



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ LightCycler real-time PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ
LightCycler real-time PCR for quantitative detection of *Mycobacterium leprae*

โดย นางสาวจณิสรา ฤทธิเนกสิน

30 พฤศจิกายน พ.ศ. 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ LightCycler real-time PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ
LightCycler real-time PCR for quantitative detection of *Mycobacterium leprae*

ผู้วิจัย นางสาวจณิศา ฤดีอเนกสิน
สังกัด ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมควบคุมโรคติดต่อ
(ความเห็นรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ผู้วิจัยและคณะ ขอขอบคุณผู้สนับสนุนงานวิจัย ดังต่อไปนี้

1. ศาสตราจารย์นายแพทย์ธีระ รามสูต ที่ปรึกษาสถาบันราชประชาสมาสัย และที่ปรึกษากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
2. นายแพทย์จัญญ์ ปิระวารภรณ์ นายแพทย์ผู้ทรงคุณวุฒิ กรมควบคุมโรค กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
3. นายแพทย์เรืองศิลป์ เกื่อนนาดี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลสิรินธร (โนนสมบูรณ์) จ. ขอนแก่น กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
4. นายแพทย์สมศักดิ์ ไชยวัฒน์ ผู้อำนวยการศูนย์โรคเรื้อนเขต 1 กรุงเทพฯ ฯ กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
5. นายแพทย์สมชาย ตั้งสุภชัย ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 นครราชสีมา กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
6. นายแพทย์เกรียงศักดิ์ เวทีวุฒาจารย์ ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ขอนแก่น กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
7. แพทย์หญิงมยุรา กุสุมภ์ และคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กระทรวงสาธารณสุข
8. Professor Dr. Patrick J. Brennan Colorado State University, USA กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
9. Professor Dr. Sang-Nae Cho Yonsei University, South Korea กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
10. Dr. Yo Yuasa Sasakawa Memorial Health Foundation and Leprosy Division กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
11. นายแพทย์ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
12. รศ. นพ. ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดการวิจัย
13. ดร. เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ ฝ่ายโรคเรื้อนและมายโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ในการศึกษาวิจัยนี้
14. รศ. ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ ที่กรุณามอบเชื้อ Mycobacteria ชนิดต่างเพื่อนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยนี้
15. คุณศิริรัตน์ ลิกานนสกุล และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันปาราศนนคราตุร ทุกท่านผู้เกี่ยวข้องที่กรุณาให้ยืมเครื่องมือ Light-Cycler real-time PCR และอำนวยการสะดวกในระหว่างปฏิบัติงานวิจัย

16. นายแพทย์ทวีฤทธิ์ สิทธิเวคิน และเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้อง สถาบันโรคผิวหนังวัดมกุฏกษัตริยาราม สถาบันราชประชาสมาสัย กรมควบคุมโรค ที่ให้ความร่วมมือเก็บตัวอย่างวิจัย
17. คุณสุพรรณิ พัสตร โรงพยาบาลสิรินธร (โนนสมบูรณ์) และเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่าน ให้ความร่วมมือเก็บตัวอย่างวิจัย จังหวัดขอนแก่น กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
18. คุณโสภา ศรีสังข์งาม ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การร่วมมือปฏิบัติงานวิจัย
19. คุณประภาพร สุภาพกุล ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การร่วมมือปฏิบัติงานวิจัย
20. คุณสุกัญญา วัฒนาโคยกกิจ ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่ให้การร่วมมือปฏิบัติงานวิจัย
21. เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น ทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี
22. อาสาสมัครผู้ป่วยทุกท่านที่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้
23. สถาบันราชประชาสมาสัย กรมควบคุมโรค สนับสนุนงานวิจัย
24. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สนับสนุนงานวิจัย
25. คณะกรรมการ และเจ้าหน้าที่ผู้ประสานงาน สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย ที่ช่วยประสานงานโครงการวิจัยฯ กับทางสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้วยดี

ในนามของผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยขอขอบพระคุณผู้มีส่วนสนับสนุนงานวิจัยนี้เป็นอย่างยิ่ง

นางสาวจณิศา ฤดีอเนกสิน

Project Code: TRG4680028

Project Title: LightCycler real-time PCR for quantitative detection of
Mycobacterium leprae

Investigator: Ms. Janisara Rudeeaneksin, Leprosy and other Mycobacteria group,
National Institute of Health, Department of Medical Sciences,
Ministry of Public Health

E-mail Address: janisarar@gmail.com

Project Period: 1 July, 2546 – 30 June, 2548

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 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 1.07×10^2 – 1.08×10^8 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 3.87×10^2 – 3.9×10^3 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

รหัสโครงการ	TRG4680028
ชื่อโครงการ	LightCycler real-time PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ
ชื่อนักวิจัย	นางสาวจณิสรา ฤติอเนกสิน ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
E-Mail	janisara@gmail.com
Project Period:	1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548

TRG4680028 **LightCycler real-time PCR** สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ
จณิสรา ฤทธิเนกสิน ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
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

บทนำ

โรคเรื้อนเป็นโรคติดต่อเรื้อรังของระบบผิวหนังและประสาท ก่อให้เกิดปัญหาสาธารณสุข ทำให้เกิดความพิการและมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัว ผลการใช้ยาบำบัดแบบผสม (Multidrug Therapy, MDT) ทำให้ผู้ป่วยโรคเรื้อนจำนวนมากหายจากโรคและลดการแพร่ระบาดของโรคในชุมชน (Noordeen, 1992) องค์การอนามัยโลกรายงานว่าทั่วโลกมีจำนวนผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ได้รับการลงทะเบียนและรักษา 640,000 คน ใน 91 ประเทศ (World Health Organization, 2000) ถึงแม้ว่ายาบำบัดแบบผสมจะมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อน การที่ผู้ป่วยจะได้รับยาขึ้นอยู่กับ การค้นพบผู้ป่วยและให้การวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว พบว่าในหลายภูมิภาคของโลกการกำจัดโรคเรื้อนยังไม่บรรลุผล (Marlowe and Lockwood, 2001) ซึ่งองค์การอนามัยโลกเคยตั้งเป้าหมายกำหนดให้ภายในปี พ.ศ. 2543 พื้นที่ที่มีโรคชุกชุมสามารถควบคุมโรคเรื้อนได้ โดยวัดจากอัตราการความชุกของผู้ป่วยน้อยกว่าหนึ่งต่อหมื่นของประชากรในประเทศ (Noordeen, 1992) ดังนั้น กิจกรรมการควบคุมและกำจัดโรคเรื้อนเพื่อมิให้เป็นปัญหาสาธารณสุขจึงต้องดำเนินต่อไป

ในประเทศไทยสถานการณ์โรคเรื้อนในปัจจุบันอยู่ในภาวะที่ควบคุมได้ และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง อัตราความชุก (prevalence rate) ของโรคอยู่ในเกณฑ์ตามที่องค์การอนามัยโลกรับรองนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 จนถึง 2543 อัตราการเกิดโรค (incident rate) ของโรคเรื้อนในประเทศไทยพบ 0.5, 0.46, 0.48, 0.37 และ 0.39 ต่อประชากรหนึ่งหมื่นคน ผู้ป่วยใหม่พบ 1,197, 1,457, 1,111, 864 และ 1,037 ราย ตามลำดับ (กองโรคเรื้อน, 2543) ถึงแม้การควบคุมโรคเรื้อนในประเทศไทยจะประสบความสำเร็จ แต่พบว่าจำนวนผู้ป่วยใหม่และอัตราการเกิดโรคยังไม่ลดลง แสดงถึงยังคงมีการแพร่ระบาดของโรค และพบผู้ป่วยที่มีความพิการระดับสูงเกินกว่าเป้าหมายที่กำหนดไว้ไม่เกินร้อยละ 7 จึงมีความจำเป็นในการเร่งรัดการค้นหาผู้ป่วยโรคเรื้อนอย่างมีประสิทธิภาพ ให้การรักษาอย่างถูกต้อง รวดเร็ว ก่อนที่จะเกิดความพิการขึ้น มีการติดตามประเมินผลการรักษา และเฝ้าระวังโรค งานควบคุมป้องกันโรคเรื้อนก็ยังดำเนินต่อไปเช่นเดียวกับในพื้นที่ที่มีอัตราความชุกโรคสูง

การค้นพบผู้ป่วยโรคเรื้อน โดยทั่วไปผู้ป่วยโรคเรื้อนส่วนใหญ่ได้รับการตรวจพบจากอาการของโรคที่ปรากฏชัด (Kurabachew, et al., 1998) ผู้ป่วยในระยะแรกหรือผู้ป่วยที่มีเชื้อน้อย จำเป็นต้องอาศัยวิธีการตรวจวิเคราะห์อื่นๆ ช่วยวินิจฉัย การเพาะเลี้ยงเชื้อโรคเรื้อนไม่สามารถทำได้ การตรวจหาเชื้อติดสีทึบกรด โดยกล้องจุลทรรศน์ตรวจจาก slit skin smear เป็นการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนที่ปฏิบัติอยู่ทั่วไป แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากมีความไวต่ำ (Bryceson and Pfaltzgraff, 1990) การตรวจทางพยาธิวิทยาของผิวหนังต้องอาศัยผู้ปฏิบัติที่มีความชำนาญ เฉพาะ และใช้เวลาหลายวันในการทราบผล การตรวจหาชิ้นส่วนสารพันธุกรรม DNA โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมายที่จำเพาะต่อเชื้อ เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดต่อต่างๆ รวมทั้งการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อน

เนื่องจากสามารถให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์สูง การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนโดยเทคนิค PCR มีรายงานปรากฏอยู่เป็นจำนวนมาก (Arnoldi, et al., 1992; Cox, et al., 1991; de Wit, et al., 1991; Jamil, et al., 1994, Marlowe and Lockwood, et al., 2001, Patel, et al., 1990; Wichitwechkarn, et al., 1995; Williams, et al., 1990) ทั้งนี้เป็นความพยายามในการพัฒนาเทคนิค PCR ให้ได้วิธีที่สะดวกในการปฏิบัติและสามารถตรวจพบเชื้อโรคเรื้อนที่มีจำนวนน้อยในตัวอย่างส่งตรวจ

การใช้เทคนิค PCR ตรวจวิเคราะห์โรคเรื้อน มีหลักฐานกล่าวว่าสามารถใช้ PCR จำแนกเชื้อโรคเรื้อน (*Mycobacterium leprae*) จากเชื้อมัคโคแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ (*Mycobacterium ssp.*) โดยอาศัยไพรเมอร์เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ของยีน 16S rRNA ตรงตำแหน่งที่มีความจำเพาะกับ DNA ของเชื้อโรคเรื้อน และไม่เกิดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA กับเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่น ๆ (Boddinghaus et al., 1990a; Rogall et al., 1990a; b; Stahl and Urbance, 1990; Teske et al., 1991) ต่อมามีการพัฒนา reverse transcription PCR (RT-PCR) เพื่อใช้ตรวจหาโรคเรื้อน โดยการเพิ่มชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่งยีน 16S rRNA จากสารพันธุกรรม RNA เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อโรคเรื้อนมีชีวิตได้ เนื่องจากการสังเคราะห์ RNA จะเกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิต และเสื่อมสลายอย่างรวดเร็วภายหลังจากการตายของเซลล์ และยังเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์โรคเรื้อนเพราะ 16S rRNA เป็นสารพันธุกรรมที่มีปรากฏอยู่หลายชิ้นส่วนในเซลล์หนึ่ง ๆ (Kurabachew, et al., 1998; Phetsuksiri, 2003) ถึงแม้ว่าเทคนิค PCR และ RT-PCR จะเป็นวิธีที่ใช้ตรวจหา DNA และ RNA ได้ตามลำดับ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนที่ให้ผลตรวจรวดเร็ว แม่นยำ มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ conventional PCR ดังกล่าว ไม่สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ดี เนื่องจากมีการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่จุดสิ้นสุดปฏิกิริยาเพียงจุดเดียว อาจไม่เห็นความแตกต่างของปริมาณ DNA และ RNA เนื่องจากปริมาณ DNA ได้ถูกทำให้เพิ่มขึ้นสูงสุด ณ จุดสิ้นสุดของปฏิกิริยา PCR นั้น หรืออาจบอกได้เพียงว่าตัวอย่างนั้นมีเชื้อหรือไม่เท่านั้น การใช้ conventional PCR เพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเครื่อง thermal cycler ธรรมดาทั่วไป ยังมีขั้นตอนที่ยุ่งยากมาก ปัจจุบันมีเทคโนโลยี LightCycler real-time PCR ที่มีการนำสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ มาใช้ร่วมกับการทำ Thermal cycling แบบรวดเร็ว ทำให้สามารถติดตามและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปพร้อมกับการตรวจติดตาม และวิเคราะห์ผลภายในหลอดทดสอบได้ในเวลาเดียวกันขณะเกิดปฏิกิริยา โดยตรวจติดตามผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยา PCR แต่ละรอบ วิธีการนี้มีการนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณที่ให้ผลตรวจรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ ในเชื้อต่างๆ หลายชนิด และยังลดปัญหาการปนเปื้อนที่มักเกิดขึ้นกับ conventional PCR ได้ (Aldea, et al., 2002; Brengel-Pesce, et al., 2002; Harder, et al., 2001; Sloan, et al., 2002; Watkins-Riedel, et al., 2002; Whiley, et al., 2001; 2002; Torres, et al., 2000)

เนื่องจากเชื้อโรคเรื้อนมีลักษณะพิเศษคือ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เหมือนจุลินทรีย์ทั่วไป การตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อโรคเรื้อนเพื่อหาปริมาณเชื้อจึงไม่สามารถ

กระทำได้ ในขณะที่การวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณมีประโยชน์ต่อการใช้เป็นข้อมูลประเมินผลการรักษาโรคเรื้อนด้วยยาเคมีบำบัดต่าง ๆ และมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยจำแนกผู้ป่วยโรคเรื้อนเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก และผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื่อน้อย ซึ่งใช้ยาและระยะเวลาในการรักษาที่แตกต่างกันตั้งแต่ 6 ถึง 24 เดือน ดังนั้นเทคโนโลยี real-time PCR นี้ น่าจะเป็นประโยชน์โดยสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างสิ่งตรวจได้ และเนื่องจาก ยังไม่มีผู้ใดศึกษา การใช้เทคโนโลยี real-time PCR วิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณมาก่อน ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจะพัฒนาเทคโนโลยี real-time PCR และศึกษาว่าเทคนิคดังกล่าวนี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ มีความไว ความจำเพาะสูง และให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่รวดเร็วได้หรือไม่ อย่างไร เทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณนี้ น่าจะมีประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการวินิจฉัยแยกประเภทผู้ป่วยโรคเรื้อน และใช้ติดตามประเมินผลการรักษาในผู้ป่วยโรคเรื้อนได้ ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การพัฒนาการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค conventional PCR

1.1 กำหนดชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย ขนาด 171 คู่เบส บนยีน 16s rRNA ของเชื้อโรคเรื้อนโดย ออกแบบไพรเมอร์ 2 เส้น (ผลิตโดยหน่วย Bioservice, ประเทศไทย) ได้แก่ P2 ตำแหน่งที่ 69-91 มีลำดับเบส 5' CGG AAA GGT CTC TAA AAA ATC TT 3' และ P3 ตำแหน่งที่ 218-239 มีลำดับเบส 5' CGC CAC TCG AGT ATC TCT AAA AAA GATT 3' ที่มีความจำเพาะ และสามารถจับได้กับโครโมโซม DNA ของเชื้อโรคเรื้อน เพียงตำแหน่งเดียว

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR: ประกอบด้วย

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1. น้ำกลั่นผ่านการึ่งฆ่าเชื้อ	6
2. 100% DMSO	5
3. 10x PCR buffer	5
4. 10 mM dNTP (ยี่ห้อ invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา)	1
5. 20 pmol Primer 1	1
6. 20 pmol Primer 2	1
7. 2 U / μ l DNA polymerase (ยี่ห้อ Qiagen, ประเทศ Germany)	1
8. DNA	-
<u>รวม</u>	50

1.3 สภาวะของปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องอัตโนมัติ (ยี่ห้อ Astec program temp control system PC-700 ประเทศญี่ปุ่น) มีดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

สภาวะ	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ระยะเวลา (นาที)	จำนวน รอบ
Predenaturation	95	5	1
Amplification			35
Denaturation	95	1	
Annealing	60	1	
extension	72	1	
extension	72	10	1

1.4 ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR เบื้องต้นด้วย 2% agarose (ยี่ห้อ USB ประเทศสเปน) gel electrophoresis จ่ายกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ด้วยเครื่อง powersupply (E-C Apparatus, Florida) 30 นาที ภายหลังการย้อม DNA ด้วย 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ethidium bromide ตรวจดูผลผลิต PCR ต่อไปด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

2. การพัฒนาการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

2.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR ประกอบด้วย LightCycler FastStart Reaction Mix (ประกอบ *Taq* DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix, SYBR Green I dye and 10 mM $MgCl_2$) (ยี่ห้อ Roche, ประเทศเยอรมัน) 2 ไมโครลิตร , 10 pmol P2 primer 0.5 ไมโครลิตร, 10 pmol P3 primer 0.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นปราศจากเชื้อปนเปื้อน , 25 mM $MgCl_2$ 2.4 ไมโครลิตร, DNA ต้นแบบ ปริมาณรวม 20 ไมโครลิตร บรรจุลงในหลอด Capillaries

2.2 สภาวะของปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR ทำปฏิกิริยาในเครื่องอัตโนมัติ LightCycler real-time PCR (ยี่ห้อ Roche รุ่น 3.1 ประเทศเยอรมัน) ด้วยสภาวะของปฏิกิริยาดังนี้ denaturation 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที , amplification ประกอบด้วยขั้นตอน denature 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, annealing 55 องศาเซลเซียส 5 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ detection 82 องศาเซลเซียส 1 วินาที

2.3 การวิเคราะห์ผลผลิต LightCycler real-time PCR ตรวจสอบได้จาก melting temperature และใช้เทคนิค 2 % agarose gel electrophoresis

3. คัดเลือกวิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนังที่เหมาะสม

3.1 lysis buffer มีขั้นตอนการทำดังนี้ ผสมน้ำยา lysis buffer ที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris HCl (ยี่ห้อ Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา) , 0.05 % Tween 20 (ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมัน) 24 ไมโครลิตร ให้เข้ากับตัวอย่างชิ้นเนื้อแขวนลอย 30 ไมโครลิตร นำไป sonicate 10 นาที เติมเอนไซม์ 50 mg / ml lysozyme 6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และเติมเอนไซม์ Proteinase K บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายควรเติม mineral oil ให้คลุมสารละลายในปฏิกิริยา จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที นำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR หรือ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปใช้ต่อไป

3.2 น้ำยาพร้อมใช้สำเร็จรูป Flexigene DNA (ยี่ห้อ Qiagent ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีขั้นตอนการสกัดตามคู่มือการใช้ดังนี้ นำสารแขวนลอยเซลล์ด้วยสารละลาย lysis buffer → นำไปเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที 3 นาที เก็บตะกอน → ละลายตะกอนด้วยสารละลาย denaturation buffer (มีเอนไซม์ protease K เป็นองค์ประกอบ) → บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที → ตกตะกอน DNA ด้วยการเติม isopropanol 10,000 รอบ/นาที 3 นาที → นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 3 นาที → ล้างตะกอน DNA ด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ → นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 3 นาที → ทำให้ตะกอน DNA แห้ง → ละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่นผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร + RNase A 1 μ g → เก็บสารละลาย DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 น้ำยาสำเร็จรูป DNAzol (ยี่ห้อ Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีขั้นตอนการสกัด DNA ตามคู่มือการใช้ ดังนี้ นำสารแขวนลอยเซลล์มาแยกสาร DNA ด้วยการเติมน้ำยาพร้อมใช้

สำเร็จรูป DNA zal 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เหยี่ยง 10,000 xg 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายสารละลายใส่หลอดใหม่ และตกตะกอน DNA ด้วยการเติม 100 % ethanol 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเหยี่ยง 10,000 xg 10 นาที ล้างตะกอน DNA 2 ครั้งด้วย 75 % ethanol 1 มิลลิลิตร แต่ละครั้งเหยี่ยง 10,000 xg 5 นาที ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร

3.4 วิธีการต้ม: นำสารแขวนลอยเซลล์ต้มในน้ำเดือด 10 นาที เหยี่ยง 13,000x g 1 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งนำไปใช้ต่อไป

4. การทดสอบความจำเพาะต่อการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อน: ตรวจสอบได้โดยใช้ DNA จากเชื้อ mycobacterium ชนิดอื่น (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ โรงพยาบาลศิริราช) เป็น DNA ต้นแบบ และเปรียบเทียบกับ การใช้ DNA ของเชื้อโรคเรื้อน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Patrick J Brannan จากห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยโคโลราโด ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็น DNA ต้นแบบ ทั้งในปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR และ conventional PCR ตามองค์ประกอบ และสภาวะดังที่กล่าวข้างต้น ตรวจสอบปฏิกิริยา PCR โดยการเติม DNA ของเชื้อโรคเรื้อนลงในหลอดปฏิกิริยา PCR ของเชื้อโรคอื่นๆ และตรวจหา DNA เป้าหมายบนยีน 16S rRNA ขนาด 171 คู่เบสบน 2 % agarose gel electrophoresis และตรวจวิเคราะห์ melting temperature ด้วยโปรแกรมของเครื่อง LightCycler real-time PCR

5. การทดสอบความไวต่อการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อน

5.1 ตรวจทดสอบปริมาณ DNA ของเชื้อโรคเรื้อนที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนได้จากการเจือจางปริมาณ DNA ครั้งละ 10 เท่า เริ่มจาก 20 โนกรัม ถึง 2 เฟมโตกรัม ทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย บนยีน 16S rRNA ขนาด 171 คู่เบส ในปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR และ conventional PCR ตามองค์ประกอบ และสภาวะดังที่กล่าวข้างต้น และตรวจหา DNA เป้าหมายบนยีน 16S rRNA ขนาด 171 คู่เบสบน 2 % agarose gel electrophoresis และตรวจวิเคราะห์ melting temperature ด้วยโปรแกรมของเครื่อง LightCycler real-time PCR

5.2 ตรวจทดสอบปริมาณเชื้อโรคเรื้อนที่ต่ำที่สุดที่สามารถวิเคราะห์โรคเรื้อนด้วยเทคนิค PCR โดยการนับจำนวนเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์นำมาสกัด DNA เจือจาง DNA ด้วยน้ำกลั่นปราศจากการปนเปื้อนเชื้อ ครั้งละ 10 เท่าตั้งแต่ 10^6 ถึง 0.1 เซลล์ นำไปใช้ในปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR และตรวจหา DNA เป้าหมายด้วย 2 % agarose gel electrophoresis และตรวจวิเคราะห์ melting temperature ด้วยโปรแกรมของเครื่อง LightCycler real-time PCR

6. การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

6.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve)

การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantification) สามารถกระทำได้โดยใช้โปรแกรม Quantification สร้างกราฟมาตรฐานที่มีความสัมพันธ์แบบ regression ระหว่างปริมาณฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ ณ crossing point (จำนวนรอบที่เริ่มเกิดผลิตผล PCR) กับ log ของค่าความเข้มข้นของ DNA มาตรฐานที่ทราบค่าแล้วขึ้นและนำมาใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR

6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณผลิตผล real-time PCR จากเชื้อโรคเรื้อน $1-10^6$ เซลล์มีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

- การตรวจนับจำนวนเซลล์ของเชื้อติดสีทึบที่แยกได้จากสารละลายเนื้อเยื่อผิวหนัง ขนาด 6 ลูกบาศก์มิลลิเมตรของผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ผ่านการบดจนละเอียด นำมาตรึงเซลล์บนสไลด์ ย้อมเชื้อติดสีทึบ ทดสอบวิธีการของ Ziehl Neelsen ตรวจนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณจำนวนเชื้อติดสีทึบต่อปริมาตรของสารละลายเนื้อเยื่อผิวหนัง 1 มิลลิลิตร
- การเจือจางตัวอย่างเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เชื้อโรคเรื้อนตามต้องการ โดยนำสารละลายเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วยโรคเรื้อนทราบจำนวนเชื้อติดสีทึบแล้วมาเจือจางด้วยสารละลาย phosphate buffer saline ให้ได้ตามจำนวนเซลล์ 1000 , 100, 10 และ 1 เซลล์ตามลำดับ
- สกัด DNA ของเชื้อโรคเรื้อนด้วย Flexi Gene DNA
- นำ DNA ที่สกัดได้ทำปฏิกิริยา Real –time PCR
- นำไปคำนวณหาปริมาณ DNA โดยเข้าโปรแกรม Quantification และเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นไว้เรียบร้อยแล้วซึ่งจะทำให้ทราบปริมาณ DNA จากเชื้อแต่ละจำนวนที่ต้องการหา นอกจากนี้ยังสามารถจะสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์แบบ regression ระหว่างปริมาณฟลูออเรสเซนส์ที่วัดได้ ณ crossing point (จำนวนรอบที่เริ่มเกิดผลิตผล PCR) กับ ค่า log ของจำนวนเซลล์เพื่อนำไปใช้เปรียบเทียบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างต่อไป
- ตรวจยืนยันผลิตผล PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

7 ประเมินประสิทธิภาพ LightCycler Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างโรคเรื้อนชนิดต่าง ๆ

7.1 ศึกษาผู้ป่วยโรคเรื้อน

ผู้ป่วยโรคเรื้อนรายใหม่ทุกประเภท ผู้ป่วยโรคเรื้อนที่กลับเป็นซ้ำ หรือผู้สัมผัสโรคเรื้อนที่ยังไม่แสดงอาการ ทั้งเพศชายและหญิง อายุระหว่าง 15 - 70 ปี ในกรณีของผู้ป่วยโรคเรื้อน ผู้ป่วยทุกรายจะต้องได้รับการวินิจฉัยและจำแนกชนิดของโรค โดยอาศัย ค่า Bacterial index (BI) จากการทำ slit skin smear จำแนกเป็นผู้ป่วยชนิดเชื้อมาก (Multibacillary leprosy, MB) ได้แก่กลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ค่า BI = 0 และผู้ป่วยชนิดเชื้อมาก (Multibacillary leprosy, MB) ซึ่งมีค่า BI > 0 อาศัยอาการทางคลินิก ได้แก่ลักษณะรอยโรคที่ผิวหนังและภาวะภูมิคุ้มกัน สามารถจำแนกผู้ป่วยออกเป็นชนิดต่าง ๆ อาศัยหลักเกณฑ์ของ Ridley และ Jopling ได้ดังต่อไปนี้ I (Indeterminate), TT (Tuberculoid Leprosy), BT (Borderline Tuberculoid Leprosy) , BL (Borderline Lepromatous Leprosy) และ LL (Lepromatous Leprosy) (Ridley and Jopling, 1962 และ 1966) จำนวนผู้ป่วยโรคเรื้อนศึกษารวม 68 ราย

ผู้ป่วยโรคเรื้อนผิวหนังอื่นๆ ที่ได้รับการวินิจฉัยไม่ใช่โรคเรื้อน หรืออาสาสมัครที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง เพศชายหรือหญิง อายุระหว่าง 15 –70 ปี จำนวนอย่างน้อยรวม 10 ราย เป็นกลุ่มประชากรศึกษาเปรียบเทียบ

7.2 การวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่าง

มีขั้นตอนการตรวจหาปริมาณเชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างส่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อผิวหนังจากผู้ป่วยโรคเรื้อน ดังนี้

7.1.1 การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ: ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อขนาด 6x6 มิลลิเมตร ด้วย skin punch บริเวณขอบรอยโรคที่รุนแรงของผู้ป่วย

7.1.2 บดตัวอย่างชิ้นเนื้อให้ละเอียด และนำสารแขวนลอยเนื้อเยื่อผิวหนังมาสกัด DNA ด้วยน้ำยาพร้อมใช้สำเร็จรูป Flexigene เพื่อนำ DNA มาใช้ทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามวิธีที่พัฒนาไว้แล้วข้างต้น ในการวิเคราะห์ตัวอย่างทุกครั้งเพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อโรคเรื้อนจะต้องมีปฏิกิริยาควคุมได้แก่ negative control ซึ่งไม่มี DNA ของเชื้อโรคเรื้อน และ positive control ซึ่งมี DNA ของเชื้อโรคเรื้อนในปฏิกิริยา เพื่อตรวจสอบปัญหาปนเปื้อน และความถูกต้องของวิธีการ

7.1.3 หาปริมาณเชื้อโดยใช้โปรแกรม Quantification ของเครื่อง LightCycler real-time PCR เทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นในขั้นตอนการพัฒนาเทคนิค real-time PCR เพื่อวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ

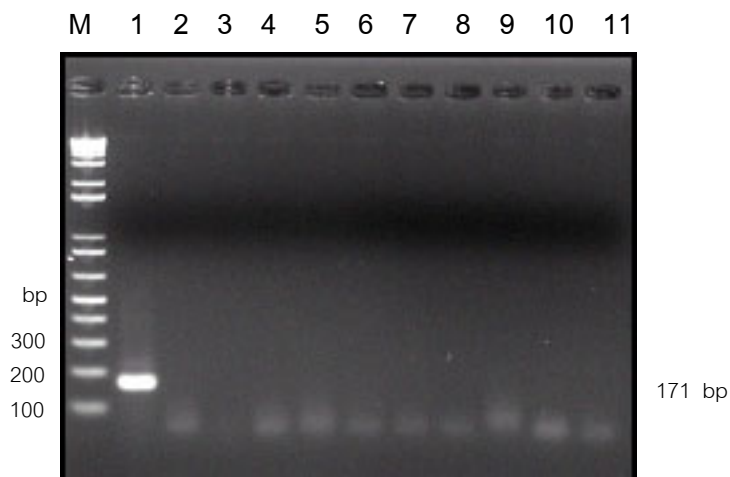
7.1.4 ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต real-time PCR มี 2 วิธี ติดตาม melting temperature ของผลผลิต real-time PCR และตรวจด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ติดตาม DNA ด้วย ethidium bromide ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

8. ประเมินเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโรคเรื้อนกับการตรวจนับหาเชื้อย้อมติดสีทึบกรดด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเปรียบเทียบกับในตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก ส่วนผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื่อน้อยจะตรวจไม่พบเชื้อย้อมติดสีทึบกรด

ผลการทดลอง

1. การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค conventional PCR

1.1 การทดสอบความจำเพาะ: ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนด้วย conventional PCR เมื่อนำ DNA ของเชื้อ *Mycobacterium spp.* ทั้ง 10 ชนิด และแบคทีเรียสกุลอื่นๆ 10 สกุล มาใช้เป็น DNA ต้นแบบ สำหรับเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย โดยใช้ primer P2-P3 องค์ประกอบ ตามสภาวะของปฏิกิริยา PCR ทั้ง conventional PCR ดังกล่าวในวิธีการขึ้น ตรวจสอบชิ้นส่วน DNA บน 2 % agarose gel electrophoresis ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต พบชิ้นส่วน DNA ขนาด 171 คู่เบส เฉพาะในปฏิกิริยา real-time PCR และ conventional PCR ที่มี DNA ของเชื้อโรคเรื้อนเป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยาเท่านั้น ในขณะที่เมื่อใช้ DNA ของเชื้อ *Mycobacterium spp.* ชนิดต่าง ๆ และแบคทีเรียสกุลอื่น ในปฏิกิริยา PCR นี้ตรวจไม่พบชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย ดังในตารางที่ 3 และรูปที่ 1



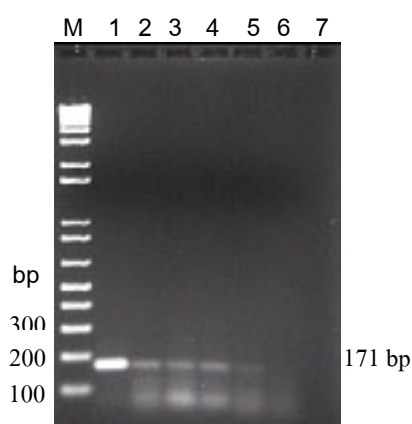
รูปที่ 1 ความจำเพาะของการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนด้วย PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2% agarose gel eletrophoresis และย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์: เลนที่ 1, DNA marker; เลนที่ 2, *M. leprae positive*; เลนที่ 3, *M. leprae negative*; เลนที่ 4, *M. avium*; เลนที่ 5, *M. bovis*; เลนที่ 6, *M. fortuitum* ATCC 23097 ; เลนที่ 7, *M. gordonae*; เลนที่ 8, *M. intracellulare* ATCC18950; เลนที่ 9, *M. kansasii*; เลนที่ 10, *M. marinum*; เลนที่ 11, *M. scrofulaceum*; เลนที่ 12, *M. smegmatis*; เลนที่ 13, *M. tuberculosis*

