Thesis Title Optimization of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification of *Mycobacterium* spp.

Author Miss Kanokwan Saengsawang

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Suchart Punjaisee

ABSTRACT

In this study, the Single-tube Multiplex PCR for *Mycobacterium* species identification was established. This Multiplex PCR assay could detect the 16S-23S rDNA spacer of genus *Mycobacterium*, and also possesses six species of *Mycobacterium* identification capacity. The primers using in this Multiplex PCR were searched and modified specific to *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, and *M. fortuitum*, which identified by amplified products of 260/320 bp, 95/320 bp, 75/335 bp, 17/320 bp, 340/320 bp and 210/370 bp, respectively. The optimized annealing temperature for this multiplex PCR was 63.5^{o}C. The optimized concentration of $MgCl_2$ and dNTPs were 1.5 mM and 200 μM, respectively. The condition of this Multiplex PCR is firstly denaturated at 94 ^{o}C for 5 min, and followed by 5 min, 30 cycles of denaturation at 94 ^{o}C 1 min, annealing at 63.5 ^{o}C, 1 min, extention at 72 ^{o}C,1 min, and final extension at 72 ^{o}C for 10 mins. The sensitivity of this Multiplex PCR also was tested, at least 10^5 cells of mycobacteria could be detected.The specificity of this Multiplex PCR was tested by performing with 21 referent strain strains of mycobacteria. The results showed the right identification to all 21 referent strains of mycobacteria, except *M. gordonae.* This species could be identified extra from 6 selected species. The identification results

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

showed 100% negative with 51 isolates of nonmycobacteria and 98.4% concordance when compared with PCR-REA in 64 clinical isolates of mycobacteria. In conclusion Multiplex PCR is another choice that is easy, rapid and low cost suitable for identification of six *Mycobacterium* species in one reaction.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีมัลติเพลกโพลีเมอร์เรสเชนรี แอคชันสำหรับการตรวจจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

ผู้เขียน นางสาวกนกวรรณ แสงสว่าง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. สุชาติ ปันจัยสีห์

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาการตรวจหาและจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยเทคนิคมัลติเพกพีซีอาร์ในหลอดเดียว โดยมีเป้าหมายบนยีนส์ 16S-23S rDNA spacer ของเชื้อมัยโคแบทีเรีย ซึ่ง primer ที่นำมาศึกษาครั้งได้มาจากการค้นหาและดัดแปลงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่จำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* และ *M. fortuitum* โดยผลผลิตมีขนาด 260 กับ 320 bp, 95 กับ 320 bp, 75 กับ 330 bp, 170 กับ 320 bp, 320 กับ 340 bp และ 210 กับ 370 bp ตามลำดับ เทคนิคมัลติเพกพีซีอาร์ในครั้งนี้ได้ทำการปรับค่าต่างๆให้เหมาะสมกับการทดสอบซึ่งได้แก่ annealing temperature

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่ากับ 63.5^{o}C, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 1.5 mM และ dNTPs เท่ากับ 200μM ส่วนสภาวะที่ทดสอบคือ รอบแรกของ denaturation ที่ 94^{o}C นาน 5 นาที ต่อด้วยสามสิบรอบของ denaturation ที่ 94^{o}C นาน 1 นาที, annealing ที่ 63.5^{o}C นาน 1 นาที, extension ที่ 72^{o}C นาน 1 นาที และรอบสุดท้ายของ extention ที่ 72^{o}C นาน 10 นาที ความไวของวิธีมัลติเพกพีซีอาร์นี้พบว่าต้องมีปริมาณเชื้อมัยโคแบคทีเรียอย่างน้อย 10^5 เซลล์จึงสามารถตรวจพบได้โดยวิธีนี้ ได้มีการทดสอบถึงความจำเพาะวิธี Multiplex PCR โดยทดสอบกับเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธ์มาตรฐาน 21 สายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *M. gordonae* ซึ่งสปีชีส์ นี้นับว่าเป็นสปีชีส์ที่สามารตรวจจำแนกได้เป็นพิเศษ นอกเหนือจาก 6 สปีชีส์ ที่ได้เลือกเอาไว้ ผลการตรวจจำแนกเชื้อแสดงผลลบ 100% ต่อการตรวจเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่เชื้อมัยโคแบคทีเรีย และเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 64 เชื้อโดยวิธี PCR-REA ปรากฏว่าได้ผลถูกต้องตรงกัน 98.4% โดยสรุปเทคนิคมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่ง่ายรวดเร็ว และประหยัด เหมาะสำหรับการตรวจจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้ 6 สปีชีส์ ในหนึ่งการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved