



4 JAN 2000

**EFFICIENCY OF PCR FOR DETECTION OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM SPUTUM
IMPREGNATED ON FILTER PAPER AT
ROOM TEMPERATURE FOR 5 DAYS**

BENCHAPRON CHINRAT

**With compliments
of**
บัณฑิตวิทยาลัย น.นพรัตน์

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1999

ISBN 974-663-167-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
B4572
1999

43337 c.2

Copyright by Mahidol University



4036590 PHPH / M : MAJOR: INFECTIOUS DISEASES; M. Sc. (PUBLIC HEALTH)
KEY WORDS : *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* / CONVENTIONAL
CULTURE / POLYMERASE CHAIN REACTION

BENCHAPRON CHINRAT : EFFICIENCY OF PCR FOR DETECTION OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM SPUTUM IMPREGNATED ON
FILTER PAPER AT ROOM TEMPERATURE FOR 5 DAYS. THESIS ADVISORS :
UNCHALEE TANSUPHASIRI, M. Sc. (Micro). SOMSAK RIENTHONG, M. Sc.
(Med. Micro). 150 p. ISBN 974-663-167-5

With the increasing incidence of tuberculosis, more rapid detection of *M. tuberculosis* has become an important issue that may improve management of infected patients and facilitate infection control procedures. In practice, sputum specimens are sent to central laboratories for culture. However, the shipment of sputum specimens over a long distance from peripheral health centers to central laboratories may affect the culture recovery. Therefore, a rapid PCR-based method was considered in this study since it can detect both viable and non-viable organisms. The efficacy of detection by PCR and by culture from sputum impregnated on filter paper at room temperature for 5 days were investigated. The results were compared with those of staining and conventional culture before storage as the "gold standard".

Out of 231 sputum specimens examined, *M. tuberculosis* were recovered from 124 samples by culture before storage. The culture positivity rate was significantly decreased to 70% after 5 days storage. For PCR assay, the sensitivity, specificity and efficiency by first PCR combined with agarose gel electrophoresis were 70, 100 and 84.9%, respectively and with dot blot hybridization were 89.5, 96.3 and 92.6%, respectively. The same values for nested PCR were 96.0, 97.2, and 96.5%, respectively. Of these methods, the nested PCR showed excellent sensitivity and specificity with no significant difference ($p = 0.727$) from conventional culture. Thus the storage of sputum on filter paper and keeping it at room temperature for 5 days had no apparent effect on the performance of nested PCR.

It is recommend this PCR method be used in combination with culture for detection of *M. tuberculosis* from mailing sputum specimens stored on filter paper. This sputum collection and storage has the advantage that samples can be sent by post with a minimum space and without refrigeration, convenience for culture, less culture contamination, and remain viable for PCR assay. Future modifications to the PCR protocol, especially at the sample preparation step and at the detection step will make the assay more reliable, and suitable for use in routine clinical practice or in epidemiological study for analysis of large number of samples collected in the field sent by post to the well-established central laboratories for PCR analysis.

4036590 PHPH/M : สาขาวิชาเอก : โรคติดเชื้อ ; วท. ม. (สาธารณสุขศาสตร์)

เบญจพร จินรัตน์ : ประสิทธิภาพของวิธี PCR สำหรับตรวจหาเชื้อวัณโรคจากการเก็บเสมหะบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (EFFICIENCY OF PCR FOR DETECTION OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FROM SPUTUM IMPREGNATED ON FILTER PAPER AT ROOM TEMPERATURE FOR 5 DAYS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อัญชลี ดันท์สุภศิริ, M. Sc. (Micro), สมศักดิ์ เจริญทอง, M.Sc. (Med Micro). 150 หน้า. ISBN 974-663-167-5

เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยวัณโรค การตรวจหาเชื้อวัณโรคที่รวดเร็วเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการดูแลผู้ป่วยและการควบคุมโรค ในทางปฏิบัติเสมหะถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการส่วนกลางเพื่อทำการเพาะเชื้อ ซึ่งระยะทางที่ไกลทำให้เสียเวลาในการขนส่งจึงมีผลต่อการเพาะเชื้อขึ้น ดังนั้นจึงได้นำวิธี PCR ที่สามารถตรวจหาเชื้อมีชีวิตหรือเชื้อตายได้อย่างรวดเร็วมาพิจารณาใช้ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี PCR และวิธีการเพาะเชื้อจากเสมหะที่เก็บบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน โดยอาศัยผลการเพาะเชื้อจากเสมหะก่อนเก็บเป็นมาตรฐาน

ตัวอย่างเสมหะ 231 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อวัณโรคโดยวิธีเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน 124 ตัวอย่าง หลังจากเก็บเสมหะไว้ 5 วัน พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อโดยการเพาะเชื้อเหลือร้อยละ 70 แต่วิธี PCR กับการตรวจผลผลิตดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐาน โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ให้ค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ เท่ากับ ร้อยละ 70, 100 และ 84.9 ตามลำดับ ส่วนเทคนิค Dot blot hybridization เท่ากับ ร้อยละ 89.5, 96.3 และ 92.6 ตามลำดับ สำหรับ nested PCR เท่ากับ ร้อยละ 96.0, 97.2 และ 96.5 ตามลำดับ จากผลการตรวจนี้ พบว่า nested PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเพาะเชื้อแบบมาตรฐาน ($p= 0.727$) ดังนั้นการเก็บเสมหะตามวิธีดังกล่าวจึงไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาเชื้อวัณโรคโดยวิธี PCR

PCR เป็นวิธีที่แนะนำเพื่อใช้ร่วมกับการเพาะเชื้อในการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากเสมหะซึ่งเก็บบนกระดาษกรองที่ส่งมาทางไปรษณีย์ การเก็บโดยวิธีนี้ ทำให้การขนส่งสะดวก ไม่กินเนื้อที่ และไม่ต้องแช่เย็น ในอนาคตควรปรับปรุงวิธี PCR โดยเฉพาะขั้นตอนการเตรียมและการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ไม่ยุ่งยาก จะทำให้ได้วิธีการตรวจที่น่าเชื่อถือและเหมาะสมมากขึ้นกับงานประจำทางคลินิก หรือการศึกษาทางระบาดที่มีตัวอย่างจำนวนมากและต้องส่งมาตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการส่วนกลางต่อไป