ตารางที่ 3 แสดงความจำเพาะต่อเชื้อโรคเรื้อนของเทคนิค conventional PCR และ real-time PCR

No.	Bacterial species and strain	Resource	Detection by conventional PCR/ real-time PCR
1	<i>Mycobacterium leprae</i>	Clinical isolate	Positive
2	<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291	Negative
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ra	Negative
4	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 14470	negative
5	<i>Mycobacterium marinum</i>	รพ. ศิริราช	negative
6	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC18950	negative
7	<i>Mycobacterium gordonae</i>	รพ. ศิริราช	Negative
8	<i>Mycobacterium bovis</i>	รพ. ศิริราช	negative
9	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	รพ. ศิริราช	negative
10	<i>Mycobacterium kansasii</i>	รพ.ศิริราช	negative
11	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	รพ.ศิริราช	negative
12	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14470	negative
13	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13311	negative
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	negative
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	negative
16	<i>Listeria monocytogenes</i>	Collection Bank NIH, Thailand	negative
18	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	negative
19	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Collection Bank NIH, Thailand	negative
20	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	negative

1.2 การทดสอบความไวของการวิเคราะห์โรคเรื้อนด้วยเทคนิค conventional

PCR : โดยประเมินจากการใช้ DNA ต้นแบบจากที่ต่ำที่สุดที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR และ ตรวจหาชิ้นส่วน DNA เป้าหมายบน 2 % agarose gel electrophoresis ได้ ภายหลังจากตรวจนับจำนวนเซลล์ของเชื้อโรคเรื้อนด้วยกล้องจุลทรรศน์ และสกัด DNA ด้วยวิธี Flexi Gene DNA ทำการเจือจาง DNA ด้วยน้ำกลั่นที่ระดับต่าง ๆ และนำไปใช้ในปฏิกิริยา PCR ตรวจหาผลของปฏิกิริยาบน 2% agarose gel electrophoresis พบว่า ระดับ DNA เจือจางต่ำที่ใช้ในปฏิกิริยา และสามารถตรวจพบชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย บน agarose gel electrophoresis ได้เท่ากับ 10 เซลล์ ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 2

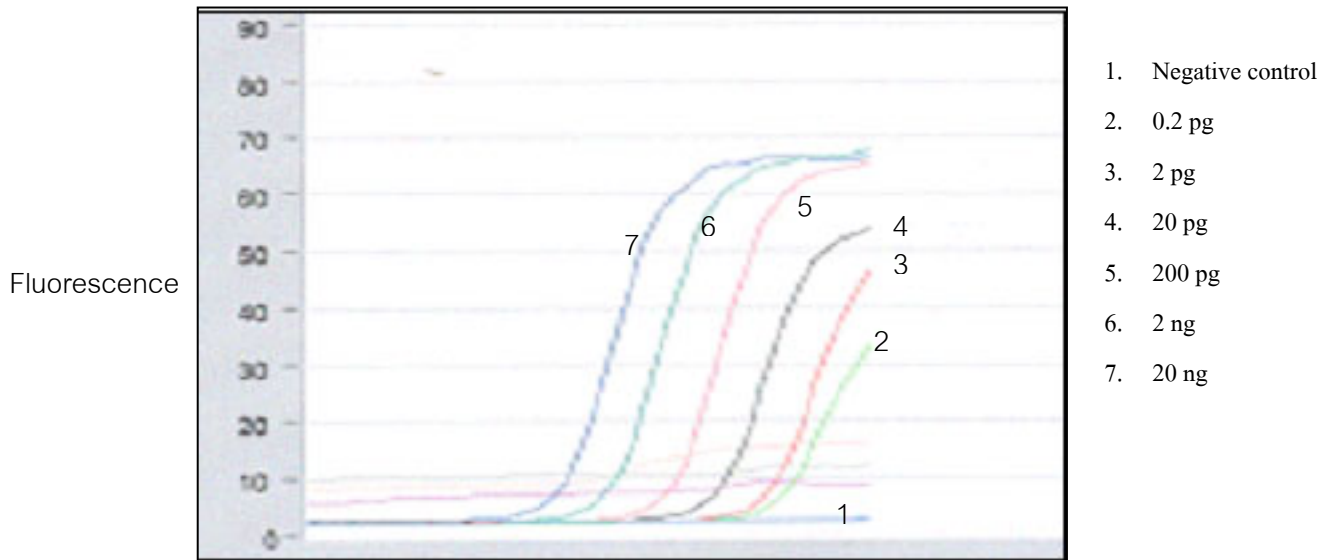


รูปที่ 2 ความไวในการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย 2% agarose gel electrophoresis และย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เลนที่ M, DNA marker; เลนที่ 1, positive control; เลนที่ 2 10^4 เซลล์; เลนที่ 3, 10^3 เซลล์; เลนที่ 4, 10^2 เซลล์; เลนที่ 5, 10^1 เซลล์; เลนที่ 6, 1 เซลล์; เลนที่ 7, negative control

2. การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

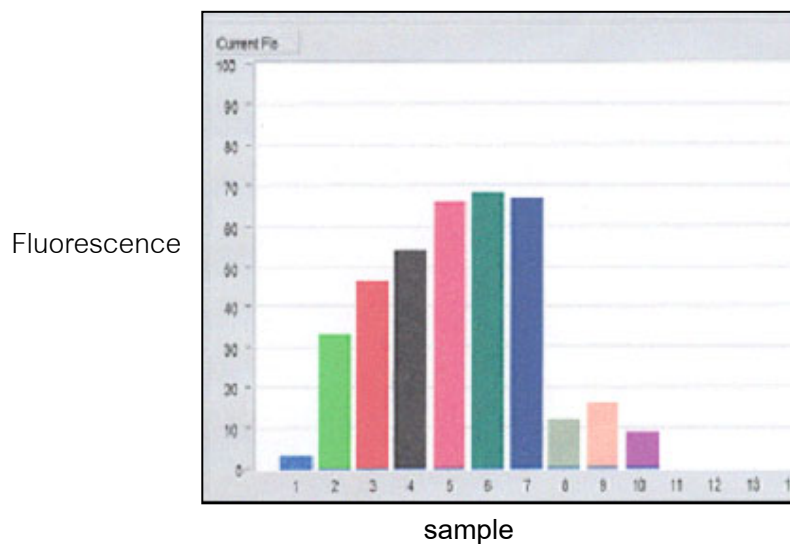
2.1 การทดสอบความไว: ในขณะที่ทำปฏิกิริยา LightCycler real-time PCR ด้วยองค์ประกอบ และสภาวะของปฏิกิริยาตามที่กล่าวไว้ในวิธี ในทุกขณะเวลาการเกิดปฏิกิริยาสามารถติดตามจากสัญญาณ ฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดจากสาร SYBR green I ใช้ติดตามผลผลิต PCR ที่หน้าจอคอมพิวเตอร์ (รูปที่ 3 และ 4) ปฏิกิริยาสิ้นสุดทราบผลภายใน 20 นาที เมื่อครบ 35 รอบ ภายหลังเสร็จปฏิกิริยา ทำการตรวจหาผลผลิต LightCycler real-time PCR ที่เป็นชิ้นส่วน DNA เป้าหมายของเชื้อโรคเรื้อนจากโปรแกรม melting temperature ของเครื่องมือ และการตรวจวิเคราะห์ยอดกราฟที่เกิดขึ้น พบว่า ยอดกราฟที่สูงที่สุด ซึ่งมี melting temperature ของผลผลิต real-time PCR ที่อุณหภูมิ 86 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5) และทำการตรวจยืนยันผลผลิต real-time PCR อีกครั้งด้วย 2 % agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบการเคลื่อนของ DNA marker ที่

ทราบขนาดเรียบร้อยแล้ว พบว่าได้ผลผลิต real-time PCR ที่ได้มีขนาดตรงตามเป้าหมายคือมีขนาด 171 คู่เบส



จำนวนรอบ

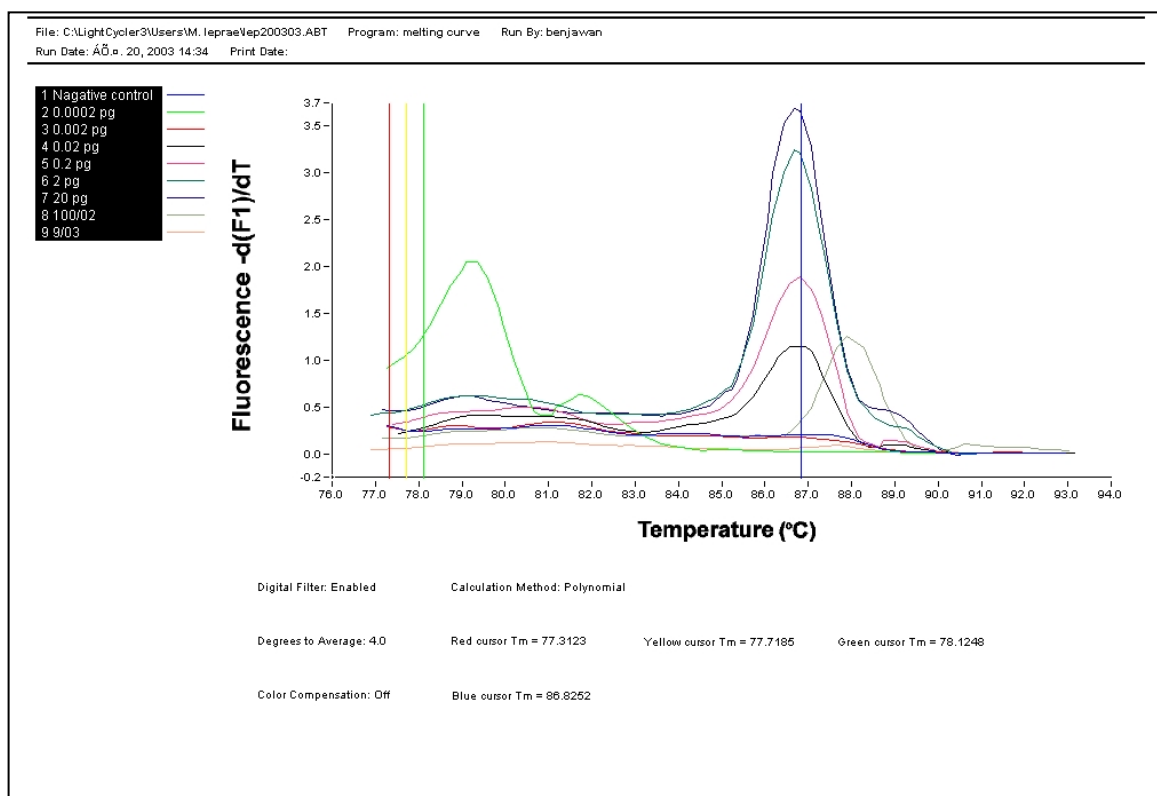
รูปที่ 3 ปริมาณสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของผลผลิตที่เพิ่มในแต่ละรอบของปฏิกิริยา real-time PCR ของ DNA ต้นแบบปริมาณต่าง ๆ



รูปที่ 4 กราฟแท่งแสดงปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ของผลผลิตที่ช่วงเวลาหนึ่ง ๆ ของแต่ละปฏิกิริยา real-time PCR

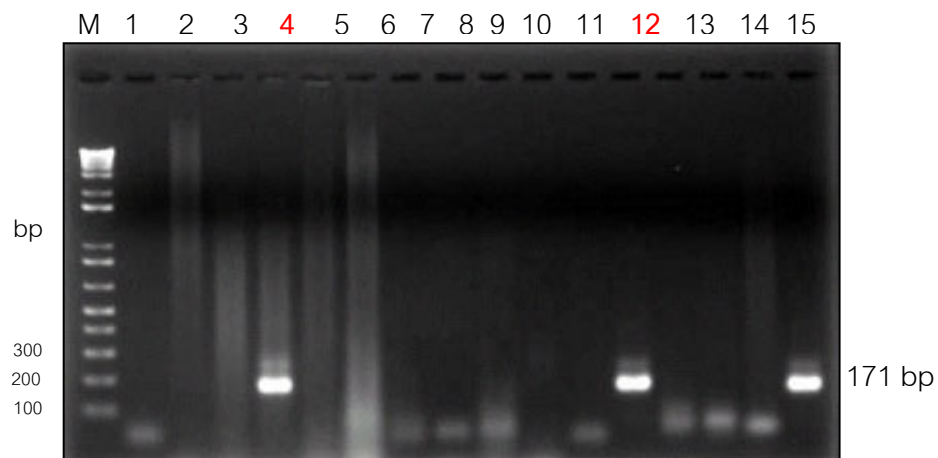
ความไวของตรวจวิเคราะห์ DNA ของเชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค real-time PCR (รูปที่ 4) พบว่าสามารถตรวจ DNA ต่ำสุดเท่ากับ 20 เฟมโตกรัม

2.2 ความจำเพาะของเทคนิค real-time PCR เมื่อตรวจวิเคราะห์ DNA ของมัยโคแบคทีเรียอื่น 10 ชนิด และ DNA ของเชื้อโรคเรื้อน พบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์ผลได้เฉพาะ DNA ของเชื้อโรคเรื้อน และมียอดกราฟเกิดขึ้นเฉพาะปฏิกิริยาที่มี DNA ของเชื้อโรคเรื้อนเกิดขึ้น ยอดกราฟที่เกิดขึ้นมี melting temperature เท่ากับ 86 องศาเซลเซียส ซึ่งตรงกับการทดลองที่ผ่านมาจากผลการทดลองรูปที่ 5



รูปที่ 5 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์แสดงยอดกราฟของผลผลิต real-time PCR ที่มี melting temperature 86 องศาเซลเซียส

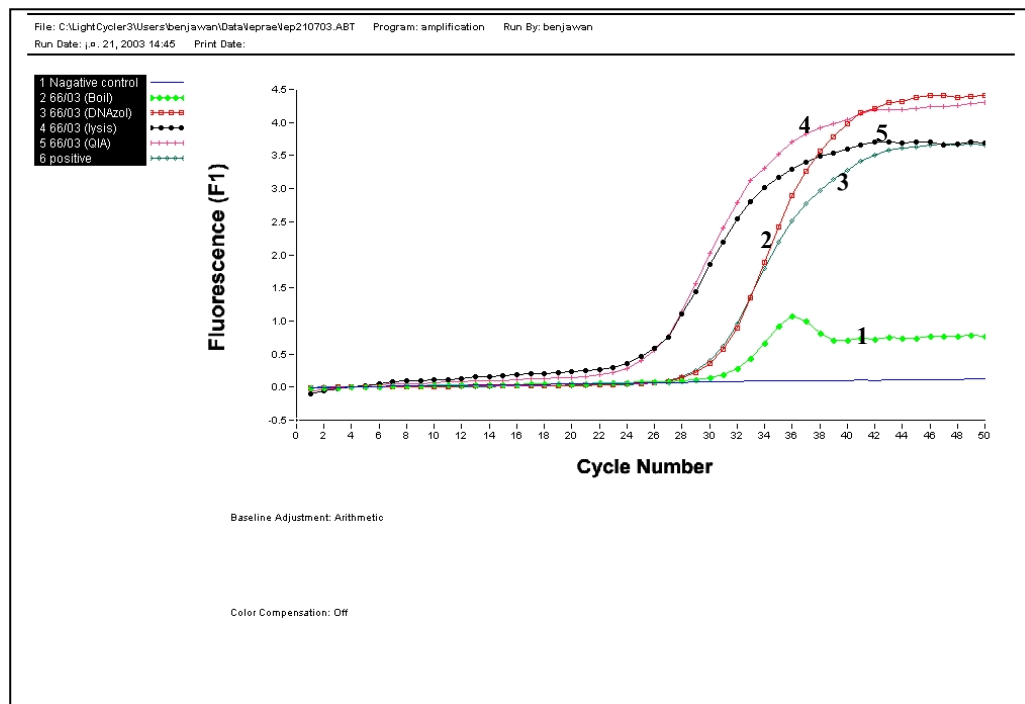
การตรวจสอบยืนยันผลผลิตของ Real-time PCR จากการทดสอบความจำเพาะของเทคนิคด้วย agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถพบ band ขนาด 171 bp เฉพาะผลผลิตของ Real-time PCR ที่มีเชื้อโรคเรื้อนเท่านั้น (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงการตรวจสอบผลผลิตของ Real-time PCR จากการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค ด้วย agarose gel electrophoresis Lane M คือ Marker ; Lane 1, Negative control; Lane 2 ,*B. cereus*; Lane 3 , *S. typhimurium*; **Lane 4, *S. typhimurium*+ *M. leprae***; Lane 5, *E. coli*; Lane 6, *P. aeruginosa*; Lane 7, *S. acolactiae*; Lane 8, *C. ulcerans*; Lane 9, *L. monocytogenes*; Lane10, *S. aureus*; Lane 11, *M. tuberculosis*; **Lane12,*M. tuberculosis* + *M. leprae***; Lane 13, *M. smegmatis* ; Lane14, *M. avium*; Lane 15, *M. bovis*; **Lane16,*M. leprae***

