12 NOV 1999

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

COMPARISON OF ELISA AND DOT BLOT HYBRIDIZATION WITH AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS FOR RAPID DETECTION OF PCR PRODUCTS FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

SARAWUT SUTTIRAT

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTTED 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 974-662-983-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

43203 e.1

4036591 PHPH/M: MAJOR : INFECTIOUS DISEASE; M.Sc. (PUBLIC HEALTH)
KEY WORDS :*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* / POLYMERASE CHAIN REACTION / ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY / HYBRIDIZATION

SARAWUT SUTTIRUT : COMPARISON OF ELISA AND DOT BLOT HYBRIDIZATION WITH AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS FOR RAPID DETECTION OF PCR PRODUCTS FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*. THESIS ADVISORS : UNCHALEE TANSUPHASIRI, MS., MR. SOMSAK RIENTHONG, M.Sc. 157 P. ISBN 974-662-983-2

A microplate ELISA hybridization assay which uses IS*6110* as the target for amplification was developed for the rapid detection of the PCR products from *Mycobacterium tuberculosis* from clinical cultures and clinical samples. This assay was then evaluated in comparison to two other detection methods: Agarose Gel Electrophoresis (AGE), and Dot Blot Hybridization (DBH). The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy were calculated in comparison with culture results which used as the "gold standard" for diagnosing *M. tuberculosis* infection. The assay is based on the specific detection with fluorescein-labeled detection probe of biotinylated PCR products which are captured in avidin coated microplate. Hybridized products with fluorescein were identified by using anti-fluorescein antibody horse radish peroxidase conjugate and colorimetric peroxidase substrate. This assay discriminated perfectly between the positive and negative groups, when an OD at 490 nm of 0.18 was used as the cut off point.

The agreement rates of PCR product detection from 56 clinical cultures by AGE comparing with DBH and ELISA were 0.964 and 0.964, respectively, while that of DBH and ELISA was 1.0 by Kappa analysis. The overall agreement was not statistically significantly different ($P>0.05$). The assay was used with 190 sputum samples and the PCR results between ELISA and AGE were highly agreeable ($K = 1.0$ by Kappa analysis) with sensitivity, specificity and accuracy of 89.9, 100, 95.8%, respectively. The same values for DBH were 92.4, 98.2 95.8 %, respectively. In comparison, the validities of these three PCR detection methods were not statistically significant different ($P>0.05$). Use of DBH or ELISA hybridization increased the sensitivity of detection by PCR-AGE assay by 10-fold from 10 pg to 1 pg of purified DNA per reaction; i.e., from about 30 to about 3 *M. tuberculosis* H37Rv organisms. The amount of PCR product that could be detected by ELISA was only one half that detected by the other methods; the total assay time of ELISA following the PCR was 4 hours.

In conclusion, the ELISA hybridization assay can replace conventional AGE and DBH for the rapid detection of the PCR products from *M. tuberculosis* because of its sensitivity, specificity and accuracy were not different from those methods. ELISA has several advantages over AGE and DBH in that it is less cumbersome, more rapid, less hazardous, cost effective, results may be read objectively, and suitable for use in epidemiological studies for the analysis of large numbers of samples.

Copyright by Mahidol University

4036591 PHPH/M : สาขาวิชา : โรคติดเชื้อ : วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์)

ศราวุธ สุทธิรัตน์ : เปรียบเทียบวิธีการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อวัณโรคอย่างรวดเร็ว ด้วยวิธี ELISA และ Dot blot hybridization กับ Agarose gel electrophoresis (COMPARISON OF ELISA AND DOT BLOT HYBRIDIZATION WITH AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS FOR RAPID DETECTION OF PCR PRODUCTS FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ, M.S. , สมศักดิ์ เหรียญทอง, M.Sc. 157 หน้า. ISBN 974-662-983-2

ได้พัฒนาเทคนิค ELISA hybridization ในไมโครเพลทขึ้นเพื่อความรวดเร็วในการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงและจากสิ่งส่งตรวจโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ตำแหน่ง IS*6110* แล้วนำวิธีนี้มาประเมินผลเปรียบเทียบกับวิธี Agarose gel electrophoresis (AGE) และ Dot blot hybridization (DBH) ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าคาดหวังผลบวก ค่าคาดหวังผลลบ และ ประสิทธิภาพของการทดสอบ ได้จากการเปรียบเทียบกับผลของการเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยวัณโรค หลักการของเทคนิคนี้ คือ การตรวจสอบอย่างจำเพาะด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลากด้วยฟลูโอเรสซีน กับผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดปลายข้างหนึ่งด้วยไบโอติน ซึ่งจะจับกับอะวิดินที่เคลือบอยู่บนผิวไมโครเพลท และใช้แอนติบอดีต่อฟลูโอเรสซีนที่ติดฉลาก เพื่อตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์และทดสอบด้วยปฏิกริยาการเกิดสี วิธีนี้สามารถแยกกลุ่มผลบวกและกลุ่มลบได้อย่างสมบูรณ์เมื่อใช้ค่าจุดตัดความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เท่ากับ 0.18

ความสอดคล้องของการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ จากเชื้อที่เพาะเลี้ยง จำนวน 56 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์โดยสถิติแคปปา ระหว่างวิธี AGE กับวิธี ELISA หรือ AGE กับวิธี DBH จะได้ 0.964 เท่ากัน และโดยวิธี DBH กับ ELISA จะเท่ากับ 1.0 ซึ่งทั้งหมดนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนการวิเคราะห์กับตัวอย่างเสมหะจำนวน 190 ตัวอย่าง ระหว่างวิธี AGE กับ ELISA จะให้ความสอดคล้องกันอย่างสูง ($K=1$ โดยสถิติการวิเคราะห์แคปปา) ค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพการทดสอบ ของวิธี AGE กับ ELISA คิดเป็น ร้อยละ 89.9, 100 และ 95.8 ตามลำดับ ในขณะที่วิธี DBH เป็น 92.4, 98.2, 95.8 ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าระหว่างวิธีทั้งสามไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) วิธี DBH หรือ ELISA เพิ่มความไวในการตรวจจาก PCR-AGE ถึง 10 เท่า คือ ตรวจดีเอ็นเอได้ต่ำสุดถึง 1 พิโคกรัม จากเดิม 10 พิโคกรัม หรือ เชื้อประมาณ 3 เซลล์ จากเดิม 30 เซลล์ ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่ตรวจโดยวิธี ELISA น้อยกว่าโดยวิธีอื่นถึงครึ่งเท่า และใช้เวลาในการตรวจสอบโดยประมาณ 4 ชั่วโมง

โดยสรุป วิธี ELISA hybridization สมควรที่นำมาใช้แทนวิธี AGE และDBH ในการตรวจหาผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อวัณโรคได้อย่างรวดเร็ว เพราะ ความไว ความจำเพาะ ประสิทธิภาพของการตรวจไม่แตกต่างกัน แต่มีประโยชน์เหนือกว่าวิธี AGE และ DBH หลายประการ ทั้งในด้านความสะดวก ความรวดเร็ว ความปลอดภัย ราคา การอ่านและแปลผล รวมทั้ง ความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาทางระบาดวิทยาที่ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก

Copyright by Mahidol University