Thesis Title	Development of an *in vitro* Assay for the Evaluation of Drug Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*
Author	Mr. Sakarin Chanwong
M.S.	Microbiology
Examining Committee	Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon Chairman Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn Member Assoc. Prof. Prasit Tharavichitkul Member Dr. Attapon Cheepsattayakorn Member

Abstract

Tuberculosis (TB) is endemic in most parts of the wold and remains one of the most critics global health problems. The bacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, is the single cause leading to infection and mortality worldwide. The increase in multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* (MDR-TB) is also alarming. When left undetected, MDR-TB has resulted in high mortality rates and produced several community outbreaks. A drug susceptibility test can improve rapid detection of drug-resistant *M. tuberculosis*, allowing for prompt initiation of appropriate therapy.

It is of interest to evaluate the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human, rabbit, mouse and guinea pig macrophages in order to be used in the development of an appropriate *in vitro* test for drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* both inside and outside infected cells. Monocyte derived human and rabbit macrophages were prepared from adherent cells in peripheral blood mononuclear cells. The mouse and guinea pig macrophages were isolated from the intraperitoneal exudate after injection with 3% thioglycollate for 5 days. The cells were cultured in a RPMI-1640

medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) in 24-well culture plate. Non-adherent cells were removed by washing. Macrophages were infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain with the multiplicity of infection at 10 mycobacteria per macrophage. Growth rate of *M. tuberculosis* H37Rv strain in macrophages was investigated by colony-forming unit (cfu) assay. The percent of adherent cells from human, rabbit, mouse and guinea pig sample was 15 %, 15%, 70 % and 75 %.The average percent of viability was 93%, 95%, 95%, and 95%, respectively. The average percent positive for non-specific esterase staining in human, rabbit, mouse and guinea pig macrophages was 72%, 75 %, 90% and 94% and the average percent of monocyte was 73%, 69%, 95% and 94% respectively. The average percentage of infected human, rabbit, mouse and guinea pig macrophages was 22%,19%, 46% and 58% respectively. The average number of colony-forming unit of *M. tuberculosis* in human, rabbit, mouse and guinea pig macrophages was 4.3×10^3, 3.5×10^3, 3.7×10^3 and 5.4×10^3 after infection on day 0. 7.3×10^3, 3.5×10^3, 8.7×10^3 and 1.33×10^4 on day 3. 3.8×10^4, 1.8×10^4, 1.2×10^5 and 1.4×10^5 on day 6 and 1.53×10^5, 9.47×10^4, 7.33×10^5 and 3.8×10^6 on day 10. respectively. The average generation time of *M. tuberculosis* H37Rv in human, rabbit, mouse and guinea pig macrophages was 97 h, 240 h, 59 h and 56 h after growing for 0-3 days, 31 h, 31 h, 19 h and 21 h after 3-6 days, 48 h, 40 h, 37 h and 20 h after 6-10 days and 33.4 h, 50.6 h, 31.5 h, and 25.5 h after 0 -10 days respectively. Guinea pig macrophages were the most susceptible hosts to intracellular growth of *M. tuberculosis* H37Rv. This type of macrophage was selected for the assay of anti-mycobacterial drug activity within infected cells. The *M. tuberculosis* infected macrophages were used for the evaluation of antimycobacterial activity at different concentration of isoniazid and rifampicin inside the infected cells.

The infected macrophages were lysed after treatment with isoniazid or rifampicin for 0 , 3 , 6 and 10 days. The lysate solution was diluted and cultured on LJ medium at 37°C for 3 weeks, Colonies of *M. tuberculosis* were determined. The minimal inhibitory concentration (MIC) of isoniazid against intracellular and extracellular bacteria was 0.1 μg/ml and 0.4 μg/ml, while the MIC of rifampicin against intracellular and extracellular

bacteria was 0.1 μg/ml and 0.2 μg/ml respectively. The minimal bactericidal concentration (MBC) of isoniazid against intracellular and extracellular bacteria was 0.2 μg/ml and 0.4 μg/ml while the MBC of rifampicin against intracellular and extracellular bacteria was 0.1 μg/ml and 0.2 μg/ml respectively. The MIC and MBC of both drugs against the intracellular bacteria were at least two folds lower than those of the extracellular bacteria. Isoniazid and rifampicin showed a dose dependent inhibition against intracellular mycobacteria. Morever, when tested against resistant strains both drugs were unable to inhibit the intracellular and extracellular growths of bacteria even though the drug concentration was increased up to 6.4 μg/ml.

This study aimed to develope a simple and rapid method to detect isoniazid and rifampicin resistant *M. tuberculosis* by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT), an oxidation-reduction dye, to assay for the viable bacteria after treatment with isoniazid or rifampicin. This method required only one culture cycle to obtains sufficient amount of *M. tuberculosis* for drug susceptibility test. *M. tuberculosis* was cultured with various concentrations of isoniazid or rifampicin. MTT was added to the *M. tuberculosis* culture at day 3, 5, 7 and 10. The results showed that the control culture (no drug in the culture medium) and the resistant strain were able to reduce the dye from yellow color to purple color formazan. The purple formazan was solubilized to a homogeneous solution and the optical density (OD) was measured at the wavelength of 570 nm. The MIC of isoniazid against susceptible *M. tuberculosis* after treatment for 3, 5, 7 and 10 days were 1.25 μg/ml, 0.625 μg/ml, 0.156 μg/ml and 0. 156 μg/ml respectively. The MIC of rifampicin at each time points was 0.312 μg/ml. In contrast, the growth of resistant strain was not inhibited even though the drug concentration was increase up to 5.0 μg/ml.