2.3 การคัดเลือกวิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างตัวอย่างผิวหนังที่เหมาะสม

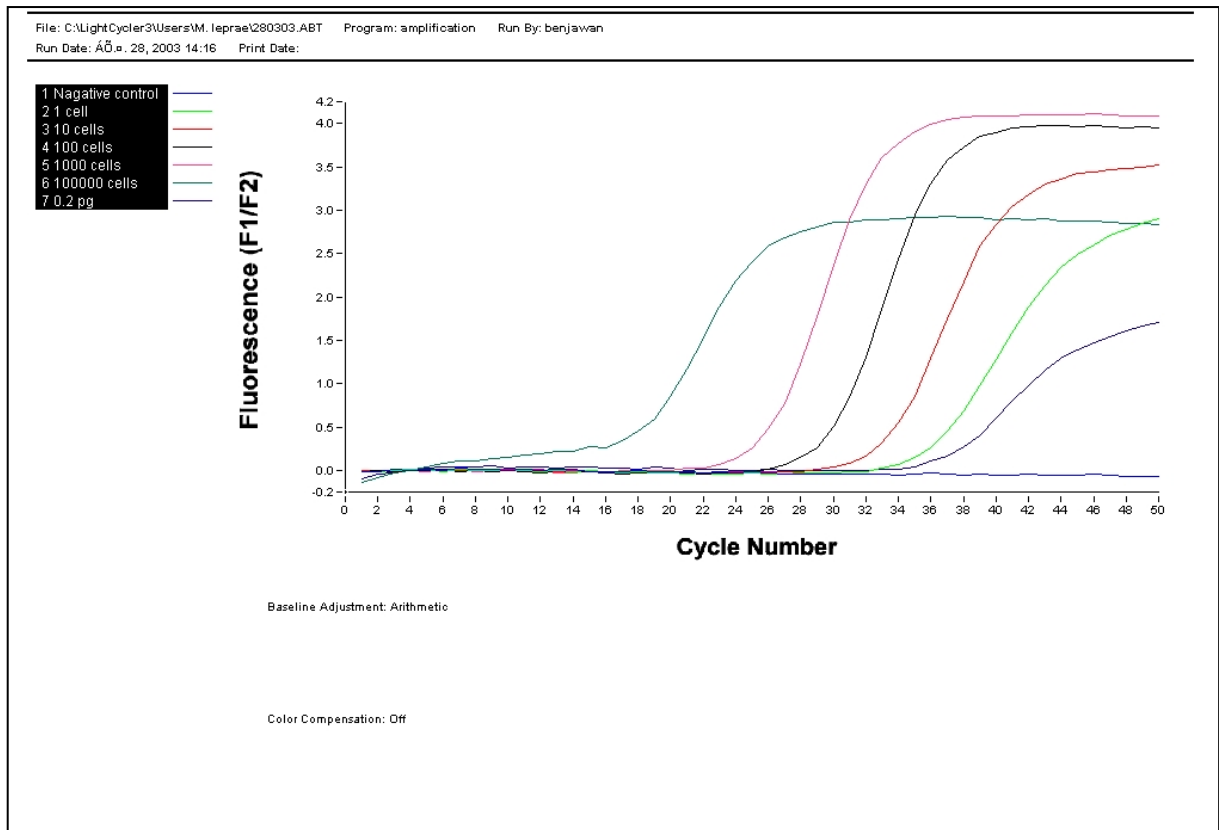
ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณ DNA ต้นแบบที่สกัดจากเชื้อโรคเรื้อนวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ boiling, DNAzol, lysis buffer, Flexigene[®] ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า DNAzol และ Flexigene[®] เป็นวิธีการที่ให้ผลผลิต real-time PCR เกิดขึ้นในรอบต้น ๆ ของปฏิกิริยา คือ มีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่รอบที่ 24 ของปฏิกิริยา (รูปที่ 7) แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด DNA ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวให้ปริมาณ DNA สูง กว่าวิธีการอื่น ๆ



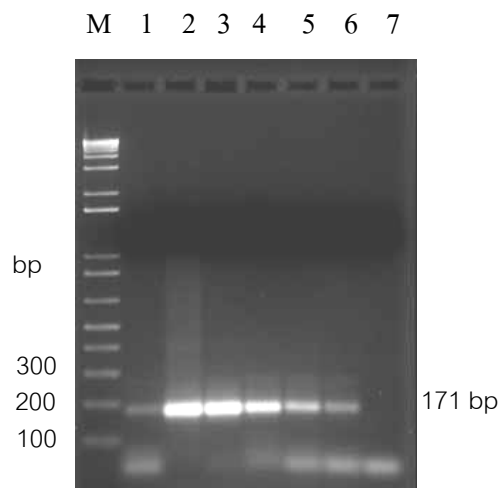
รูปที่ 7 กราฟแสดงการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมายในแต่ละรอบของปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ของเชื้อโรคเรื้อนโดยการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LightCycler real-time PCR

3. ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

3.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อโรคเรื้อน: เมื่อนำตัวอย่างเซลล์แขวนลอยมาย้อมด้วยวิธี Ziehl Neelsen และตรวจนับจำนวนเชื้อติดสีทึบกรด solid from ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ และคำนวณจำนวนเชื้อในตัวอย่าง นำเชื้อจำนวน 10^6 มาเจือจางด้วย 0.9 % NaCl ครั้งละ 10 เท่า เริ่มต้นจาก 10^6 , 10^5 , 10^4 , ..., 1 เซลล์ แล้วนำมาสกัด DNA ด้วยน้ำยาพร้อมใช้สำเร็จรูป Flexigene แล้วนำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR พบว่า สามารถตรวจพบได้ในระดับ 1 เซลล์ รูปที่ 8



รูปที่ 8 สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโรคเรื้อนจำนวนต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10, และ 1 เซลล์ ด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

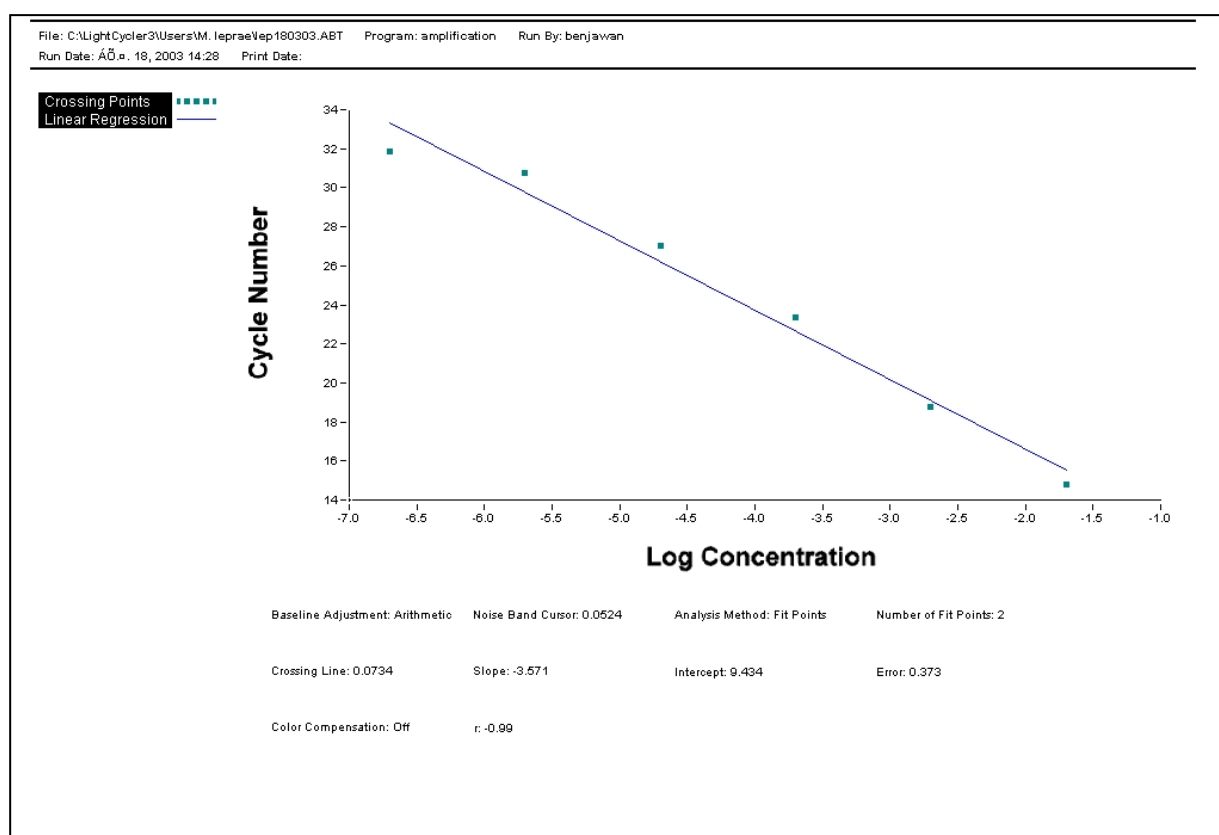


รูปที่ 9 การยืนยันผลผลิต real-time PCR บน 2 % agarose gel electrophoresis ภายหลังการตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Lightcycler real-time PCR: Lane M, DNA marker; lane 1, positive control; lane 2-7, DNA ของเชื้อโรคเรื้อน 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 และ 0.1 เซลล์ตามลำดับ

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐานด้วยขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ของ LightCycler real-time PCR เพื่อวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานปริมาณ DNA ของเชื้อโรคเรื้อน:

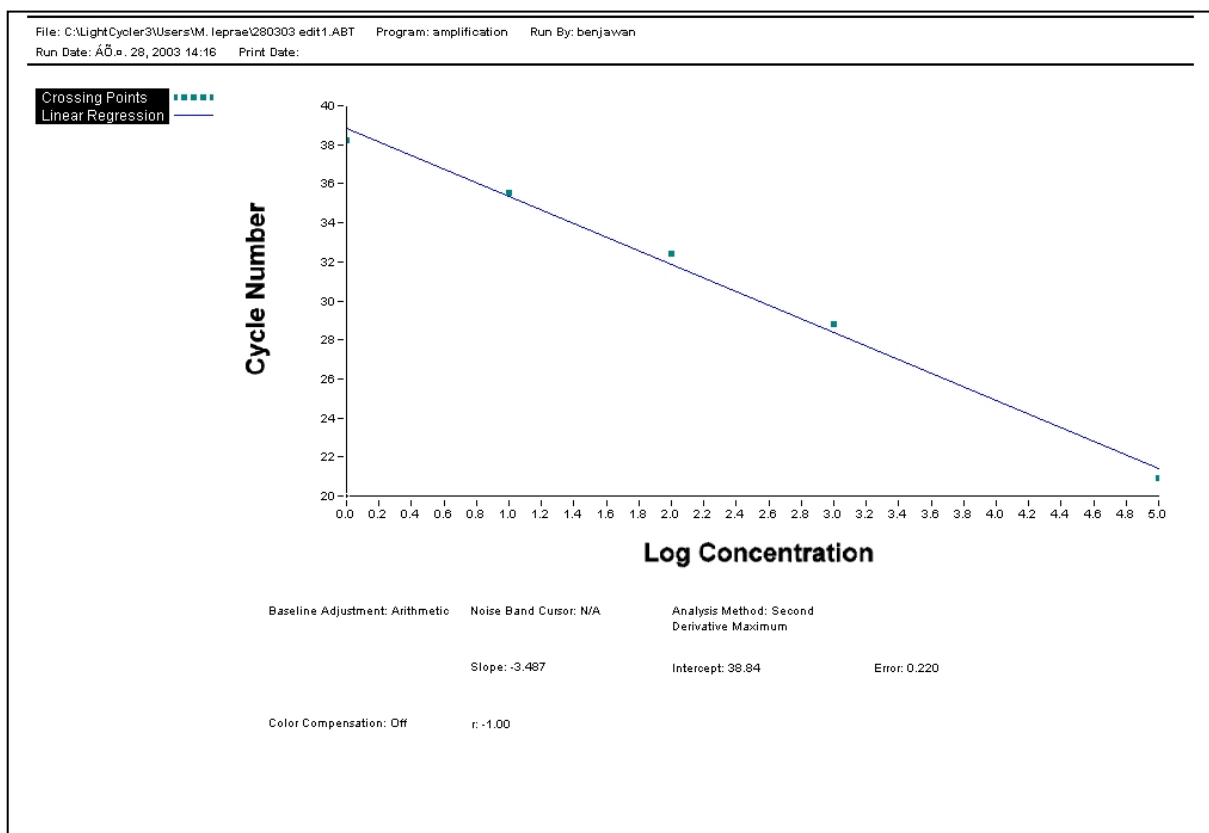
ละลาย DNA 1 ไมโครกรัมด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปนเปื้อน เจือจาง DNA ครั้งละ 10 เท่า ตั้งแต่ 20 นาโนกรัม ถึง 2 เฟมโตกรัม นำ DNA ที่เจือจางแต่ละครั้งไปใช้เป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยา real-time PCR ตามองค์ประกอบและสภาวะที่กล่าวมาแล้ว นำปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เริ่มตรวจจับสัญญาณการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมายไปสร้างกราฟ linear regression ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบที่ทำการปฏิกิริยาที่เริ่มมีการเพิ่มขยาย DNA กับ ค่า log ปริมาณ DNA ที่ใช้เป็นสารตั้งต้น ทั้งนี้มีการสร้างกราฟดังกล่าวด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ปริมาณ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐาน linear regression ระหว่างจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน y) กับ log ปริมาณ DNA ในแต่ละปฏิกิริยา (แกน x)(error, 0.373; correlation coefficient, -0.99; slope, -3.571)

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานปริมาณเซลล์ของเชื้อโรคเรื้อน

ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ติดสีทึบกรดในตัวอย่างแขวนลอยเนื้อเยื่อผิวหนัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เจือจางเซลล์ นำไปสกัด DNA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Flexigene นำ DNA ที่ได้ไปใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ DNA ต้นแบบจาก 10^6 ถึง 1 เซลล์ในปฏิกิริยา และสร้างกราฟมาตรฐาน linear regression ระหว่าง จำนวนรอบของปฏิกิริยากับค่า log ของจำนวนเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 11

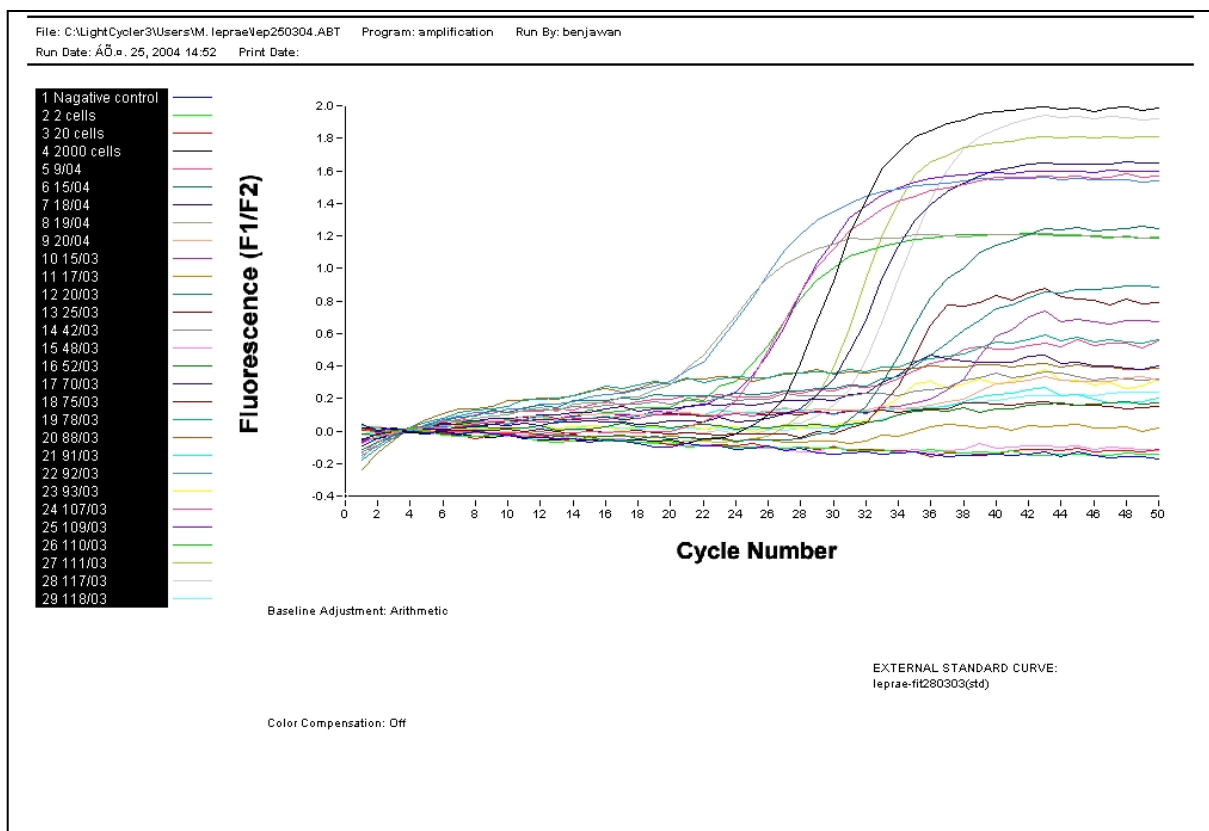


รูปที่ 11 กราฟมาตรฐาน linear regression ระหว่างจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน y) กับ log จำนวนเซลล์ของเชื้อโรคเริ่มต้นตั้งแต่ 1, 10, 100, 1000 และ 100,000 ในแต่ละปฏิกิริยา (แกน x) (error, 0.220; correlation coefficient, 1; slope, -3.487)

