การตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค multiplex PCR และ reverse hybridization

นางสาว สัณห์จิรา จันทรพรชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-17-6802-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Multiplex PCR and Reverse Hybridization to Detect and Identify *Mycobacterium* species.

Miss Sanjira Juntarapornchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-17-6802-8

Thesis Title	MULTIPLEX PCR AND REVERSE HYBRIDIZATION TO DETECT AND IDENTIFY*MYCOBACTERIUM* SPECIES.
By	Miss Sanjira Juntarapornchai
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor. Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Nibondh Udomsantisuk, M. Sc.)

..... Member
(Charoen Chuchottaworn, M.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัณห์จิรา จันทรพรชัย : การตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค multiplex PCR และ reverse hybridization (MULTIPLEX PCR AND REVERSE HYBRIDIZATION TO DETECT AND IDENTIFY *MYCOBACTERIUM* SPECIES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ธัมวาสร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข, 112 หน้า. ISBN 974-17-6802-2

เนื่องจากการแพร่ระบาดของเชื้อ HIV ทำให้อุบัติการณ์ของวัณโรคและโรคติดเชื้อ NTM มีอัตราสูงขึ้น จำเป็นต้องหาวิธีที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียสำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นแก่แพทย์ในการวางแผนการรักษา ในการศึกษานี้จึงพัฒนาวิธีการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค multiplex PCR และ reverse hybridization โดยเทคนิค multiplex PCR สามารถจำแนก *M. tuberculosis* complex , *M. avium, M. intracellulare* และ *Mycobacterium* genus ในการทดสอบ 1 ครั้ง ความไวของวิธี Multiplex PCR ในการตรวจหา DNA ของ genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, และ *M. intracellulare* คือ 10 pg , 10 pg, 10 pg , และ 1 ng ตามลำดับ Multiplex PCR ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ของแบคทีเรียชนิดอื่นและรา ยกเว้น *Nocardia* การทดสอบใน clinical isolates ของมัยโคแบคทีเรีย 85 ตัวอย่าง, สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่ให้ผล AFB positive จำนวน 50 ตัวอย่าง และ hemoculture ที่ให้ positive signal และ AFB-positive 50 ตัวอย่างพบว่า multiplex PCR ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการที่ทดสอบเป็นประจำ โดยสามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ *M. tuberculosis* complex, *M. avium,* และ *M. intracellulare* ได้จากมัยโคแบคทีเรียอื่น Reverse dot blot hybridization ที่พัฒนาขึ้น เพื่อตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียจาก amplified product ของ multiplex PCR สามารถจำแนกสปีชีส์เพิ่มขึ้นคือ *M. chelonae* หรือ *M. abscessus, M. flavescens, M. fortuitum, M. gordonae, M. kansasii* หรือ *M. gastri* หรือ *M. scrofulaceum* หรือ *M. simiae,* และ *M. xenopi* ความไวของวิธี reverse dot blot hybridization เหมือนกับ multiplex PCR โดย species-specific probes ไม่จับกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่นและรา

การศึกษาครั้งนี้พบว่า เทคนิค multiplex PCR และ reverse hybridization สำหรับตรวจหาและจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย เป็นวิธีการที่มีความรวดเร็ว (ให้ผลการทดสอบภายใน 6-10 ชั่วโมง) แม่นยำ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการได้

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....สัณห์จิรา จันทรพรชัย.....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4589071920 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : Mycobacterium/16S rRNA gene /16S rDNA/multiplex PCR/ reverse hybridization
SANJIRA JUNTARAPORNCHAI :. MULTIPLEX PCR AND REVERSE HYBRIDIZATION TO DETECT AND IDENTIFY *MYCOBACTERIUM* SPECIES.
THESIS ADIVISOR : ASSOC. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D.
THESIS CO- ADVISOR : NIBONDH UDOMSUNTISUK, M. Sc., 112 pp. ISBN 974-17-6802-8