In conclusion, guinea pig macrophages were the most suitable hosts for the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis.* Additionally, an *in vitro* macrophages cell culture model can be developed for drug susceptibility testing. The drug activity of isoniazid and rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* was better intracellularly compared to extracellularly. Furthermore, the MTT assay, a simple, rapid

and economic method can be used for the screening of the drug-resistant strains of *M. tuberculosis*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อประเมินความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค
ชื่อผู้เขียน	นายศักรินทร์ จันทร์วงศ์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์	กรรมการ
รศ. ประสิทธิ์ ธาราวิจิตรกุล	กรรมการ
นพ. อรรถพล ชีพสัตยากร	กรรมการ

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญมีการแพร่ระบาดอยู่ในพื้นที่ส่วนใหญ่ของโลก และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ยังไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจัง วัณโรคเกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งมีความรุนแรง สามารถทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ การควบคุม ป้องกัน และรักษาที่ไม่มีประสิทธิภาพทำให้ปัญหาวัณโรคกลับเลวร้ายขึ้นส่งผลกระทบต่อการแพร่ระบาดและก่อให้เกิดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานให้สูงขึ้น ในสถานการณ์ที่มีความชุกของเชื้อวัณโรคดื้อยาสูง การทดสอบการดื้อยาของเชื้อวัณโรค มีความจำเป็นต่อแนวทางการรักษา เชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยรายใหม่ทุกรายและผู้ป่วยที่การรักษาล้มเหลวที่อยู่ในระหว่างหรือหลังการรักษาควรได้รับการทดสอบก่อนเริ่มการรักษา แต่วิธีการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคโดยทั่วไปยังมีความล่าช้า จึงควรได้รับการพัฒนาให้รวดเร็วและเหมาะสม

ในการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการเจริญของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ในเซลล์ macrophages ที่แยกได้จากคน กระต่าย หนูถีบจักร และหนูตะเภา เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่อยู่ภายในและภายนอก

เซลล์การเตรียมเซลล์ macrophages จากคนและกระต่าย เตรียมจาก peripheral blood mononuclear cells และเซลล์ macrophages จากหนูถีบจักร และหนูตะเภา เตรียมโดยการฉีด 3% thioglycollate เข้าช่องท้องหนูถีบจักร และหนูตะเภา แล้วหลังจากนั้น 5 วัน จึงเก็บเซลล์จากช่องท้อง แยกเอาเซลล์จากช่องท้องแล้วจึงแยกเอาเซลล์ macrophages โดยอาศัยคุณสมบัติการยึดเกาะกับหลุมพลาสติก แล้วล้างเซลล์อื่นที่ไม่เกาะหลุมพลาสติกออก นำเอาเซลล์ที่เกาะกับหลุมพลาสติกมาทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ ย้อมสี non-specific esterase และย้อมสี Wright's นำเอาเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธ์ที่มีความรุนแรงต่อการเกิดโรคมาผสมกับเซลล์ที่พัฒนามาเป็น macrophages ในอัตราส่วนเชื้อต่อเซลล์ 10:1 แล้วเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°Cนาน 24 ชั่วโมง ล้างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่อยู่นอกเซลล์ออกแล้วนำเอาเซลล์ที่เกาะติดกับหลุมพลาสติกย้อมสีทนกรด นับจำนวนร้อยละของเซลล์ macrophages ที่กินแบคทีเรีย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ macrophages ที่กินเชื้อต่อไปนาน 0, 3, 6 และ 10 วัน แล้วทำให้เซลล์ macrophages แตก นำเชื้อที่ออกมาจากเซลล์ macrophages นี้ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค Lowenstein-Jensen ให้ได้จำนวนcolony ของเชื้อเพื่อใช้ประเมินอัตราการเจริญของเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่แยกได้จาก คน กระต่าย หนูถีบจักร และหนูตะเภา จำนวนเซลล์ที่เกาะหลุมพลาสติกจากจำนวนที่ใส่ลงไปทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 15, 15, 70 และ 75. เซลล์ที่มีชีวิตคิดเป็นร้อยละ 93, 95, 95 และ 95 เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อการย้อมเอนไซน์ non-specific esterase คิดเป็นร้อยละ 72, 75, 90 และ 94 และเซลล์ชนิด monocyte คิดเป็นร้อยละ 73, 69, 95 และ 94 ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่กินเชื้อคิดเป็นร้อยละ 22, 19, 46 และ 59 ตามลำดับ จำนวน colony ของเชื้อที่ถูกเซลล์ macrophagesจากคน กระต่าย หนูถีบจักร และ หนูตะเภา กินเป็นเวลา 0 วัน มีจำนวน 4.3 x 10^3, 3.5 x 10^3, 3.7 x 10^3 และ 5.4 x 10^3 เซลล์/มล ส่วนที่กินเป็นเวลา 3 วัน มีจำนวน 7.3 x 10^3, 3.5 x 10^3, 8.7 x 10^3 และ1.33 x 10^4 เซลล์/มล กินเป็นเวลา 6 วัน มีจำนวน 3.8 x 10^4, 1.8 x 10^4, 1.2 x 10^5 และ 1.41 x 10^5 เซลล์/มล กินเป็นเวลา 10 วัน มีจำนวน 1.53 x10^5, 9.47 x 10^4, 7.33 x10^5 และ 3.8 x 10^6 เซลล์/มล ตามลำดับ เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv มีอัตราการแบ่งตัวในเซลล์ macrophages ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง 3 เป็นเวลา 97, 240, 59 และ 56 ชั่วโมง, วันที่ 3 ถึง 6 เป็นเวลา 31, 31, 19 และ 21 ชั่วโมง, วันที่ 6 ถึง 10 เป็นเวลา 48, 40, 37 และ 20 ชั่วโมง และระหว่างวันที่ 0 ถึง 10 เป็นเวลา 33.4, 50.6, 31.5 และ 25.5 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์ macrophages ของหนูตะเภาเอื้อต่อเชื้อ *M. tuberculosis* ให้เจริญภายในเซลล์ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกนำมาใช้ในการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา isoniazid และยา rifampicin โดยเพาะ

