LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

4 FEB 1993

DETECTION AND IDENTIFICATION OF

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY USING DNA PROBES

KITTIPAN SAMERPITAK

อภินันทนาการ
จาก
มหาวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

(MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1992

21189

Copyright © by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหาและจำแนกชนิดเชื้อ มัยโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลสิส โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ

ผู้วิจัย กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อังคณา ฉายประเสริฐ , วท.ด.

เพทาย เย็นจิตโสมนัส , ปร.ด.

จุรี เจียรนัยศิลาวงศ์ , วท.ม.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๕ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๓๕

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคที่มีมาช้านานและยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลก คาดว่ามีผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ถึงปีละ ๓ ล้านคน การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการให้มีความรวดเร็วและความไว เป็นส่วนหนึ่งที่สำคัญสำหรับการควบคุมวัณโรค เทคนิคใหม่ๆทางด้านอณูชีววิทยามีศักยภาพที่สามารถจะประยุกต์ใช้ในการพัฒนานี้ ผลงานที่ปรากฏในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนของงานวิจัยต่อเนื่องซึ่งเกี่ยวข้องกับ การประยุกต์ใช้เทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา สำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย ๕ ชิ้น (ชื่อ KS1, KS2, KS3, KS4 และ KS5) ออกมาจากพลาสมิด, pWR6 และ pWR9 , ซึ่งมีการสร้างไว้แล้ว เพื่อนำมาทดสอบในการใช้เป็น ดีเอ็นเอตรวจสอบ ดีเอ็นเอตรวจสอบทั้ง ๕ ชิ้น ได้รับการทดสอบหาความจำเพาะขั้นแรกโดย วิธีไฮบริไดเซชั่น แบบเซาเทอร์น กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* คอมเพลก ๑๑ สายพันธุ์ และดีเอ็นเอตัวอย่างจากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยอีก ๑๐ สายพันธุ์ ดีเอ็นเอตรวจสอบทั้ง

Copyright © by Chulalongkorn University

หมดยกเว้น KS3 สามารถไฮบริไดกับตัวอย่างดีเอ็นเอเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม เฉพาะดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 ซึ่งแสดง แถบไฮบริไดเซชั่นจำนวนมาก เท่านั้นที่ถูกเลือกไปทดสอบต่อด้วย วิธีไฮบริไดเซชั่นแบบเซาเทอร์น กับดีเอ็นเอ ตัวอย่างจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น ๙ ชนิด, แบคทีเรียอื่น ๑๒ ชนิด และยีสต์ ๒ ชนิด พบว่าดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งสองมีความจำเพาะสูง กับดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* คอมเพลก โดยที่มีการไฮบริไดเซชั่นอย่างอ่อน กับดีเอ็นเอตัวอย่างจากเชื้อ *M. aurum, M. neolactis* และ *P. aeruginosa*

ความไวของดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 ในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อทดสอบโดยใช้วิธีไฮบริไดเซชั่นแบบด็อทบล็อท พบว่าปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดที่ตรวจหาได้โดยดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 เท่ากับ ๑๐๐ พิโคกรัม และ ๑,๐๐๐ พิโคกรัม (ประมาณ ๒.๕x๑๐$^{-}$ และ ๒.๕x๑๐$^{-}$ จีโนม) ตามลำดับ

เนื่องจากเซลของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ทำให้แตกได้ยากในขบวนการของการสกัดดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงได้ทดสอบวิธีทำให้เซลแตก ๔ วิธี อันประกอบด้วย วิธีใช้แรงกระแทก, วิธีใช้เอนไซม์, วิธีใช้สารเคมี และวิธีต้ม กับตัวอย่างเสมหะซึ่งผสมเซลของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทราบจำนวน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีเหล่านี้โดย การทำไฮบริไดเซชั่นแบบด็อทบล็อท กับดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 ผลที่ได้พบว่า วิธีใช้แรงกระแทก มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอื่น เพราะฉะนั้นจึงใช้วิธีนี้ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ มัยโคแบคทีเรีย จากตัวอย่างเสมหะที่ได้จากผู้ป่วยที่ต้องการทดลองลำดับต่อไป

การตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม *M. tuberculosis* คอมเพลก, ทำในเสมหะของผู้ป่วย ๒๕๙ ตัวอย่าง ด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบด็อทบล็อท กับดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีตรวจแบบดั้งเดิม ซึ่งก่อนหน้านี้ตัวอย่างเสมหะดังกล่าวได้ถูกจัดเป็น ๓ กลุ่มไว้แล้ว ตามข้อมูลทางคลีนิคและทางห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งออกเป็น กลุ่มที่เป็นวัณโรค (๖๒ ตัวอย่าง), กลุ่มที่สงสัยวัณโรค (๑๔๖ ตัวอย่าง)และ

Copyright© by Chiang Mai University

กลุ่มที่ไม่เป็นวัณโรค (๕๑ ตัวอย่าง) ผลที่ได้พบว่าดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 มีค่าความไวของการตรวจเท่ากับ ๓๒.๒% (๒๐/๖๒) และ ๔๓.๕% (๒๗/๖๒) มีความจำเพาะเท่ากับ ๙๘% (๕๐/๕๑)และ ๙๒.๑% (๔๗/๕๑) ตามลำดับ ค่าคาดหมายผลบวกของดีเอ็นเอตรวจสอบ KS4 และ KS5 เท่ากับ ๙๕.๒% และ ๘๗.๑% ส่วนค่าคาดหมายผลลบมีค่าเท่ากับ ๕๔.๓% และ ๕๗.๓% เมื่อนำผลของดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งคู่มารวมกัน ค่าความไว และความจำเพาะของ การตรวจเท่ากับ ๕๑.๑% (๓๒/๖๒) และ ๙๒.๑% (๔๗/๕๑) ค่าคาดหมายผลบวกและค่าคาดหมายผลลบเท่ากับ ๘๘.๘% และ ๖๑% ตามลำดับ ในกลุ่มที่สงสัยวัณโรคพบว่า การใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งสอง จะให้ผลบวกประมาณ ๒๔% (๓๕/๑๔๖) ในขณะที่วิธีย้อมแบบทนกรด ให้ผลบวกประมาณ ๑๔% (๒๑/๑๔๖) ความไวของการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ด้วยวิธีดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ยังคงน้อยกว่า วิธีตรวจแบบดั้งเดิมในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคจริง และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาเหตุเกิดจากวิธีสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ใช้ยังมีประสิทธิภาพต่ำ ประกอบกับ วิธีไฮบริไดเซชั่นด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบเองก็มีความไวต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ยังสาธิต การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ KS5 และวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบเซาเทอร์น สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อ *M. bovis* BCG ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่กำเนิดชนิดรุนแรง (SCIDS) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบศักยภาพของเทคนิค PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อมัยโค-แบคทีเรีย โดยนำเสนอในภาคผนวกด้วย

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by Using DNA Probes

Name Kittipan Samerpitak

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisor Committee

Angkana Chaiprasert , Dr.rer.nat.

Pa-thai Yenchitsomanus , Ph.D.

Juree Jearanaisilavong , M.Sc.

Date of Graduation 5 November B.E 2535 (1992)

ABSTRACT

Tuberculosis is an ancient disease and stil a major global health problem. It is estimated that annually 3 millions people worldwide were died of this disease. Development of rapid and sensitive laboratory method for diagnosis of tuberculosis is a significant part in the attempt to control this disease. New technique in molecular biology are potential to be applied in this development. The results presented in this thesis were part of the continuous research work that applies molecular biology techniques for laboratory diagnosis of tuberculosis.

In this study, 5 mycobacterial DNA fragments (named as KS1, KS2, KS3, KS4 and KS5) were isolated from two recombinant plasmids, pWR6 and pWR9, previously cloned in our laboratory, for testing as DNA probes. Specificities of the

Copyright by Mahidol University

5 DNA probes were firstly evaluated by Southern blot hybridization using 11 DNA samples isolated from *M. tuberculosis* complex and 10 DNA samples isolated from *M. tuberculosis* obtained from patients. All the DNA probes, except KS3, could strongly hybridize to these DNA samples. However,only the KS4 and the KS5 DNA probes which showed multiple bands of hybridizations were selected for further testing in Southern blot hybridizations with DNA samples of 9 other species of mycobacteria, 12 species of bacteria and 2 species of yeasts. The two DNA probes showed very high specificities in hybridizations with DNA samples of *M. tuberculosis* complex but very weakly cross hybridization with DNA samples of *M. aurum, M. neolactis* and *P. aeruginosa*.

Sensitivities of the KS4 and the KS5 DNA probes in the detection of *M. tuberculosis* DNA were evaluated by dot blot hybridization with serially diluted mycobacterial DNA. The minimal amounts of DNA detected by the KS4 and the KS5 DNA probes were 100 pg and 1,000 pg (approximately $2.5x10^4$ and $2.5x10^5$ genomes), respectively.

It is difficult to lyse mycobacterial cells in the process of DNA isolation.Four methods of cell lysis and DNA isolation including modified physical rupture, enzymatic lysis,chemical lysis and boiling procedure were also tested by using decontaminated sputum samples containing known numbers of *M. tuberculosis* cells. Efficiencies of these methods were compared in dot blot hybridizations using the KS4 and the KS5 DNA probes. The modified physical rupture

Copyright by Mahidol University

method was found to be better than the other methods in isolation of the mycobacterial DNA and it was therefore used for isolation of mycobacterial DNA from patients' sputum samples in the follwing experiment.

Detection of the mycobacteria, specifically in *M. tuberculosis* complex, in 259 sputum specimens was carried out by dot blot hybridization evaluated using the KS4 and the KS5 DNA probes and the results were analysis in comparison with that obtained by the conventional methods. The samples were classified into three groups : positive (62 samples), suspected (146 samples) and negative (51 samples) tuberculosis based on the results of clinical diagnosis and routine laboratory examinations. The KS5 and the KS5 DNA probes had sensitivities at 32.2% (20/62) and 43.5% (27/62) and specificities at 98% (50/51) and 92.1% (47/51), respectively. The positive predictive values of the KS4 and the KS5 DNA probes were 95.2% and 87.1% and the negative predictive values were 54.3% and 57.3%. When the results of using the DNA probes were combined, the sensitivity and specificity of detection were 51.6% (32/62) and 92.1% (47/51), and the positive predictive and negative predictive values were 88.8% and 61%, respectively. In the group with suspected tuberculosis, approximately 24% (35/146) of the specimens were positive by dot blot hybridization using the two DNA probes while approximately 14% (21/146) were positive by acid-fast staining. The sensitivities of mycobacterial detection in sputum specimens by using the DNA hybri-

Copyright by Mahidol University

dization technique were lower than that of conventional methods in the group with patients of definite diagnosis of tuberculosis. This problem results from low efficiency of method used for isolation of the mycobacterial DNA in combination with low sensitivity of the DNA hybridization technique using DNA probes.

An application of using the KS5 DNA probe for identification of *M.bovis* BCG isolated from a patient with severe combined immunodeficiency syndrome (SCIDS) in Southern blot hybridization was demonstrated. The potential use of polymerase chain reaction (PCR) technique for detection of mycobacterial DNA was also presented in Appendix.

Copyright by Mahidol University