จากการศึกษาเปรียบเทียบปฏิกิริยา real-time PCR ที่เติม DNA ต้นแบบ 0.2 พิโคกรัม กับกราฟมาตรฐานจำนวนเซลล์พบว่ามาจากเชื้อ 1.819 เซลล์

4. ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณโดยเปรียบเทียบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับกราฟมาตรฐานแสดงจำนวนเซลล์ที่ในตัวอย่างดังรูปที่ 12 และสามารถคำนวณปริมาณเชื้อได้จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบในตัวอย่างมีค่าตั้งแต่ $1.07 \times 10^2 - 1.08 \times 10^8$ เมื่อทำการเปรียบเทียบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เริ่มขึ้นกับกราฟมาตรฐานที่สร้างไว้เรียบร้อยแล้ว และในผู้ป่วยประเภทเชื้อน้อยในตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนังตั้งแต่ระดับ $3.87 \times 10^2 - 3.9 \times 10^3$ เซลล์



รูปที่ 12 แสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของผลผลิต LightCycler real-time PCR ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของปฏิกิริยาการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างชิ้นเนื้อผิวหนัง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างผิวหนังที่วิเคราะห์ด้วย LightCycle real-time กับการวิเคราะห์จำนวนเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า มีความแตกต่างกันทั้งนี้การการตรวจนับเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทำได้เฉพาะตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังจากผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมากดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณด้วยกล้องจุลทรรศน์กับ Real-time PCR

No.	type	BI	กล้องจุลทรรศน์ (จำนวนเซลล์ / ชิ้น เนื้อ 6 ตาราง มิลลิเมตร)	Real-time (จำนวน เซลล์ / ชิ้นเนื้อ 6 ตารางมิลลิเมตร)
1	LL	6	$2 * 10^7$	$3 * 10^5$
2	LL	4	$3 * 10^5$	$1 * 10^6$
3	LL	4.5	$1 * 10^4$	$1 * 10^5$
4	LL	4	$2 * 10^4$	$3 * 10^5$
5	BL	2	$7 * 10^2$	$4 * 10^4$
6	BL	?	$2 * 10^4$	$8 * 10^3$
7	BL	?	$2 * 10^7$	$3 * 10^6$
8	BL	?	$2 * 10^4$	$1 * 10^2$
9	BL	5	$7 * 10^4$	$1 * 10^4$
10	BT	2.3	$3 * 10^4$	$3 * 10^3$

เมื่อพิจารณาผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วยโรคเรื้อนด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR ประสิทธิภาพพบว่า ตรวจพบเชื้อโรคเรื้อนได้ 38 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 95 ในผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อยตรวจพบเชื้อได้ 13 ราย จากตัวอย่างที่ทดสอบ 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 46 ดังที่แจกแจงจำนวนดังในตารางที่ 6

ตารางที่ 5 การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างผิวหนังของผู้ป่วยประเภทพบเชื้อมาก (MB) และประเภทเชื้อน้อย (PB) ด้วยเทคนิค LightCycler Real-time PCR

Type	No. of positive results (%)	Total
MB	38 (95)	40
subtype LL	14 (100)	14
subtype BL	20 (90)	22
subtype BT+	4 (100)	4
PB	13 (46)	28
subtype BT-	10 (47)	21
subtype TT	2 (33)	6
subtype I	1 (100)	1

บทวิจารณ์

การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หา 16S rRNA gene ของเชื้อโรคเรื้อน มีความจำเพาะสูง เนื่องจาก primer P2-P3 ที่นำมาใช้ในการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย ทั้งในปฏิกิริยา conventional PCR และ LightCycler real-time PCR นั้นสามารถนำมาใช้เพิ่มขยายชิ้น DNA เป้าหมายที่มีขนาด 171 คู่เบสเฉพาะในปฏิกิริยาของเชื้อโรคเรื้อนเท่านั้น ไม่สามารถนำมาใช้ในปฏิกิริยาของเชื้อ Mycobacterium ชนิดอื่น ๆ หรือเชื้อโรคผิวหนังอื่นได้จากรายงานเปรียบเทียบลำดับเบส (Alignment) บน 16S rRNA gene ของเชื้อโรคเรื้อนกับ 16S rRNA ของ Mycobacterium อื่น พบว่า บน 16S rRNA ยีนบริเวณที่ primer P2 เข้ากับ 16S rRNA หรือโครโมโซม DNA ของโรคเรื้อนมีลำดับแตกต่างจากเชื้อ mycobacterium อื่น (Cox, et al., 1991)

เนื่องจากเชื้อโรคเรื้อนเป็นที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้ แต่สามารถเพาะได้ในหนูทดลอง และตัวนี้เมื่อกำลาย ดังนั้นการทดสอบความไวในการตรวจวิเคราะห์โรคเรื้อนของเทคนิค LightCycler real-time PCR จำเป็นต้องเทียบกับการนับจำนวนเชื้อโรคเรื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งในการทดลองพบว่า สามารถตรวจวิเคราะห์โรคเรื้อนจากการตรวจเชื้อติดสีทนกรด (solid form) ได้ระดับต่ำสุด 1 เซลล์ หรือ มี DNA ระดับต่ำสุด 20 เฟมโตกรัม เปรียบเทียบกับรายงานตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อน โดยการเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย DNA ขนาด 531 คู่เบส บน proline-rich antigen gene ของเชื้อโรคเรื้อนด้วยเทคนิค conventional PCR และตรวจหาชิ้นส่วน DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Southern blot hybridization มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง โดยสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนได้เมื่อมีปริมาณ DNA 3.125 เฟมโตกรัม (Jesdawan *et al.*, 1995) แต่มีการใช้สารกัมมันตรังสีเกี่ยวข้อง และจากการทดลองครั้งนี้พบว่า การตรวจหาผลผลิต LightCycler real-time PCR ด้วยการตรวจวิเคราะห์สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ภายหลังเสร็จปฏิกิริยาไม่มีความแตกต่างกับการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต LightCycler real-time PCR แม้ว่าการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย

การตรวจหาสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์จะมีความไวน้อยกว่าการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization แต่ Light real-time PCR มีข้อดีตรงที่มีความรวดเร็ว ง่าย มีความปลอดภัยในการปฏิบัติ และลดการปนเปื้อนข้ามปฏิกิริยา ใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง สามารถทราบผลวิเคราะห์ได้

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณด้วย LightCycler real-time PCR จากสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ ประการสำคัญที่ควรระมัดระวังคือ จำเป็นต้องปรับสภาพของปฏิกิริยา เมื่อเริ่มศึกษามีเช่นนั้นจะทำให้ของ primerdimer ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำปฏิกิริยาซึ่งจะไปรบกวนผลการวิเคราะห์ และวิธีการสกัด DNA นอกจากมีปริมาณมากแล้วต้องมีความบริสุทธิ์ด้วย เนื่องจากการติดตามสาร SYBR green I ซึ่งเป็นสารที่ไม่จับจำเพาะกับผลผลิต PCR แต่จะกับสาร DNA เข้าคู่กัน หรือ เป็นสายคู่ อย่างไรก็ตามโปรแกรมของเครื่อง LightCycler real-time PCR ตรวจวิเคราะห์หรือยืนยันผลผลิตได้จาก melting temperature ซึ่งเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของผลผลิตชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย และเพื่อความแน่ใจควรทำการตรวจยืนยันผลผลิตอีกครั้งด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ในการทดลองนี้ได้ทำการปรับสภาพและองค์ประกอบของปฏิกิริยาก่อนนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ และได้ผลการทดลองเหมาะสมกับการวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณในตัวอย่างผิวหนังด้วย LightCycler real-time PCR ให้แตกต่างจากการทดลองของ kramme และคณะ 2003 ตรวจจำนวนเชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างผิวหนังขนาด 2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร อยู่ในช่วง 54-54,000, 000 เซลล์ และสามารถตรวจพบเชื้อโรคในผู้ป่วยประเภทเชื้อมีร้อยละ 88.9 และผู้ป่วยประเภทเชื่อน้อยร้อยละ 33.3 แต่ในการทดลองนี้สามารถตรวจพบเชื้อโรคเรื้อนในผู้ป่วยประเภทเชื้อมากและประเภทเชื่อน้อยได้สูงกว่าคือร้อยละ 95 และ 46 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) จำนวนเชื้อในตัวอย่าง $1.07 \times 10^2 - 1.08 \times 10^8$ แต่จากการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนเชื้อที่คำนวณด้วยเทคนิค LightCycler real-time PCR

เทคนิค Lightcycler real-time PCR ในการทดลองนี้มีความไว ความจำเพาะสูง สะดวกรวดเร็ว สามารถตรวจวิเคราะห์โรคเรื้อนในตัวอย่างได้ 32 ราย ทราบผลได้ภายในเวลา 3 ชั่วโมง (รวมขั้นตอนการเตรียม การสกัด DNA จากตัวอย่าง และปฏิกิริยาเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย) และยังสามารถนำไปใช้จำแนกผู้ป่วยประเภทเชื้อมาก และเชื่อน้อยได้ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้ conventional PCR ทั่วไป น่าจะมีประโยชน์ในการประเมินผลการรักษาโรคเรื้อน และงานควบคุมโรคต่อไป

สรุป

การวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อน (*Mycobacterium leprae*) เชิงปริมาณมีประโยชน์ในการประเมินผลการรักษาโรคเรื้อนด้วยยาเคมีบำบัดต่างๆ และมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยจำแนกผู้ป่วยโรคเรื้อนเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก และผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื่อน้อย ซึ่งใช้ยาและระยะเวลาในการรักษาแตกต่างกันตั้งแต่ 6 ถึง 24 เดือน แต่เนื่องจากเชื้อโรคเรื้อน ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เหมือนจุลินทรีย์ทั่วไป การตรวจนับโคโลนีของเชื้อจึงไม่สามารถกระทำได้ เทคนิค real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณจากตัวอย่างผิวหนังของผู้ป่วยโรคเรื้อนทุกประเภท โดยอาศัยเครื่อง real-time PCR LightCycler ติดตามวัดสัญญาณ ฟลูออเรสเซนซ์ของสาร

SYBR green I ที่ใช้ติดตามผลผลิตในปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ขนาด 171 เบส ของยีน 16S rRNA ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อโรคเริ้น สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้ทุกขณะที่ในปฏิกิริยา และวิเคราะห์ผลผลิตได้อย่างรวดเร็วจากค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) ของผลผลิตในปฏิกิริยา และใช้โปรแกรม Quantification ของเครื่องมือวัดปริมาณสารฟลูออเรสเซนต์ของผลผลิตในปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับปริมาณ DNA ของเชื้อโรคเริ้นที่สกัดได้จากเชื้อโรคเริ้นจำนวนต่างๆ ในตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลการตรวจนับจำนวนเชื้อโรคเริ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในขั้นต้นคัดเลือกวิธีการสกัด DNA ของเชื้อโรคเริ้นด้วยวิธีต่าง ๆ พบว่าวิธีสกัดด้วยน้ำยาพร้อมใช้สำเร็จรูป Flexigene เป็นวิธีที่ได้ DNA ปริมาณมาก และมีวิธีการง่ายและรวดเร็ว ทำการศึกษาความไวของเทคนิคโดยตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่เริ่มเกิดผลผลิตในปฏิกิริยาจากการใช้ DNA ต้นแบบจากเซลล์โรคเริ้นจำนวนต่าง ๆ ตั้งแต่ 1 เซลล์ขึ้นไป หรือปริมาณ DNA ของเชื้อโรคเริ้นตั้งแต่ 2 พิโคกรัม ขึ้นไป พบว่าสามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อโรคเริ้นปริมาณต่ำที่สุดเท่ากับ 2×10^{-15} เฟมโตกรัม หรือตรวจพบเชื้อระดับต่ำสุด 1 เซลล์ ขึ้นไป และอุณหภูมิหลอมตัวของผลผลิต LightCycler real-time PCR ประมาณ 86 องศาเซลเซียส สามารถตรวจหาจำนวนเชื้อโรคเริ้นในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังของผู้ป่วยตรวจพบได้ในช่วง $1.07 \times 10^2 - 1.08 \times 10^8$ เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเชื้อโรคเริ้นที่ตรวจนับด้วยวิธี LightCycler real-time PCR กับวิธีการตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีจำนวนที่แตกต่างกันทั้งนี้พบว่าการตรวจพบเชื้อโรคเริ้นในผู้ป่วยประเภทเชื้อมากร้อยละ 95 และผู้ป่วยประเภทเชื่อน้อยร้อยละ 46

หนังสือเอกสารอ้างอิง

กองโรคเริ้น, คู่มือการวินิจฉัยและรักษาโรคเริ้น. พ.ศ. 2543

กองโรคเริ้น, รายงานระบาดวิทยา. พ.ศ. 2543

Aldea, C., C.P. Alvarez, L. Folgueira, R. Delgado and J.R. Otero. 2002. Rapid Detection of *Herpes Simplex Virus* DNA in Genital Ulcers by Real- Time PCR Using SYBR Green I Dye as the Detection Signal. *J. Clin. Microbiol* **40**:1060-1062.

Arnoldi, J., C. Schuter, M.Duchrow, M. Hubner, M. Ernst, A. Teske, H.D. Plad, J. Grerdes, and E. C. Boddinhaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. and Bottger, E.C. 1990a. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1751-1759.

Brengel-Pesce, K., P. Morand, A. Schmuck, M.J. Bourgeat, M. Buisson, G. Barges, M.

Bouid and J.M. Seigneurin. 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J. Med. Virol.* **66**:360-369.

Bryceson, A., and R. E. Pfaltzgraff. 1990. Leprosy, p. 64. Churchill Livingstone, Inc., London, United Kingdom.