The human immunodeficiency virus (HIV) epidemic increases in the incidence of tuberculosis and other infection caused by nontuberculous mycobacteria (NTM). It is therefore important to rapidly and accurately identify species of mycobacteria for treatment guidelines. In this study, multiplex PCR and reverse hybridization were developed to identify species of mycobacteria. Multiplex PCR could identify *M. tuberculosis* complex, *M. avium, M. intracellulare*, and genus *Mycobacterium* in only one test. The sensitivity of multiplex PCR to detect DNA of genus *Mycobacterium, M. tuberculosis* complex, *M. avium,* and *M. intracellulare* was found to be 10 pg, 10 pg, 10 pg, and 1 ng, respectively. Multiplex PCR could not amplify DNA of other bacteria and fungi except *Nocardia.* The multiplex PCR correctly identified 85 clinical isolates of mycobacteria, detected and identified mycobacteria in 50 AFB-positive clinical specimens and 50 signal-positive hemoculture samples. The developed reverse dot blot hybridization was able to detect the additional *Mycobacterium* species from the amplified product of multiplex PCR, i.e., *M. chelonae* or *M. abscessus*, *M. flavescens, M. fortuitum, M. gordonae, M. kansasii* or *M. gastri* or *M. scrofulaceum* or *M. simiae,* and *M. xenopi.* The sensitivity of reverse dot blot hybridization was the same as that of multiplex PCR. Species-specific probes did not cross-react with DNA of other bacteria and fungi.

This study concludes that multiplex PCR and reverse hybridization to detect and identify *Mycobacterium* species are rapid (within 6-10 h), accurate method and might be applicable for identification of mycobacteria in routine laboratories

Field of study Medical Microbiology
Academic year 2004

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible:

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor for her excellent instruction, advice, indispensable help, encouragement and criticism throughout the period of this study.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his kindness, suggestion and assistance.

Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, the chairman of thesis committee and Dr. Charoen ChuChottaworn, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

The National Center of Genetic Engineering and Biotechnology for the research grant to support this study. The staffs of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their friendship and also special thanks to Miss Ajcharaporn Sawatpanich, Miss Kamoltada Naweewitpadung, and Miss Anchalee La-ard for suggestion and help in laboratories. All the staffs of Mycobacteriology laboratory for their kind help in collecting the clinical isolates.

Finally, I am deeply indepted to my parents for their love, supporting, encouragement and understanding during this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT..... v
ACKNOWLEDGEMENTS..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... viii
LIST OF FIGURES.....ix
ABBREVIATIONS.....xi
CHAPTER
I. INTRODUCTION..... 1
II. OBJECTIVE..... 4
III. LITERATURE REVIEWS..... 5
General characteristic..... 5
Classification..... 6
Culture media and isolation methods..... 7
Identification.....12
Epidemiology 30
IV. MATERIALS AND METHODS..... 32
V. RESULTS..... 49
VI. DISCUSSION.....77
VII. CONCLUSION.....80
REFERENCES..... 81
APPENDICES..... 91
APPENDIX I..... 92
APPENDIX II..... 94
APPENDIX III..... 95
BIOGRAPHY.....100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1. The species of mycobacteria.....9
2. Suggested Media for cultivation of Mycobacteria from clinical specimens.....10
3. Commonly used commercial liquid media systems to culture and detect the growth of mycobacteria.....11
4. Colony morphology and growth characteristics of Mycobacteria encountered in the clinical laboratory.....14
5. Growth of mycobacteria regarding to temperature.....15
6. Distinctive properties of cultivable mycobacteria encountered in clinical specimens.....16
7. Key biochemical reaction to help distinguish mycobacteria belonging to the same mycobacterial group.....18
8. Reference *Mycobacterium* strains and other microorganisms.....34
9. Clinical isolates of mycobacteria used in this study..... 35
10. Sequences and concentration of the 16S rDNA amino-linkoligonucleotides.....46
11. Results of hybridization of mycobacterial and nonmycobacterial 16S rDNA PCR products with specific oligonucleotide probes.....57
12. Mismatches between species-specific probes and the corresponding regions in the 16S rDNA of other mycobacterial species 58
13. Results of multiplex PCR and reverse hybridization assay tested with of *Mycobacterium* clinical isolates..... 62
14. Results of multiplex PCR and reverse hybridization assay tested in hemoculture samples compared with results of conventional methods.....66
15. Results of multiplex PCR and reverse hybridization assay tested in clinical specimens compared with results of conventional methods.....67

