFICATION OF RIFAMPICIN-RESISTANT
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

DUANGSAMORN TAECHAMAHAPUN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาวิธี ONE-TUBE MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin (DEVELOPMENT OF ONE-TUBE MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR FOR IDENTIFICATION OF RIFAMPICIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*)

ดวงสมร เตชะมหพันธ์ 4736619 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat., เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์, Dr.rer.biol.hum.

บทคัดย่อ

การดื้อยา rifampicin เป็นตัวแทนที่ได้รับการยอมรับว่าแสดงถึงการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน ดังนั้นการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin ให้ได้รวดเร็ว จะช่วยในการวินิจฉัย การรักษาและการควบคุม การแพร่เชื้อวัณโรค การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาวิธี one-tube multiplex semi-nested PCR สำหรับตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin

primer ทั้ง 5 คู่ถูกออกแบบสำหรับการเพิ่มจำนวนยีน *rpoB* ในหลอดเดียว โดยมีหนึ่งคู่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณ 81-bp hot spot ภายในยีน *rpoB* โดยให้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 196-bp ส่วน forward primer อีก 4 ข้างเป็น primer ที่จำเพาะกับ allele ที่ศึกษาซึ่งให้ด้านปลาย 3' จำเพาะอยู่ที่ codon 531, 526, 516 และ 511 การผ่าเหล่าของตำแหน่งเหล่านี้พบว่าส่วนใหญ่มีผลทำให้เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin วิธีนี้ถูกทดสอบโดยใช้เชื้อวัณโรคจำนวน 216 ตัวอย่างที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ทราบผลการทดสอบความไวของยาด้วยวิธีมาตรฐาน proportion method และได้จัดเรียงเชื้อใหม่เพื่อไม่ให้มีความลำเอียงในการแปลผล วิธีอ่านผล ถ้าพบดีเอ็นเอครบทั้ง 5 ขนาดแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา ถ้ามีดีเอ็นเอไม่ครบทั้ง 5 ขนาดแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา rifampicin

วิธี PCR ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin ได้ 97 จาก 103 ตัวอย่าง และเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา rifampicin ได้ 113 จาก 113 ตัวอย่าง ส่วนอีก 6 ตัวอย่างที่ได้ผลไม่ตรงกันถูกนำไปอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอ และพบการผ่าเหล่าอยู่นอกเหนือจากบริเวณที่ออกแบบ primer จากผลนี้แสดงถึงค่าความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 94.2, 100, 100 และ 94.9 ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทดสอบวิธี PCR กับตัวอย่างเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกจากเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าได้ผลตรงกับวิธีมาตรฐาน 49 ใน 50 ตัวอย่าง (98%) ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถใช้วิธี PCR นี้ตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาได้เท่ากับ 10 พิโคกรัม โดยวิธีนี้ต้องการประชากรดื้อยาอย่างน้อยร้อยละ 90 ของประชากรผสม จึงสามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้

วิธีที่พัฒนานี้แสดงผลที่ดีในการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin จากการเพาะเชื้อ และใช้เวลาสั้นกว่า (1 วัน) ทั้งวิธีมาตรฐานเดิมและวิธีเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ (7-28 วัน) วิธีนี้จึงสามารถใช้เป็น rapid screening method สำหรับตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา rifampicin ซึ่งเป็นตัวแทนแสดงถึงการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนานและช่วยให้ข้อมูลการผ่าเหล่าในบริเวณ hot spot ของ *rpoB*

DEVELOPMENT OF ONE-TUBE MULTIPLEX SEMI-NESTED PCR FOR IDENTIFICATION OF RIFAMPICIN-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

DUANGSAMORN TAECHAMAHAPUN 4736619 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: ANGKANA CHAIPRASERT, Dr.rer.nat., THERDSAK PRAMMANANAN, Dr.rer.biol.hum.

ABSTRACT

Rifampicin resistance is well accepted as a surrogate marker of MDR-TB. Therefore, rapid detection of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* will help in diagnosis, treatment and control of TB transmission. This study aims to develop the one-tube multiplex semi-nested PCR for identification of rifampicin-resistant *M. tuberculosis*.

Five primer pairs were designed for amplification of *rpoB* gene in a single tube. One pair was specifically designed for the 81-bp hot spot region of *rpoB* and generated 196-bp product. The remaining four forward primers were allele-specific primers that their 3'-ends located specifically at codons 531, 526, 516 and 511. Mutations of these codons are mostly found to confer rifampicin resistance in *M. tuberculosis*. This method was done in a blind experiment with 216 clinical isolates of *M. tuberculosis* with known susceptibility results obtained from the standard proportion method. For interpretation, the presence of 5 amplification products will be accounted as wild type or a sensitive strain. The absence of band at corresponding codon will be reported as a rifampicin-resistant strain.

The developed PCR method could accurately identify 97 from 103 rifampicin-resistant and 113 of 113 rifampicin-sensitive strains. Six discordant strains were sequenced and shown to have mutations outside the designed region. This reveals sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of 94.2%, 100%, 100% and 94.9%, respectively. In addition, the developed PCR also provided concordantly results of 49 in 50 samples (98%) from the positive automated BACTEC MGIT 960 cultures, comparing with the proportion method. The detection limit of the PCR was 10 pg. The developed PCR required at least 90% of the resistant strain in the mixed population to clearly identify the resistant subpopulation.

The established method showed good results and was more rapid (1 day) than both conventional and automated culture systems (7-28 days). It can be used as a rapid screening method for detection of rifampicin-resistant *M. tuberculosis*, a marker of MDR-TB, and provide information of the mutations in the hot spot region of *rpoB*.

KEY WORDS: MULTIPLEX PCR / RIFAMPICIN RESISTANCE / RPOB
TUBERCULOSIS / IDENTIFICATION

163 PP.