7 DEC 2001

ASSESSMENT OF MOLECULAR TECHNIQUES COMPARED WITH BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFYING *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX

PREEYAWIS NA UBOL

อภินันทนาการ
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 974-04-0745-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P923a
2001
c.2

Copyright by Mahidol University

3936697 SIMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : PCR/ PCR-REA/ KS4/ MTP40/ 16S-23S rDNA spacer/ *M. tuberculosis* complex

PREEYAWIS NA UBOL: ASSESSMENT OF MOLECULAR TECHNIQUES COMPARED WITH BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFYING *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX. THESIS ADVISORS: ANGKANA CHAIPRASERT, Dr.rer.nat., PRASIT PALITTAPONGARNPIM, MD., AMORN LEELARASAMEE, MD. 197 p. ISBN 974-04-0745-5.

Mycobacterium tuberculosis complex, the etiologic agent of tuberculosis, causes an increasingly tremendous infectious disease with mortality worldwide. The correct, rapid and cheap identification method for *M. tuberculosis* complex could help the initiation of appropriate therapy and decrease the unnecessary treatment.

In this study, the identification of *M. tuberculosis* complex by molecular techniques namely PCR and PCR-REA were compared with traditional biochemical tests. There were 42 reference strains of 24 species, 218 strains obtained from patients included for these testings.

Three pairs of PCR primers were used. The TPOL/TPOR were taken for amplification of 768 bp DNA fragment from the MPTR-containing KS4 DNA, which was specific for *M. tuberculosis* complex. The second pair of primers; PT1/PT2 could be employed in amplifying 396 bp DNA fragment of *mtp40* gene of *M. tuberculosis.* The third pair of primers, 16SC/23SG were used to amplify 16S-23S rDNA spacer in PCR-REA. The primers were specific for mycobacteria, therefore, the PCR product needed to be restricted with *Hae*III for species determination.

The identification of *M. tuberculosis* complex by PCR of the KS4 and the *mtp*40 gene revealed the sensitivities, specificities, positive predictive values and negative predictive values of 98.3%, 98.6%, 98.3%, 98.6% and 95.2%, 77.1%, 74.1%, 95.9%, respectively. The tests required about 8 hours and the cost for all supplies was about 28-29 Baht. The PCR-REA showed the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of 98.3%, 100%, 100%, 98.6%. It took about 28 hours and costed 39.7 Baht. This method had more advantage than the previous PCR tests because it allowed the identification of more mycobacterial species.

This study had proved that the molecular techniques were cheaper and needed less supplies than the biochemical tests. It was a precise, accurate, rapid and economic method for identification of *M. tuberculosis* complex.

Copyright by Mahidol University

3936697 SIMI/M สาขาวิชา: จุลชีววิทยา; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

ปรียวิศว์ ณ อุบล : การประเมินผลการจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธีทางอณูชีววิทยาเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวเคมี (ASSESSMENT OF MOLECULAR TECHNIQUES COMPARED WITH BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFYING *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat., ประสิทธ์ ผลิตผลการพิมพ์, MD., อมร ลีลารัศมี, MD. 197 หน้า
ISBN 974-04-0745-5.

เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex เป็นสาเหตุของวัณโรคซึ่งมีจำนวนผู้ติดเชื้อ ผู้ป่วย และผู้เสียชีวิตเป็นจำนวนมากและเพิ่มขึ้นทั่วโลก การจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคอย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และราคาถูก มีผลทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้องทันเวลาและลดการรักษาที่ไม่จำเป็นได้

การจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธีทางอณูชีววิทยาในการศึกษานี้ ประกอบด้วยวิธี PCR และ PCR-REA เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทางชีวเคมี โดยทำการทดสอบกับโคโลนีของเชื้อที่เพาะแยกได้จากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน 24 สปีชีส์ 42 สายพันธุ์ และจากผู้ป่วย 11 สปีชีส์ 218 สายพันธุ์

การจำแนกโดยวิธี PCR ใช้ primers 3 ชุด ชุดแรกคือ TPOL/TPOR ใช้เพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 768 bp จาก KS4 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำๆกันแบบ MPTR และมีความจำเพาะกับเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* complex. primers ชุดที่สองคือ PT1/PT2 มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอในยีน *mtp40* ซึ่งพบเฉพาะในเชื้อ *M. tuberculosis* primers นี้ เพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นขนาด 396 bp primers ชุดที่สามคือ 16SC/23SG ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อโดยวิธี PCR-REA โดยเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณส่วน 16S-23S rDNA spacer primer นี้มีความจำเพาะกับเชื้อ *Mycobacterium* ทุกสายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองแล้ว จะทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Hae*III เพื่อจำแนกเชื้อถึงระดับสปีชีส์

การจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธี PCR พบว่าส่วนดีเอ็นเอ KS4 และ ยีน *mtp40* มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.3%, 98.6%, 98.3%, 98.6% and 95.2%, 77.1%, 74.1%, 95.9% ตามลำดับโดยใช้เวลาประมาณ 8 ชั่วโมง เสียค่าใช้จ่ายสำหรับวัสดุสิ้นเปลืองประมาณ 28-29 บาท ส่วนการจำแนกชนิดเชื้อกลุ่มก่อวัณโรคโดยวิธี PCR-REA มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 98.3%, 100%, 100%, 98.6% ใช้เวลาประมาณ 27 ชั่วโมง และเสียค่าใช้จ่าย ประมาณ 39.7 บาท วิธีนี้มีข้อดีกว่า 2 วิธีแรกคือสามารถจำแนก *Mycobacterium* สปีชีส์อื่นๆได้อีกประมาณ 10 ชนิด

การศึกษาครั้งนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าวิธีทางอณูชีววิทยามีราคาถูกกว่าวิธีปรกติ อีกทั้งมีต้นทุนของวัสดุสิ้นเปลืองต่ำกว่าวิธีทางชีวเคมี สามารถนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อกลุ่มก่อวัณโรค ได้ผลถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และประหยัดกว่าวิธีทดสอบมาตรฐานทางชีวเคมี

Copyright by Mahidol University