- Cox, R.A., K. Kempell, L. Fairclough and M.J. Colston.** 1991. The 16s ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains a unique sequence which can be used for identification by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* **35**: 284-290.
- de Wit, M.Y.L., Faber, W.R., Krieg, S.R., Douglas, J.T., Lucas, S.B., Montreewasuwat, N., Pattyn, S.R., Hussain, R., Ponnighaus, J. M., Hartskeerl, R.A., and Klaster, P.R.** 1991. Application of a polymerase chain reaction the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J. Clin. Microbiol.*
- Harder, T.C., M. Hufnagel, K. Zahn, K. Beutel, H.J. Schmitt, U. Ullmann and P. Rautenberg.** 2001. New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin. Microbiol.* **39**: 4413-4419.
- Jamil, S., Keer, J.T., Lucas, S.B., Dockrell, H.M., Chaing, T.J., Hussain, R. and Stocker, N.G.** Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet.* **342**: 264-268.
- Kamperapap, K., N. Singtham, P.R. Klaster, and S. Wiriyawipart.** 1998. Assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int. J. Lepro.* **66**: 16-21.
- Kramme, S., Bretzel, G., Panning, M., Kawuma, J., and Drosten, C.** 2003. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue sample by real-time PCR. *Med Microbiol Immunol.* **193**: 189-193.
- Kurabachew, M., Wondimu, A., and Ryon, J.J.,** 1998. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1352-1358.
- Marlowe, S.N., and D.N. Lockwood.** 2001. Update on Leprosy. *Hosp. Med.* **62** : 471-476.
- Noordeen, J.K.** 1992. Elimination of leprosy as a public health problem. *Lepr. Rev.* **63**: 1-4
- Patel, B.K.R., D.K. Bannerjee, and P.D. Butcher.** 1993. Determination of *Mycobacterium leprae* viability by polymerase chain reaction amplification of 71-kDa heat-shock protein mRNA. *J. Infect. Dis.* **168**: 799-800.
- Phetsuksiri B., J. Rudeeaneksin, P. Suparpkul, S. Wachapong, K. Mahptarn, and P.J. Brennan.** 2002. A simplified Reverse transcription polymerase chain reaction for rapid detection of *Mycobacterium leprae*. Manuscript for submitted to *Int. J. Lepr.*
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., and Bottger, E.C.** 1990a. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **40**: 323-330.
- Rogall, T., Flohr, T., and Bottger E.C.** 1990b. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1915-1920.

Ridley, D.S., and W.H. Jopling. 1962. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev.* **33**: 119-128.

Ridley, D.S., and W.H. Jopling. 1962. A classification of leprosy according to immunity-a five group system. *Int. J. Lepr.* **34**: 255-273.

Sloan, L.M., M.K. Hopkins, P.S. Mitchell, E.A. Vetter, J.E. Rosenblatt, W.S. Harmsen, F.R. Cockerill and R. Patel. 2002. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 96-100.

Stahl, D.A. and Urbance, J.A. 1990. The division between fast and slow- growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 116-124.

Teske, A., Wolters, J. and Bottger, E.C. 1991. The 16s rRNA nucleotide sequence of *Mycobacterium leprae*: phylogenic position and development of DNA probes. *FEMS Microbiology Letters.* **80**: 231-238.

Torres, M.J., A. Criado, J.C. Palomares, and J. Aznar. 2000. Use of real-time PCR and fluorometry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **38**: 3194-3199.

Wichitwechkarn, J., Karnjan, S., Shuntawuttisetee, S., Sornprasit, C., Kampirapap, K. and Watkins-Riedel, T., M. Woegerbauer, D. Hollemann and P. Hufnagl. 2002. Rapid diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* **42**: 99-105

Williams, D.L., T.P. Gillis, P. Fiallo, C.K. Job, R.H. Gelber, C. Hill, and S. Izumi, 1992. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring of antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. *Mol. Cell Probes.* **6**: 401-410.

Wittwer, C.T. ; K.M. Ririe.; R.V. Andrew; D.,A. David; R.A. Gundry, and C.J. Balis. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechnique.* **22**: 176-181.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ: ได้จัดทำ manuscript เพื่อส่งเผยแพร่ผลงานตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศแล้ว

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัย ทำให้สามารถนำเทคโนโลยีที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด แต่เดิมการตรวจวินิจฉัย โรคเรื้อนทางห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคย้อมเชื้อติดสีทนกรด (Acid Fast Staining) เป็นเทคนิคที่มีความไว และความจำเพาะต่ำ การเลี้ยงเชื้อโรคเรื้อนในสัตว์เป็นเทคนิคต้องใช้เวลานานจึงจะทราบผล และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย การตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนด้วย conventional PCR แม้จะให้ผลรวดเร็ว มีความจำเพาะ และความไวสูง แต่ผลได้รับทราบเพียงแค่ว่าอย่างส่งตรวจนั้นมีหรือไม่มีเชื้อโรคเรื้อนเท่านั้นไม่สามารถประมาณจำนวนเชื้อ ณ จุดที่ส่งตรวจได้ การประมาณจำนวนเชื้อโรคเรื้อนได้นั้นจะช่วยจำแนกประเภทของผู้ป่วย โดยแบ่งได้เป็นผู้ป่วยเชื้อมาก และเชื่อน้อย ซึ่งให้การรักษาที่แตกต่างกัน และยังสามารถติดตามผลการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทคโนโลยี Real-time PCR เป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างทั้งในเชิงปริมาณ และคุณภาพ ได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ การตรวจวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพให้เหมือนกับการตรวจวินิจฉัยโรคด้วย conventional PCR การตรวจวิเคราะห์ในเชิงปริมาณทราบผลเป็นจำนวนเซลล์ หรือจำนวน DNA ของเชื้อโรคเรื้อนในตัวอย่างส่งตรวจ จากการวัดปริมาณฟลูออเรสเซนซ์ของผลิตภัณฑ์ PCR และวิเคราะห์ปริมาณด้วยโปรแกรมของเครื่องมือ เทคนิคนี้สามารถตรวจนับปริมาณเชื้อโรคเรื้อนในเวลาที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

การศึกษานี้มีประโยชน์ในเชิงสาธารณะ เป็นวิธีการที่สามารถนำไปวินิจฉัยโรค หรือวิจัยในเรื่องต่าง ๆ ได้ และมีเครือข่ายความร่วมมือในปฏิบัติงานวิจัยโดยติดต่อแลกเปลี่ยนข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และวิเคราะห์ผลโดยมีเครือข่ายความร่วมมือปฏิบัติงานวิจัยดังนี้

1. รศ. นพ. ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. ดร. เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ
ฝ่ายโรคเรื้อนและมัยโคแบคทีเรียอื่น สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
3. คุณศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล
กลุ่มงานอิมมูโนวิทยา สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค
4. คุณสุพรรณิ พัสตร
โรงพยาบาลสิรินธร (โนนสมบูรณ์) จังหวัดขอนแก่น
5. นพ. กฤษฎา มโหทาน
สถาบันราชประชาสมาสัย กรมควบคุมโรค
6. นพ. ทวีฤทธิ์ สิทธิเวคิน
สถาบันราชประชาสมาสัย กรมควบคุมโรค

7. ศาสตราจารย์นายแพทย์ธีระ รามสูต ที่ปรึกษาสถาบันราชประชาสมาสัย และที่ปรึกษากรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
8. นายแพทย์จรัญ ปิยะวารากรณ์
กรมควบคุมโรค กรุณาให้การสนับสนุน และแนะนำการทำงานวิจัย
9. นายแพทย์เรืองศิลป์ เกื่อนนาดี
โรงพยาบาลสิรินธร (โนนสมบูรณ์) จ. ขอนแก่น
10. นายแพทย์สมศักดิ์ ไชยวัฒน์
ผู้อำนวยการสำนักป้องกันควบคุมโรค 1 กรุงเทพมหานคร กรมควบคุมโรค
11. นายแพทย์สมชาย ตั้งสุภาชัย
ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 นครราชสีมา
12. นายแพทย์เกรียงศักดิ์ เวทีวุฒาจารย์
ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ขอนแก่น
13. แพทย์หญิงมยุรา กุสุมภ์
คณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กระทรวงสาธารณสุข
14. Professor Dr. Patrick J. Brennan
Colorado State University, USA
15. Professor Dr. Sang-Nae Cho
Yonsei University, South Korea

ผลงานเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์

เรื่อง การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณด้วย real-time PCR

ที่ การประชุมวิชาการครั้งที่ 1 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร

วันที่ 1-2 พฤษภาคม 2546

เรื่อง การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR สำหรับวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ

ที่ การสัมมนาวิชาการกรมควบคุมโรค ประจำปี 2546

ณ โรงแรมเจริญศรี แกรนด์ รอยัล จังหวัดอุดรธานี

วันที่ 28-30 กรกฎาคม 2546

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

ที่ การประชุมเพื่อเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่กับเมธีวิจัยอาวุโส สกว.

ณ โรงแรม

เรื่อง QUANTITATIVE DETECTION OF *Mycobacterium leprae* IN SKIN

SPECIMENS BY LIGHTCYCLER REAL-TIME PCR

ที่ งานประชุม 10 th ASEAN CONFERENCE IN MEDICAL LABORATORY
TECHNOLOGY April 26-30, 2004 Lotus Hotel Pang Suan Kaew Chang Mai

เรื่อง การศึกษาการใช้เทคนิค Real time PCR วิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ

ที่ การประชุมวิชาการร่วมระหว่างหน่วยงานภายใต้กลุ่มภารกิจด้านสนับสนุนงานบริการ

สุขภาพ ครั้งที่ 2

วันที่ 3-4 พฤษภาคม 2547

ณ โรงแรมเดอะแอมบาสเดอร์ กรุงเทพฯ

Project Code: TRG4680028

Project Title: LightCycler real-time PCR for quantitative detection of *Mycobacterium leprae*
(ชื่อโครงการ) LightCycler real-time PCR สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคเรื้อนเชิงปริมาณ

Investigator: Ms. Janisara Rudeeaneksin, Leprosy and other Mycobacteria group,
National Institute of Health, Department of Medical science, Ministry of Public Health

E-mail Address: janisarar@gmail.com

Project Period: 1 July, 2546 – 30 June, 2548

MANUSCRIPT

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 1.07×10^2 – 1.08×10^8 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 3.87×10^2 – 3.9×10^3 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.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an acid-fast, rod-shaped bacillus, and is still a major problem in several countries (1). Even after the World Health Organization's (WHO's) efforts to eliminate leprosy as a public health problem by the year 2000, there remain hyperendemic areas in many countries which have shown no substantial decrease in the new case detection rate (1). At the beginning of 2003, the number of leprosy patients in the world was around 534,000 as reported by 110 countries. About 620,000 new cases were detected during 2002 (WHO 2003). The diagnosis of leprosy is mostly dependent on the presence of acid fast bacilli in skin smear. The conventional staining of acid fast bacilli (AFB) in clinical specimens proves insensitive, and hence samples must contain a large number of mycobacteria for positive finding (2). A rapid method based PCR for detection and quantification of *M. leprae*, an organism which still uncultivated in vitro, is useful in leprosy diagnosis and in assessment of the efficacy of chemotherapeutic regimens (3,4,5,6). In addition, such a method would have the potential of detecting relapse and differentiating it from reversal reactions, and is likely to function in classifying of leprosy patients (7). Very recently, real-time PCR has started to demonstrate its potential utility in field of rapid detection and quantification of several organisms (8,9,10,11). The main features making this new technology very attractive and would be practical for detection and identification of organisms, in comparison with conventional PCR, are rapidness and reduction of likelihood of contamination, since no post-amplification analysis of PCR products is required. Moreover, it was noted that a real-time PCR has advantages over conventional PCR in that the PCR products can be monitored in each round of amplification and hence accurate quantification can be performed (8,12). With the advent of LightCycler-PCR (LC-PCR) that incorporates software-driven fluorescence analysis systems, the real-time PCR is rapidly becoming a more common method for analysis and quantification of PCR products (13). In addition to real-time quantification, the LC-PCR for detection of leprosy has not been thoroughly evaluated in laboratories of developing countries where diseases are problems and where their application is suitable. This study aims to developing, and validating a new method in molecular biology: the LightCycler real-time PCR based amplification in rapid detection as well as simultaneous quantification of *M. leprae* in skin specimens.

Materials and Methods

Subjects and specimen collection. Skin punch biopsies from leprosy patients obtained from leprosy patients who visit the leprosy clinic or hospital. The collection of specimens was performed at the time before treatment or at the beginning of starting of WHO multi-drug therapy. The total number of patients recruited to this study was 68 subjects. These patients were of both the paucibacillary (PB; having a negative bacterial index (BI) but distinctive histopathological lesions diagnostic for leprosy) and the multibacillary (MB; having a positive BI types or histopathological lesions). The classification of patients was done clinically and histopathologically according to the Ridley-jopling scale (14). Disease types included indeterminate (I), tuberculoid (TT), borderline tuberculoid (BT), borderline (BB) borderline lepromatous (BL), and lepromatous (LL) leprosy. Additionally, the BT leprosy type was subdivided into BT (-) for negative bacterial index and BT (+) for positive bacterial index. The bacterial index (BI), which represents a quantitative estimation of the bacteria on the basis of counting acid-fast bacilli, was obtained by employ Ridley' s logarithmic scale (15). The BI from each patient was reported as an average BI value determined from slit skin smears performed on six sites for MB patients and on three sites for PB patients.

Preparation of *M. leprae* DNA from specimen. Four strategies were evaluated to isolate DNA from skin biopsy of leprosy patients prior to manipulation of numbers of clinical specimens. Punch skin biopsy were cut into small piece with sterile scissors and manually grounded in glass tissue homogenizers. Genomic DNA of *M. leprae* was then prepared and a real-time PCR was performed with DNA prepared by each method as described below. The performance of each method was evaluated by monitoring the strength of the individual fluorescent signals.

Method I was the extraction of DNA by using proteinase K and lysis buffer. Briefly, 70 μ l of tissue homogenate containing *M. leprae* was sonicated at 4 °C for 10 min and treated with 1 mg/ml of proteinase in lysis buffer (0.05% Tween 20 and 100 mM Tris-HCl (pH8.5)) The mixture was incubated at 56°C for 18 h. The homogenate was then heated at 80°C for 10 min and 10 μ l of aliquot was subjected to real-time PCR amplification. Method II was boiling in which 70 μ l of tissue homogenate was added in 30 μ l sterile water and incubated at 100° C for 10 min. The 10 μ l of aliquot was subjected to real-time PCR amplification. In Method III, DNA was extracted by FlexiGene DNA kit (Qiagen; Valencia, USA). In brief, lysis buffer was added to the 70 μ l of homogenate tissue in 30 μ l of sterile water. After centrifugation, the DNA pellet was recovered, resuspended and incubated in denaturation buffer, which contained a chaotropic salt and protease. DNA was then

precipitated by addition of isopropanol. After centrifugation, the recovered DNA was washed in 70% ethanol, dried and resuspended in hydration buffer. The 5 µl of aliquot was used subsequently as a DNA template. Method IV was DNA extraction by using DNAzol (InvitrogenTM, USA). Briefly, genomic DNA was isolated from 70 µl of the homogenate tissue with 1 ml of a guanidine-detergent lysis solution (DNAzol) that hydrolyzed and allowed selective precipitation of DNA. The solution was then mixed and centrifuged at 10,000 x g for 10 min. DNA pellet was then precipitated from the lysate with 500 µl of ethanol and centrifugation as described by manufacturer. The recovered DNA was washed twice with 1 ml of 75% ethanol and prior to adding 50 µl of water. The 5 µl of aliquot was used subsequently in real-time PCR amplification

Oligonucleotides: A set of primers, P2 and P3, specifically amplifies 171-bp fragment of *M. leprae* 16s rRNA gene were applied (16). The sequences of primers were as follows: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG, *M. leprae* 16s rRNA P2 primer (position 69 to 91 of DNA sequence); CAT CCT GCA CCG CAA AAA GCT T, *M. leprae* P3 primer (position 218 to 239 of DNA sequence). All oligonucleotides used as primers were synthesized in the BioService Unit, BIOTEC Center, National Service and Technology Development Agency, Thailand.

The conventional PCR: The standard PCR were performed in conjunction with fluorogenic real-time PCR in which the intensity of fluorescence is proportional to the amount of amplified target DNA present. Conventional PCR for amplification of 16s rRNA gene of *M. leprae* contained reaction buffer, dNTPs, *Taq* DNA polymerase and specific primers for 171 bp of *M. leprae* 16s rRNA gene. Conditions for cycling were denatured by heating at 94°C for 1 min then annealed at 55°C for 30 sec. Primers extension were carried at 72°C for 30 sec. The amplification cycle were repeated up to 35 times. The amplified DNA were separated by agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide.

LightCycler real-time PCR. The developed LightCycler PCR (LC-PCR) DNA amplification technology (Roche Diagnostics, Germany) combined rapid glass capillary thermal cycling with real-time microfluorescence monitoring detection of amplicons. SYBR Green is fluorochrome used to detect PCR product. The fluorescence detection was achieved during the PCR cycle running in real-time. The components for PCR in a final volume of 20 µl included a commercial ready-to-use reaction mixture for PCR (LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche Diagnostics) that contains FastStart *Taq* DNA polymerase, SYBR Green I dye, deoxynucleoside triphosphate mixture, reaction buffer and 25 mM MgCl₂ at a final concentration of 4 mM. The primers were added to final concentrations of

10 pmol/ μ l and template DNA was used. The 20 μ l of the final volume of real-time PCR reaction was placed in glass capillary tubes. Conditions for real-time PCR cycling were 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 5 s, 60°C for 5 s and 72°C for 8 s, with monitoring of fluorescence during the annealing phase; this was followed by a melting program of 75°C to 95°C.

The specificity of PCR. Specificity of the PCR was determined extensively as described previously (16). In this study, specificity was re-examined using DNA isolated from 20 different bacterial species, including closely related mycobacteria (Table 1). The mycobacteria cells were given as a gift from Dr. Angkana Chaiprasert (Siriraj hospital, Thailand) and from bacteria collection bank, (Thai National Institute of Health). Standard *M. leprae* chromosomal DNA was kindly provided by Dr. Practick J Brennan (Colorado state, University). Each DNA of different species was then added to the PCR mixture. The condition for DNA amplification was the same as described previously.

The sensitivity of PCR. Sensitivity of detection was analyzed with the purified *M. leprae* standard DNA. Briefly, DNA was diluted with sterile distilled water to the required concentration and 2 μ l of each solution was then added to the PCR mixture. PCR amplification was performed as described. The correlation between the amount of DNA and the number of bacilli was based on the fact that approximately 5 fg of DNA is equivalent to one bacterium, given the size of the *M. leprae* genome of 2.2×10^9 Da (17)

Quantification of *M. leprae* cell numbers by LC-PCR. The amount of *M. leprae* DNA were compared to the number of acid-fast bacilli (AFB) counted by microscope. Briefly, homogenized cell suspension was subjected to Zeihl-Neelson staining, and the number of AFB per field was counted microscopically for an average of 64 fields per sample. For quantification by LC-PCR, each run was performed with standard DNA prepared from 10-fold dilution of different cell numbers of *M. leprae*. The negative control containing water was also included. The fluorescent signal was recorded and used to set up standard curve.

Calculation of amplification efficiency: In real-time PCR reaction containing different amounts of photometrically quantified target DNA (dilution series), the number of amplification cycles need to obtain a detectable fluorescence signal was plotted against the log₁₀ of the input DNA copy number. The slope of the resulting linear relation as calculated by LightCycler operation software was then converted into the amplification efficiency using the formula: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ (18).

Results

Conventional PCR. A set of primers was selected on the basis of the nucleotide sequence of a gene encoding the 16S rRNA gene specific to *M. leprae*. The specificity of the PCR was evaluated with DNA isolated from 20 different bacterial species. The 171 bp fragment was amplified only when *M. leprae* DNA was present (Table 1). The PCR protocol employed was tested for sensitivity using known amounts of *M. leprae* DNA from known number of acid fast bacilli as templates. Quantities of DNA content of 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 1 bacilli, were used in PCR reaction respectively. The PCR results were determined by the presence or absence of the amplified 171 bp DNA band in an agarose gel. The amplified band corresponding to a 171 bp DNA fragment was detected when DNA extracted from the sample containing 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 leprosy bacilli (data not show).

DNA extraction. A simple procedure of DNA extraction from *M. leprae* -infected skin tissue capable of providing high yields of DNA for subsequent real-time PCR was desired. Four different methods of DNA extraction were conducted using skin tissue homogenate, and all allowed successful amplification (Figure 1). The use of Flexigene to isolate DNA involved minimum sample manipulation and yields was high comparable to that of others.

Rapid PCR and continuous monitoring of product. The data output from LC-PCR machines gave immediate signals of kinetics of the PCR occurring within the tube and gives an instantaneous visual representation of the amount of PCR product present follow each PCR cycle. The accumulation of PCR product was monitored by measuring the level of fluorescence. The PCR product was observed to accumulate in an exponential manner, indicating an optimal PCR (Figure 1). It can be seen that the signals started to rise at different times depending on the concentration of DNA templates (Figure 1).

The sensitivity and specificity of LC-PCR on detection of *M. leprae*. The sensitivity of LC-PCR in detection of *M. leprae* was defined as the lowest number of mycobacteria cells and the amount of *M. leprae* DNA that LC-PCR could detect. It was found that the LC-PCR was able to detect 20 fg of purified *M. leprae* DNA (Figure 2A) or one cell of bacteria in infected tissue (data not show). The specificity was determined by testing DNA extracted from several bacteria (Table 1). Melting point analysis of the amplicons at the end of the run was used as a specificity control when the fluorochrome SYBR Green was used for detection of double stranded DNA. The melting temperature of PCR products derived by melting program analysis using the LightCycler software was 86°C (Figure 2B) and

confirmed LC-PCR product by agarose gel electrophoresis. Specificity of the LC-PCR was summarized in Table 1.

Assessment the clinical sensitivity of real-time PCR. Sensitivity of real-time PCR for detection of leprosy was determined with punch skin biopsy specimens collected from leprosy patients before therapy. In MB case, 38 of 40 biopsy samples and, 13 of 28 of PB skin biopsies were positive by real-time PCR. Therefore, PCR sensitivity was 95 % in patients with positive BI and 46 % in patients with negative BI (Table 2). The summary of PCR for detection of various types of new leprosy patients is present in Table 2.

General optimization of real-time PCR. After optimization of real-time PCR condition, the efficiency of real-time PCR was analyzed by amplifying a serial dilution of purified *M. leprae* DNA. Based on slop of regression curve, the efficiency of real-time PCR was 92 % (Figure 3a, 3b).

Quantitative PCR. A real-time PCR was applied to estimate the number of *M. leprae* in skin biopsy. Quantification of *M. leprae* DNA template were obtained by quantification program in the LC-PCR and using SYBR Green I dye as detection marker. Estimation of the number of *M. leprae* was obtained by comparing with standard curves of serial dilution containing 0.02, 0.20, 2, 20 and 200 ng of *M. leprae* DNA. The number of *M. leprae* in skin specimens were estimated by comparing with DNA standard curve. The PCR product in real-time condition was confirmed by melting curve analysis program and agarose gel electrophoresis (Figure 4). This approach was applied to assess leprosy bacilli in skin specimens and compared with bacteriological finding (Table 4).

Discussion and conclusion

Rapid identification method using molecular techniques have been developed and utilized in the clinical laboratory. The LC-PCR instrument is a commercially available system designed to decrease the time of the PCR by monitoring the amplification of the target sequences in real-time by fluorescence signal. This technology is a significant breakthrough conventional detection methods, and the benefits for clinical assays have been reported. (19,20,21,22,23,24,25).

Real-time PCR technology has improved molecular diagnosis of many pathogens, but few such tests are available for *M. leprae*. Kramme et al reported that the real-time PCR achieved a theoretical analytical sensitivity limited of 194 *M. leprae* cell per skin specimen and facilitated quantification of mycobacteria in tissue over arrange of 54-54,000,000 cells per sample (26). In punch biopsies, the clinical diagnosis could be confirmed in 88.9% of multibacillary and 33% of paucibacillary (microscopically negative) patients (26). In addition

to the fact that no culture system exists for *M. leprae*, the real-time PCR analysis appears to be a robust tool for detection of the bacterium in selected clinical situations as well as for quantification of leprosy bacilli in any experimental setting.

We utilized the LC-PCR and P2 and P3 primers and DNA of 16 different bacteria strains to determine the specificity of the assay. These strains represented the most commonly isolated species that are recovered in the clinical microbiology laboratory. When the SYBR Green I dye was used as the fluorochrome, we were able to specifically identify *M. leprae* from among other bacteria species. The specific fluorescence resonance energy was shown to detect the *M. leprae*, while all other bacteria species tested negative. We developed and tested a real-time PCR assay for quantifying *M. leprae* DNA. The assay was sensitivity for *M. leprae* and was able to detect as low as 20 fg of purified *M. leprae* DNA or one cell bacteria in infected tissues. The method described here provides a rapid and inexpensive way to detect *M. leprae* in skin specimen. Amplification and analysis are all performed simultaneously in sealed capillary tubes. The entire assay, including analysis, can be completed in 30 min. This new method presents several advantages. First, rapid amplification and analysis allow the test to be completed within 30 min. Because the DNA extraction procedure requires 1 h approximately, the whole detection can be completed in less than 2 h. Second, the LightCycler optical device is capable of measuring fluorescence in F1 channels which allow accurate quantification, and it is easy to use SYBR Green I as a generic donor of fluorescence resonance energy transfer. Third, the assay is run in closed glass capillaries and post-amplification analysis can be performed without opening the capillaries, minimizing the risk of carryover contamination.

In the conclusion, this LC-PCR is a sensitive and specific method which proved useful for rapid detection of *M. leprae* in skin specimens. The LC-PCR may be useful for the detection of quantification of *M. leprae* DNA in tissue sample especially when acid-fast bacilli are not discernable. It was demonstrated that the test facilitated quantification of *M. leprae* in skin biopsy specimens over a range of 2.9×10^2 - 3.6×10^7 cells per milliliter of skin tissue samples. The method of LightCycler real-time PCR developed in this study appeared to be an alternative tool for quantitative detection of leprosy bacilli in clinical specimens and could be adaptable as a molecular tool for quantification of *M. leprae* DNA in other setting experiments

References

- [1] World Health Organization. (1998) Action programme for the elimination of leprosy. Status report. WHO/LEP/98.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- [2] Bates, J.H.(1979) Diagnosis of tuberculosis. Chest. 76, 757-763.
- [3] de Wit, M.Y.L., Faber, W.R., Krieg, S.R., Douglas, J.T., Lucas, S.B., Montreewasuwat N., Pattyn, S.R., Hussain, R., Ponnighaus, J.M., Hartskeerl, R.A. and Klaster, P.R. (1991) Application of a polymerase chain reaction the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissue. J. Clin. Microbiol. 29, 906-910.
- [4] Jamil, S., Keer, J.T., Lucas, S.B., Dockrell, H.M., Chaing, T.J., Hussain, R. and Stocker, N.G. (1993) Use of polymerase chain reaction to access efficacy of leprosy chemotherapy. Lancet. 342, 264-268.
- [5] Wichitwechkarn J., Karnjan, S., Shuntawuttisetee, S., Sornprasit, C., Kampirapap, K., and Peerapakorn, S. (1995) Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. J.Clin.Microbiol. 33, 45-49.
- [6] Williams, D.L., Gillis, T.P., Fiallo, P., Job, C.K., Gelber, R.H., Hill, C. and Izumi, S. (1992) Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring of antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. Mol Cell Probes. 6, 401-410.
- [7] Van der Vliet G.M., Cho S.N., Kampirapap K., van Leeuwen J., Schukkink R.A., van Gemen B., Das P.K., Faber W.R., Walsh G.P., Klaster P.R.(1996) Use of NASBA RNA amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients. Int. J. Lepr Other Mycobact Dis. 64, 396-403.
- [8] Aldea, C., Alvarez, C.P., Folgueira, L., Delgado, R. and Otero J.R. (2002) Rapid detection of Herpes simplex virus DNA in Genital Ulcer by Real-time PCR using SYBR Green I Dye as the Detection Signal. J. Clin. Microbiol. 40, 1060-1062.
- [9] Brengel-Pesce, K., Morand, P., Schmuck, A., Bourgeat, M.J., Buisson, M., Bargues, G., Bouzid, M. and Scigneurin, J.M. (2002) Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. J. Med. Virol. 66, 360-369.
- [10] Harder, T.C., Hufnagel, M., Zahn, K., Beutel, K., Schmitt, H.J., Ullmann, U. and Rautenberg, P. (2001) New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. J. Clin. Microbiol. 39, 4413-4419.
- [11] Sloan, L.M., Hopkins, M.K., Mitchell, P.S., Vetter, E.A., Rosenblatt, J.E., Harmsen, W.S., Cockerill, F.R. and Patel, R.. (2002) Multiplex LightCycler PCR assay for

detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. J. Clin. Microbiol. 40, 96-100.

- [12] Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A. and Balis, C.J. (1997) The LightCycler : a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechnology. 22, 176-181.
- [13] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Wastson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY). 11, 1026-1030.
- [14] Ridley, D.S., and Jopling, W.H. 1966. Classification of leprosy according to immunity-a five group system. Int. J. Lepr. 34, 255-273.
- [15] Ridley, D.S. 1964. Therapeutic trials in leprosy using serial biopsies. Lepr. Rev. 29, 45-52.
- [16] Cox, R.A., Kempell, K., Fairclough, L., and Colston, M. J.. (1991) The 16s ribosomal RNA of *Mycobacterium leprae* contains a unique sequence which can be used for identification by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol. 35, 284-290.
- [17] Clark-Curtiss, J. E., Jacobs, W. R., Docherty, M. A., Rithcie, L. R., and Curtiss III, R. (1985) Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. J. Bacteriol. 161, 1093-1102.
- [18] Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds) Rapid cyclers real-time PCR, methods and application. Springer Heidelberg, pp 21-34.
- [19] Miller, N., Cleary, T., Kraus, G., Young, A.K., Spruill, G., and Hnatyszyn, H.J. 2002. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid fast bacillus smear- positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. J Clin Microbiol. 40, 4143-4147.
- [20] Espy, M.J., Ross, T.K., Teo, R., Svien, K.A., Wold, A.D., Uhl, J.R. and Smith, T.F. (2000) Evaluation of LightCycler PCR for implementation of laboratory diagnosis of herpes simplex virus infection. J.Clin.Microbiol. 38, 3116-3118.
- [21] Espy, M.J., Ross, T.K., Teo, R., Svien, K.A., Wold, A.D., Uhl, J.R., and Smith, T.F. (2000) Diagnosis of varicella-zoster virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. J. Clin. Microbiol. 38, 3187-3189.
- [22] Espy, M.J., Uhl, J.R., Mitchell, P.S., Thorvilson, J.N., Svien, K.A., Wold, A.D., and Smith, T.F. (2000) Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. J. Clin. Microbiol. 38, 795-799.
- [23] Schaade, L., Koekelkson, P., Ritter, K. and Klemes, M. (2000) Detection of

cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR. J. Clin. Microbiol. 38, 4006-4009.

- [24] Wittener, C.T, Herrmann, M.G., Moss, A.A., and Rasmussen, R.P.(1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Bio Techniques 22, 130-138.
- [25] Torres, M.J., Criado, A., Palomare, J.C. and Aznar, J. (2000) Use of real-time PCR and fluorometry for rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance- associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 38, 3194-3199.
- [26] Kramme, S., Bretzel, G., Panning, M., Kawuna, J., and Drosten, C. (2004) Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. Med. Microbiol. Immunol (Berl). 193,189-193.

Table 1 The specificity of PCR for detection of *M. leprae*

No.	Bacterial species and strain	provider	Detection by conventional PCR/ real-time PCR
1	<i>Mycobacterium leprae</i>	Clinical isolate	Positive
2	<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291	Negative
3	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ra	Negative
4	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 14470	negative
5	<i>Mycobacterium marinum</i>	Siriraj hospital	negative
6	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC18950	negative
7	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Siriraj hospital	Negative
8	<i>Mycobacterium bovis</i>	Siriraj hospital	negative
9	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Siriraj hospital	negative
10	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Siriraj hospital	negative
11	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	Siriraj hospital	negative
12	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14470	negative
13	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13311	negative
14	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	negative
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	negative
16	<i>Listeria monocytogenes</i>	Collection Bank NIH, Thailand	negative
18	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	negative
19	<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Collection Bank NIH, Thailand	negative
20	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	negative

Table 2 Validation method of real-time PCR for detection of *M. leprae*

Type	No. of positive results (%)	Total
MB	38 (95)	40
subtype LL	14 (100)	14
subtype BL	20 (90)	22
subtype BT+	4 (100)	4
PB	13 (46)	28
subtype BT-	10 (47)	21
subtype TT	2 (33)	6
subtype I	1 (100)	1

Table 3 Comparison of enumeration of leprosy bacilli

No.	type	BI	Microscope (cells / skin tissue 6 mm)	Real-time (cell / skin tissue 6 mm)
1	LL	6	2×10^7	3×10^5
2	LL	4	3×10^5	1×10^6
3	LL	4.5	1×10^4	1×10^5
4	LL	4	2×10^4	3×10^5
5	BL	2	7×10^2	4×10^4
6	BL	?	2×10^4	8×10^3
7	BL	?	2×10^7	3×10^6
8	BL	?	2×10^4	1×10^2
9	BL	5	7×10^4	1×10^4
10	BT	2.3	3×10^4	3×10^3

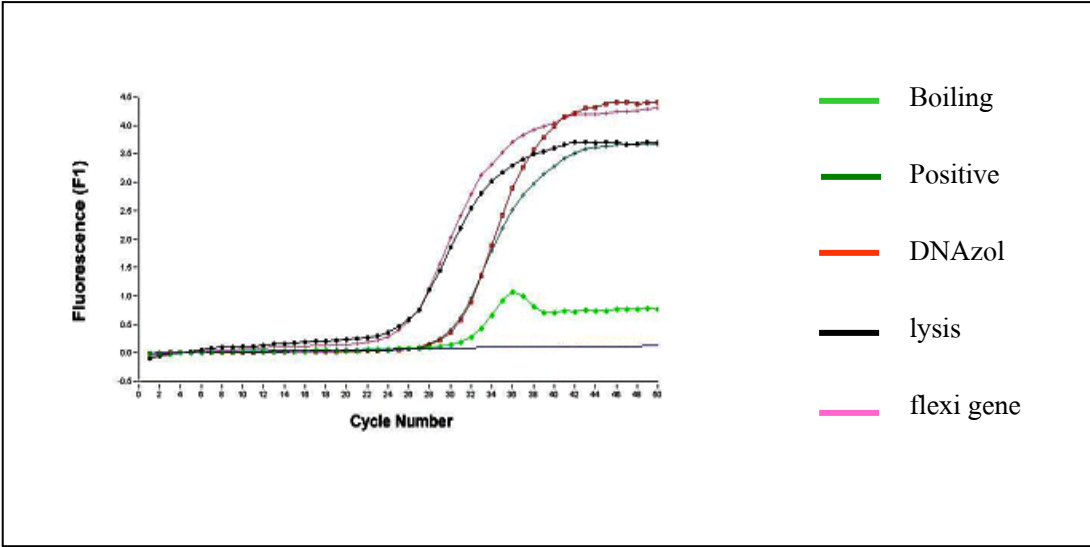
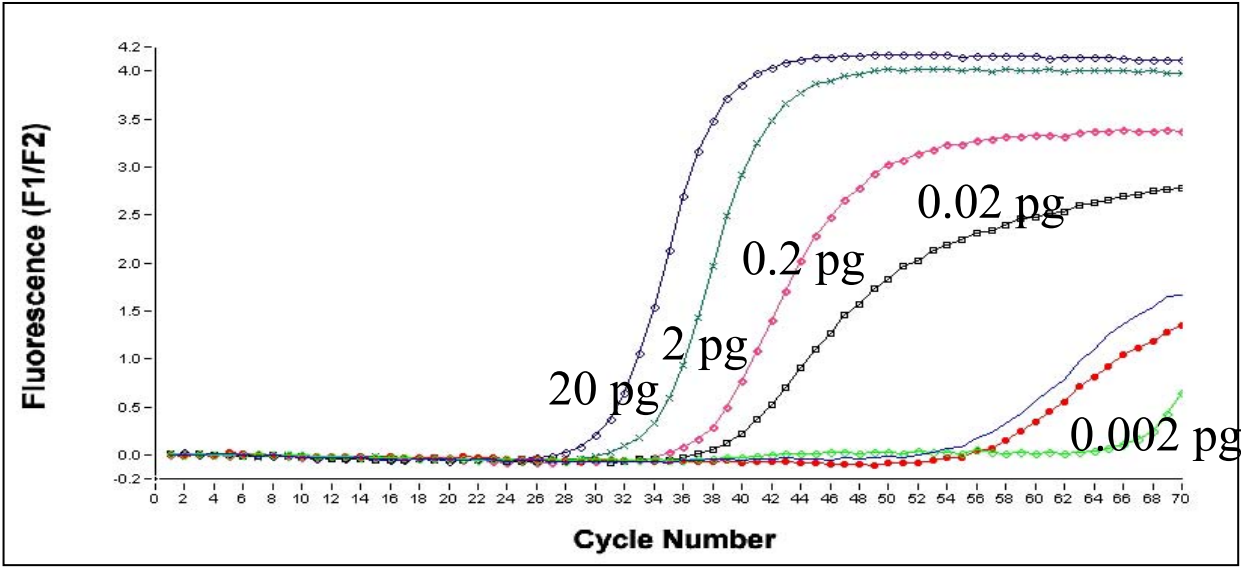


Figure 1

A



B

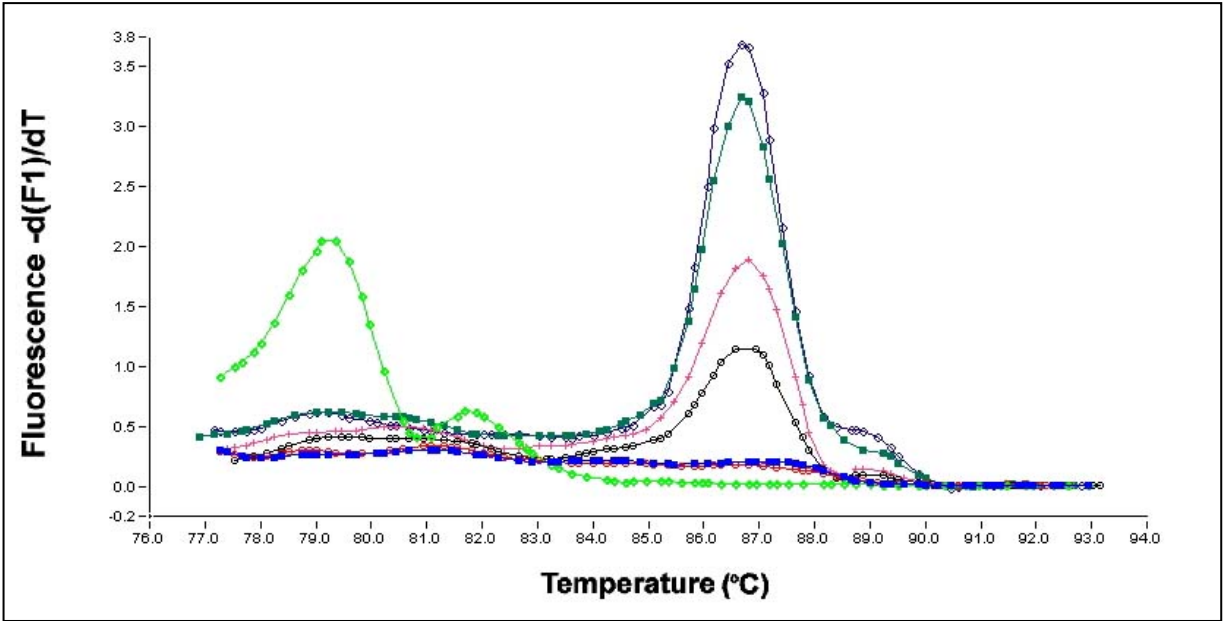
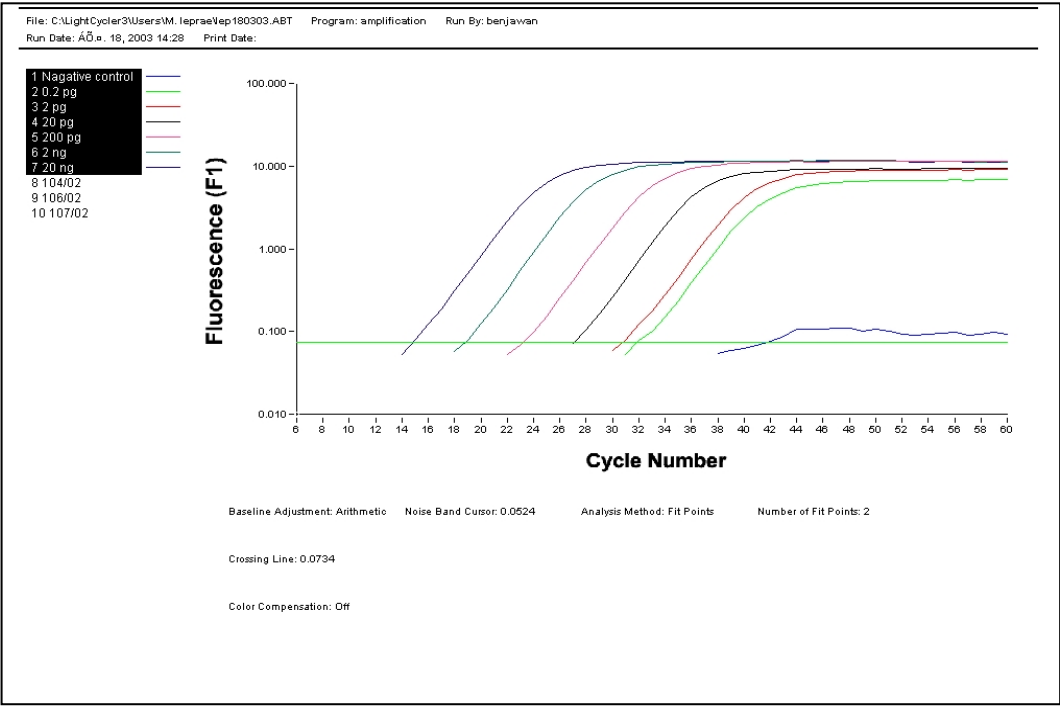


Figure 2

A



B

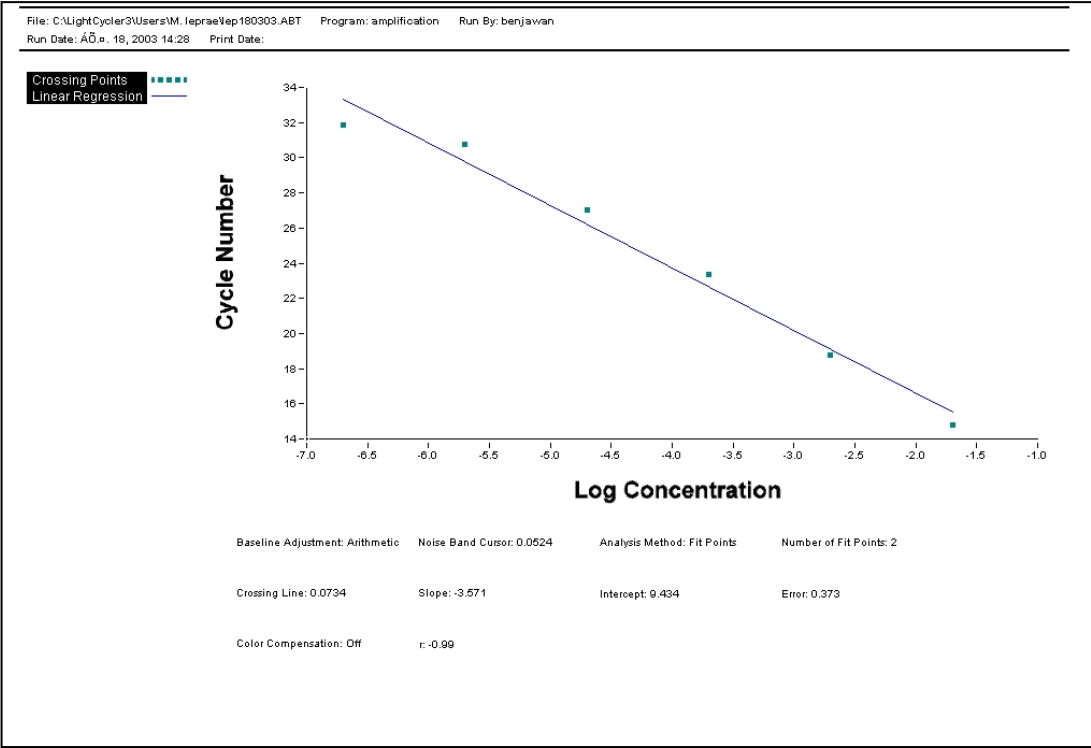
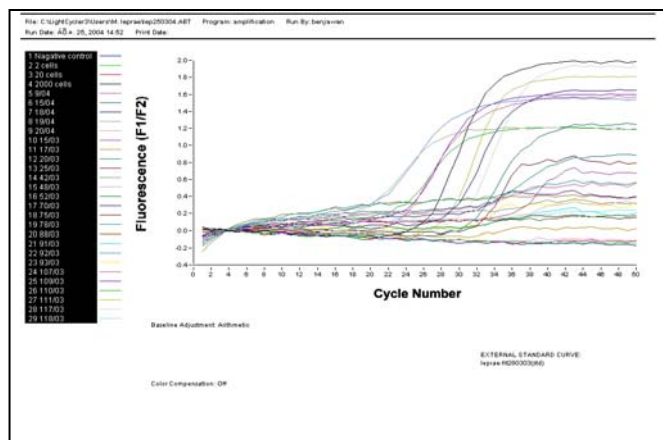
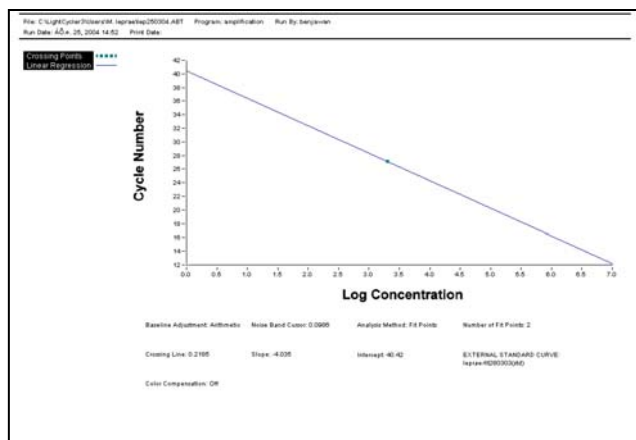


Figure 3

A



B



C

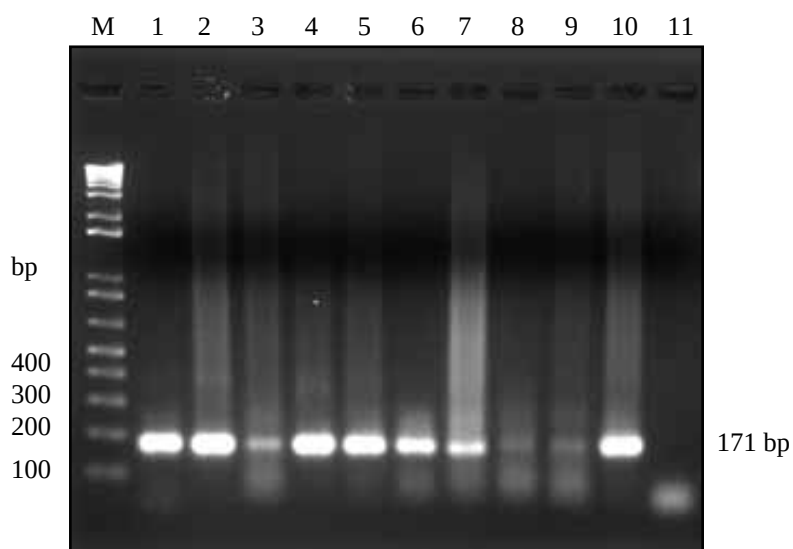


Figure 4

Legend

Figure 1 Real-time PCR resulting from different DNA extraction procedures. DNA was extracted from skin tissue homogenate containing *M. leprae* and subjected to amplification by real-time PCR

Figure 2 Sensitivity and specificity of real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA
Sensitivity of real-time PCR for detection of *M. leprae* DNA was evaluated (2A). Ten fold dilution of DNA in order of 20 ng- 200 fg was prepared and subjected for real-time amplification; Specificity of realtime PCR was evaluated. Melting temperature specific for 171 bp fragment of *M. leprae* 16s rRNA gene was 86 °C (2B)..

Figure 3 Quantitative detection of *M. leprae* DNA by real-time PCR. Crossing line was analyzed to create a standard curve (3A). A relation of fluorescence signal and the concentration of DNA template was a linear regression (3B).

Figure 4 Leprosy diagnosis and quantitation of *M. leprae* by lightcycler real-time PCR; Amplification of 171 bp DNA fragment of *M. leprae* 16s rRNA gene (4A); linear regression of standard curve (4B and 4C). Confirmation of PCR product was conducted by using 2 % agarose gel electrophoresis to detection 171 bp DNA fragment of *M. leprae* 16s rRNA gene from skin biopsy of leprosy patients: Lane M, DNA marker; Lane 1, *M. leprae* 1,000 cells; Lane 2, patient code 30/02, type MB/LL BI= 4+; Lane 3, patient code 47/02, type MB/BT BI= 0.6; Lane 4, patient code 48/02, type MB/LL BI=6+; Lane 5, patient code 55/02, type MB/BL BI=4+; Lane 6, patient code 56/02, type MB/BL BI=4.33+; Lane 7, patient code 63/02, type MB/BB BI=1.5+, Lane 8, patient code 84/02, type MB/BT BI=0.25+; Lane 9, patient code, 94/02 type PB/BT BI=0; Lane 10, patient code 100/02, type MB/BB BI=0.5+; Lane 11, Negative control