LIST OF FIGURES

FIGURES PAGE

1. Diagramatic section of the mycobacterial cell wall..... ...6
2. Primer extension. DNA polymerase extends a primary by using a complementary strand as a template..... 24
3. Schematic diagram of PCR 25
4. Dideoxynucleotide and Sanger sequencing principle.....26
5. Chromatogram of sequencing by automate sequencer.....27
6. Schematic overview of 16S rRNA gene and MPB 70 gene to amplify PCR product by multiplex PCR..... 44
7. Sensitivity of the detection of *M. tuberculosis* H37Rv using multiplex PCR.....51
8. Sensitivity of the detection of *M. avium* using multiplex PCR.....51
9. Sensitivity of the detection of *M. intracellulare* using multiplex PCR..... 52
10. Sensitivity of the detection of *M. kansasii* using multiplex PCR.....52
11. Electrophoresis separation of PCR products obtained by multiplex PCR of genomic DNAs of the *M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare* and the other microorganisms.....53
12. Determination of the sensitivity of PCR by the reverse dot blot hybridization assay (*M. tuberculosis* H37Rv).....54
13. Determination of the sensitivity of PCR by the reverse dot blot hybridization assay (*M. xenopi*).....55
14. Representative example of the specificity of the reverse dot blot hybridization assay.....59
15. Amplification of mycobacterial DNA from clinical isolates by two Extraction method.....60
16. Electrophoresis separation of PCR products obtained by multiplex PCR of genomic DNAs of the *M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare* and clinical isolates.....63

FIGURES PAGE

17. Representative example of the specificity of the reverse dot blot hybridization assay from clinical isolates.....64
18. Electrophoresis separation of PCR products obtained from AFB-positive hemoculture samples.....68
19. Electrophoresis separation of PCR products obtained from AFB-positive clinical specimens.....69
20. Representative result of the specificity of the reverse dot blot hybridization assay tested in hemoculture samples and clinical specimens 70
21. Chromatogram of sequencing by automate sequencer of *M. abscessus*.....72
22. Chromatogram of sequencing by automate sequencer of *M. fortuitum*.....73
23. Chromatogram of sequencing by automate sequencer of *M. kansasii*.....74
24. Chromatogram of sequencing by automate sequencer of *M. scrofulaceum* 75
25. Chromatogram of sequencing by automate sequencer of *M. flavescens*.....76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	Adenosine
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
bp	base pair
C	cytidine
CO_2	carbon dioxide
°C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
DDW	double distilled water
DNA	deoxynucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide - tri - phosphate
DW	distilled water
EDTA	ethyenediamine tetraacetic acid
et al.	et alii
g	gram
G	guanosine
GLC	gas liquid chromatography
HCl	hydrochloric acid
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	high performance liquid chromatography
hr	hour
i.e.	id est
M.	Mycobacterium
M	molar
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute (s)
ml	Milliliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mM	millimolar
NaCl	sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NTM	Non-tuberculous mycobacteria
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomol
RNA	ribonucleic acid
RFLP	restriction fragment length polymorphism
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
16S rRNA	sixteen subunit ribonucleic acid
16S rDNA	sixteen subunit deoxynucleic acid
s	second
T	thymidine
TB	tuberculosis
TBE	Tris-borate buffer
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris - (Hydroxymethyl) - aminoethane
U	Unit
µg	microgram
µl	microliter
µm	micromolar
UV	ultraviolet
V	voltage
WHO	World Health Organization

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย