- 6 AUG 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

USE OF A NESTED MULTIPLEX PCR TO DETECT AND IDENTIFY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX BACTEREMIA IN AIDS PATIENTS

SUMOL TERMSETJAROEN

ขอมอบวิทยานิพนธ์นี้
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 974-04-0108-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
S936u
2001
c.2

3936696 SIMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : MULTIPLEX PCR / ONE – TUBE NESTED / DETECT / IDENTIFY / *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* / *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX

SUMOL TERMSETJAROEN : USE OF A NESTED MULTIPLEX PCR TO DETECT AND IDENTIFY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX* AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX BACTEREMIA IN AIDS PATIENTS. THESIS ADVISORS : ANGKANA CHAIPRASERT, Dr.rer.nat., CHAROEN CHUCHOTTAWORN, M.D. 178 p. ISBN 974-04-0108-2

Patients with acquired immune deficiency syndrome may develop infections caused by mycobacteria, particularly *M. avium* complex (MAC) and *M. tuberculosis* complex (MTBC). These infections can frequently be associated with demonstrable mycobacteremia with these organisms. Rapid detection and identification of MTBC and MAC are important for an effective treatment. The nested multiplex PCR assay was developed in order to detect and identify MTBC and MAC DNAs coding for 16S rRNAs. The nested multiplex PCR assay using 16SOL2, 16SOR, NGL2, NGR, 16SIL and 16SIR with optimized conditions could detect amplified products of about 595 bp from all mycobacterial DNA. Cross amplification was observed in *Corynebacterium diphtheriae, Nocardia asteroides, Nocardia farcinica* and *Rhodococcus equi* among 39 tested strains of bacteria and fungi. It also revealed specific 366 bp DNA band from 45 strains of MAC. Cross amplification was observed only with *M. kansasiii*. The specific 306 bp DNA band was amplified from 8 strains of MTBC. Cross amplification was observed in a strain of *M. marinum*. The assay was sensitive enough to detect as little as 100 fg of MTBC DNA equivalent to 20 mycobacterial genomes and 1 pg of MAC DNA equivalent to 200 mycobacterial genomes.

When comparing the nested multiplex PCR in 150 blood samples of AIDS patients with BACTEC 460 TB system for detection of MTBC, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were 26.9,98.4,77.8 and 86.5%, respectively. For the detection of MAC, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, derived by comparison with culture results were 29.4,76.7,13.9 and 89.5%, respectively. Because of low positive predictive values and sensitivity of the developed nested multiplex PCR, further improvement was necessary before it might be used with clinical samples. DNAs obtained from blood samples using QIAamp DNA blood Mini Kit were appropriate for PCR as was purified DNA obtained from pure culture using physical rupture technique. This PCR method should be useful for the rapid detection of MTBC or MAC in a one week-preculture blood specimen of AIDS patients. If not, further studies would be needed. In a comparison of nested multiplex PCR with AccuProbe for identification of MTBC and MAC from positive blood cultures of AIDS patients, there was 100% concordance between the two methods. The nested multiplex PCR could be considered as a replacement for the AccuProbe, because it could save time, cost and laboratory resources. The crude DNA obtained from the boiling method was sufficient for PCR.

Copyright by Mahidol University

3936696 SIMI/M สาขาวิชา: จุลชีววิทยา: วทม.(จุลชีววิทยา)

สุมล เติมเศรษฐเจริญ: การใช้เทคนิคเพิ่มขยายหลายๆ ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่ในปฏิกิริยาเดียวกันสำหรับตรวจหาเชื้อวัณโรคและเชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ ในเลือดของผู้ป่วยเอดส์ (USE OF A NESTED MULTIPLEX PCR TO DETECT AND IDENTIFY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX AND *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX BACTEREMIA IN AIDS PATIENTS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat., เจริญ ชูโชติถาวร, M.D. 178 หน้า
ISBN 974-04-0108-2

ผู้ป่วยด้วยโรคเอดส์อาจจะมีการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียแบบแพร่กระจายในเลือดโดยเฉพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์และเชื้อวัณโรคได้บ่อย การตรวจและวินิจฉัยที่รวดเร็วเป็นสิ่งสำคัญในการรักษา วิธีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ จากลำดับเบสของยีน 16S rRNAs เป็นเป้าหมาย ได้แก่ 16SOL2, 16SOR, NGL2, NGR,16SIL และ 16SIR ในหลอดทดลองเดียวเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มวัณโรคและเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ ได้ถูกพัฒนาขึ้น ในสภาวะที่เหมาะสม วิธีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 595 bp สำหรับเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียและพบใน *Nocardia asteroides, Nocardia farcinica* และ *Rhodococcus equi* โดยไม่พบในแบคทีเรียและราชนิดอื่นๆรวม 39 สายพันธุ์ ตรวจพบแถบ DNA ขนาด 366 bp ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ทั้ง 45 สายพันธุ์ และ *M. kansasii* 1 สายพันธุ์ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 306 bp ในเชื้อกลุ่มก่อวัณโรค 8 สายพันธุ์และ *M. marinum* เท่านั้น ความไวในการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบเมื่อมีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 100 fg ซึ่งเท่ากับดีเอ็นเอจากเชื้อมัยโคแบคทีเรีย 20 เซลล์และความไวในการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ จะต้องมีปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 1 pg ซึ่งเท่ากับดีเอ็นเอจากเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ประมาณ 200 เซลล์

เมื่อเปรียบเทียบวิธี nested multiplex PCR กับวิธีการตรวจด้วยเครื่องเพาะเชื้อกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460 TB system สำหรับการตรวจเชื้อวัณโรคจากเลือดผู้ป่วยเอดส์ 150 ตัวอย่าง พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบเท่ากับร้อยละ 26.9, 98.4, 77.8 และ 86.5 ตามลำดับ การตรวจเชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบร้อยละ 29.4, 76.7, 13.9 และ 89.5 ตามลำดับ วิธีนี้ยังควรต้องมีการปรับปรุงถ้าจะนำมาใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างส่งตรวจเพราะค่าความไวและค่าทำนายผลบวกยังค่อนข้างต่ำ ดีเอ็นเอที่เตรียมจากเลือดโดยใช้ชุดสกัด QIAamp สามารถใช้สำหรับทำ PCR ได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่เตรียมจากเชื้อโดยใช้วิธีอาศัยแรงกระแทก ส่วนการนำไปตรวจหาเชื้อก่อโรคในตัวอย่างตรวจที่เพาะเชื้อแล้วประมาณ 1 สัปดาห์จะมีประโยชน์หรือไม่เพียงใด จำเป็นต้องศึกษาต่อไป เมื่อเปรียบเทียบ nested multiplex PCR กับ AccuProbe เพื่อการจำแนกชนิดเชื้อวัณโรคและเชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ ที่ตรวจพบโดยการเพาะเชื้อจากเลือดผู้ป่วยเอดส์พบว่าให้ผลที่ตรงกัน 100% วิธี nested multiplex PCR สามารถนำมาใช้จำแนกชนิดแทนวิธี AccuProbe ได้เพราะให้ผลถูกต้อง อีกทั้งสามารถประหยัดเวลา ราคา และวิธีการต่างๆในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างมากและดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากการต้มก็สามารถใช้สำหรับ PCR ได้

Copyright by Mahidol University