

TRG4680028. **LightCycler real-time PCR for quantitative detection of *Mycobacterium leprae*.**

Janisara Rudeeaneksin *Leprosy and other Mycobacteria group,*  
*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public*  
*Health, Thailand.* [janisarar@gmail.com](mailto:janisarar@gmail.com) 1July, 2546 - 30

**ABSTRACT**

Leprosy is chronic infection disease caused by *Mycobacterium leprae*, an organism that cannot be cultivated on artificial medium. Enumeration of *M. leprae* for determination of bacterial index is required for leprosy classification, monitoring of leprosy chemotherapy and diagnosis of relapse. In clinical application, quantification of *M. leprae* relies on microscopic examination and counting of bacilli in stained specimens. The counting method yielding results with limited specificity and sensitivity. This study is aimed to develop and evaluate the application of a fluorescence real-time PCR assay for quantifying *M. leprae* in skin specimens. The real-time PCR is based on a capillary format of the LightCycler using SYBR Green I fluorescent dye as a detection signal. Primers were applied to amplify a portion of 171 bp fragment of *M. leprae* 16S rRNA gene. Using commercial Flexigene, with modifications, resulted in high yields of isolated DNA. The PCR assay was specific for *M. leprae* and able to detect as low as 20 fg of *M. leprae* DNA. The analytical sensitivity was as low as one cell of bacilli. The melting temperature of this PCR product was 86°C. By the use of normalized quantitative real-time PCR, *M. leprae* was detected in 40 multibacillary (MB) patients with bacilli number in the range of  $1.07 \times 10^2$  –  $1.08 \times 10^8$  bacilli in 6x6 mm skin biopsy specimen. The detectable number of bacilli in skin biopsies from 28 paucibacillary (PB) patients is of the order of  $3.87 \times 10^2$  –  $3.9 \times 10^3$  bacilli. The preliminary results demonstrated that LightCycler real-time PCR appeared to be a robust tool for quantitative detection of leprosy bacilli in clinical specimens and could be adopted as a molecular tool for quantification of *M. leprae* in other experimental settings.

**Keywords:** Real-time PCR, *M. leprae*, Quantitative PCR

TRG4680028 **LightCycler real-time PCR** สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ  
จณิสรา ฤทธิเนกสิน ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น  
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข  
[janisarar@gmail.com](mailto:janisarar@gmail.com) 1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548

## บทคัดย่อ

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคเรื้อนด้วยการนับจำนวนเชื้อย้อมติดสีทึบกรด และอ้างอิงปริมาณเชื้อโดยใช้ค่า bacterial index เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ร่วมกับการตรวจวินิจฉัยจากอาการทางคลินิก เพื่อจำแนกประเภทผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก และประเภทเชือน้อย แสดงประสิทธิภาพการรักษาด้วยยาเคมี และแสดงถึงการกลับเป็นโรคซ้ำ แต่เนื่องจากตรวจนับจำนวนเชื้อที่ติดสีย้อมติดสีทึบกรดภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีข้อจำกัดทั้งทางด้านความจำเพาะ และความไวในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคทางคลินิก ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา และประเมินเทคนิค fluorescence real-time PCR เพื่องานตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคเรื้อน และตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ โดยการสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนังด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Flexigene ทำปฏิกิริยาเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมายที่ตำแหน่ง 16S rRNA gene ขนาด 171 คู่เบสของเชื้อโรคเรื้อนในหลอดคาพิลลารี (capillary) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นด้วยเครื่องอัตโนมัติ LightCycler Real-time PCR และตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงของสาร SYBR Green I ที่ติดฉลากบนผลิตภัณฑ์ PCR จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเบื้องต้นพบว่า เทคนิคนี้มีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อน (*Mycobacterium leprae*) และมีความไวในการตรวจหา DNA ของเชื้อต่ำสุด 20 เฟมโตกรัม หรือตรวจหาเซลล์ต่ำสุด 1 เซลล์ เมื่อศึกษาอุณหภูมิหลอมตัว (melting temperature) ของผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม melting analysis ของเครื่อง LightCycler Real-time PCR พบว่า ผลผลิต PCR ที่ได้มีค่าอุณหภูมิหลอมตัวประมาณ 86 องศาเซลเซียส จากการตรวจนับจำนวน เชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างผิวหนังของผู้ป่วยประเภทเชื้อมาก 40 ราย ด้วยโปรแกรม quantitative analysis ของเครื่องมือ มีจำนวนตั้งแต่  $1.07 \times 10^2$  –  $1.08 \times 10^8$  เซลล์ ต่อ ชิ้นเนื้อผิวหนัง 6x6 มิลลิเมตร และจำนวนเชื้อโรคเรื้อนในผิวหนังของผู้ป่วยประเภทเชือน้อย 28 ราย มีประมาณ  $3.87 \times 10^2$  –  $3.9 \times 10^3$  เซลล์ ผลการศึกษาเบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า LightCycler real-time PCR เป็นเครื่องมือที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ และเป็นเครื่องมือทางชีวโมเลกุลสำหรับวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในศึกษาอื่นครั้งต่อไป

คำหลัก: เชื้อโรคเรื้อน, Real-time PCR, Quantitative PCR