

17 MAY 2001



**MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION FOR  
DIAGNOSING TUBERCULOSIS  
AND CRYPTOCOCCOSIS**

**NUNTANA SIENGLUECHA**

อธิปัทนการ  
จาก  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

**2001**

**ISBN 974-665-451-9**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
N972.M  
8001

Copyright by Mahidol University

3936695 SIMI/M : MAJOR: MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)

KEY WORD : TUBERCULOSIS / CRYPTOCOCCOSIS / MULTIPLEX PCR / DIAGNOSING

NUNTANA SIENGLUECHA: MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSING TUBERCULOSIS AND CRYPTOCOCCOSIS. THESIS ADVISORS: PANKORN IMWIDTHAYA, M.D; Dr. med., ANGKANA CHAIPRASERT, Dr.rer.nat., JUREE JEARANAISILAVONG; M.Sc. 108 p. ISBN 974-665-451-9.

Currently, the incidence of opportunistic infection in AIDS patients is increasing throughout the world. The resurgence of tuberculosis and cryptococcosis is the most important health problem of AIDS patients worldwide and especially in Thailand. Rapid diagnosis would be useful for early treatment and control of these diseases. In this study, multiplex PCR were developed by using two sets of primers derived from the *MPB64* protein coding gene of *Mycobacterium tuberculosis* complex and the 18S rRNA gene of *Cryptococcus neoformans* as target sequences. The multiplex PCR results were evaluated and compared with the conventional method. The multiplex PCR could amplify only target sequences of *M. tuberculosis* complex and *C. neoformans* among 44 different microbial DNAs. The amplified PCR product was detected with agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The multiplex PCR could reveal 100fg of *M. tuberculosis* and 1 pg of *C. neoformans* at the least amount of diluted DNAs, which are equal to DNA obtained from 20 and 30 cells, respectively. Comparison by using simulated samples, multiplex PCR, culture and AFB staining could detect *M. tuberculosis* at 50,  $5 \times 10^2$  and  $5 \times 10^5$  cells/ml, respectively. Similarly, it could detect *C. neoformans* by comparing with culture, multiplex PCR and India ink preparation at a minimal equal to 10,  $1 \times 10^2$  and  $1 \times 10^4$  cells/ml, respectively.

When the detection of *M. tuberculosis* DNA by multiplex PCR in 28 sputum samples was compared with culture results, it was revealed that the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were 83.3%, 56.3%, 58.8%, and 81.8%, respectively, while the results of AFB staining were 81.3%, 66.7%, 76.5% and 72.7%, respectively. Similarly, the detection of *C. neoformans* in 77 CSFs by multiplex PCR, compared with culture results, revealed that the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were 84.3%, 92.3%, 95.6%, and 75%, respectively while the results of India ink preparation were 93.6%, 96.7%, 97.8% and 90.6%, respectively. In this study, the co-infection of *M. tuberculosis* and *C. neoformans* in CSFs of HIV positive patients was not found.

In conclusion, it is suggested that multiplex PCR should be used as a supplementary method for rapid direct detection the of *M. tuberculosis* complex and *C. neoformans* to support a clinical diagnosis for tuberculosis and cryptococcosis.

3936695 SIM/IM : สาขาวิชาจุลชีววิทยา ; วท.ม.(จุลชีววิทยา)

นันทนา เสียงลือชา : MULTIPLEX PCR สำหรับวินิจฉัยวัณโรคและโรคคริปโตคอคโคสิส (MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DIAGNOSING TUBERCULOSIS AND CRYPTOCOCCOSIS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พรรณกร อิมวิทยา M.D., Dr.med., อังคณา นายประเสริฐ Dr. rer. nat., จุรี เจียรนัยศิลาวงศ์ M.Sc. 108 หน้า ISBN 974-665-451-9.

อุบัติการณ์ของวัณโรคและโรคคริปโตคอคโคสิสเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขที่พบมาก และมีแนวโน้มสูงขึ้นในผู้ป่วยโรคเอดส์ทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย การวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วจะช่วยให้การเริ่มต้นให้การรักษาและช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ วิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ส่วนที่มีความจำเพาะต่อจุลชีพที่ต้องการตรวจหาในหลอดทดลองโดยเทคนิค PCR เป็นที่ยอมรับว่ามีความไวสูง ในการศึกษาครั้งนี้จึงพัฒนาเทคนิค PCR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของวัณโรคและโรคคริปโตคอคโคสิสโดยเลือกยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน MPB64 ซึ่งจำเพาะกับเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* และยีนที่ควบคุมการสร้าง 18S rRNA ในส่วนซึ่งจำเพาะกับเชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นยีนเป้าหมาย การศึกษาพบว่า Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเฉพาะกับยีนเป้าหมายได้เท่านั้น โดยทดสอบกับเชื้อจุลชีพต่างๆ 105 สายพันธุ์ 44 สปีชีส์ สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ปริมาณต่ำสุด 100 fg หรือเท่ากับดีเอ็นเอจาก 20 เซลล์ และตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *C. neoformans* ได้ปริมาณต่ำสุด 1 pg หรือ เท่ากับดีเอ็นเอจาก 30 เซลล์ เปรียบเทียบกับการศึกษาด้วย simulated samples ของเชื้อ *M. tuberculosis* วิธี Multiplex PCR การเพาะเชื้อและการย้อมสีทึบกรด ตรวจพบเชื้อ ได้ปริมาณต่ำสุด  $5 \times 10^1$ ,  $5 \times 10^2$  และ  $5 \times 10^3$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การศึกษาจากการเตรียม simulated CSF sample ของเชื้อ *C. neoformans* วิธีเพาะเชื้อ Multiplex PCR และ India ink preparation ตรวจพบเชื้อ ได้ปริมาณต่ำสุด  $10^1$ ,  $1 \times 10^2$  และ  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

การศึกษาจากเสมหะผู้ป่วย 28 ตัวอย่างเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ระหว่าง Multiplex PCR กับการเพาะเชื้อพบว่า ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 83.3, 56.3, 58.8 และ 81.8 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการย้อมสีทึบกรด เท่ากับร้อยละ 81.3, 66.7, 76.5 และ 72.7 ตามลำดับ การศึกษาในน้ำไขสันหลังจากผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จำนวน 77 ตัวอย่างเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *C. neoformans* กับการเพาะเชื้อ พบว่า ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 84.3, 92.3, 95.6 และ 75 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ India ink preparation เท่ากับร้อยละ 93.6, 96.7, 97.8 และ 90.6 ตามลำดับ การศึกษานี้ไม่พบการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง *M. tuberculosis* และ *C. neoformans* ในน้ำไขสันหลัง จากผลการศึกษาพบว่า Multiplex PCR สามารถใช้ตรวจหาเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* และ *C. neoformans* ได้โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ และเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยสนับสนุนในการวินิจฉัยวัณโรคและโรคคริปโตคอคโคสิสทางห้องปฏิบัติการได้อย่างรวดเร็ว