เลี้ยงเซลล์ที่กินเชื้อวัณโรคชนิดที่ดื้อและไวต่อยาทั้งสองในระดับความเข้มข้นต่างๆต่อเชื้อ *M. tuberculosis* ที่อยู่ ในเซลล์และนอกเซลล์

เซลล์ macrophages ที่ติดเชื้อหลังจากการให้สัมผัสกับยา isoniazid หรือ rifampicin เป็นเวลา 0, 3, 6 และ 10 วันแล้วนำมาทำให้เซลล์แตก แล้วจึงนำไปทำ dilution แล้วนำแต่ละ dilution ไปเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Lowenstein-Jensen medium (LJ medium) ที่ 37°C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงนับ colony ของเชื้อ *M. tuberculosis* ค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของยา isoniazid ต่อเชื้อที่อาศัยอยู่ในเซลล์และนอกเซลล์ มีค่า 0.1 μg/ml และ 0.4 μg/ml และของยา rifampicin มีค่า 0.1 μg/ml และ 0.2 μg/ml ตามลำดับ ความเข้มของยาที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของยา isoniazid ต่อเชื้อที่อาศัยอยู่ในเซลล์และนอกเซลล์ มีค่า 0.2 μg/ml และ 0.4 μg/ml และ MBC ของยา rifampicin มีค่า 0.1 μg/ml และ 0.2 μg/ml ตามลำดับ ค่า MIC และ MBC ของยา isoniazid และ rifampicin สามารถต่อต้านเชื้อสายพันธ์ชนิดไวต่อยาที่อาศัยอยู่ในเซลล์ ในขนาดความเข้มข้นที่ต่ำกว่านอกเซลล์ 2 เท่าและพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาทั้ง 2 ให้สูงขึ้นจำนวนเชื้อก็ลดลงตามด้วย อย่างไรก็ตามในการทดสอบกับเชื้อสายพันธ์ดื้อยาพบว่ายาทั้ง 2 ไม่สามารถต้านเชื้อทั้งที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์ได้ แม้ว่าจะเพิ่มคามเข้มข้นของยาสูงถึง 6.4 μg/ml ก็ตาม

การศึกษานี้ยังได้พัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยนำสี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่มีคุณสมบัติเป็นสี Oxidation-Reduction มาทดสอบดูการมีชีวิตของเชื้อหลังจากสัมผัสยามาแล้ว ถ้าเชื้อยังมีชีวิตจะสามารถ reduce สี MTT ให้เห็นตะกอนสีม่วง วิธีการทดสอบจะใช้วิธี MIC โดยเพาะเชื้อที่ไวและดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin ในอาหารเหลว Middle Brook 7H9 ที่มี oleic acid, albumin, dextrose and catalase (OADC) อยู่จำนวน 10% และมียาที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ เป็นเวลา 3, 5, 7 และ 10 วัน หลังจากครบเวลาเติมสี MTT ลงไป ผลการทดสอบพบว่าเชื้อกลุ่มควบคุมที่ไม่มียาผสมในอาหารเพาะเชื้อและเชื้อดื้อยาสามารถเปลี่ยนสารละลายที่เคยมีสีเหลืองกลายเป็นตะกอนสีม่วง เมื่อเติมสารละลายตะกอนจนตะกอนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm อ่านค่า MIC ในหลุมแรกที่ไม่มีสีเกิดขึ้นค่า MIC ของยา isoniazid ที่ยับยั้งเชื้อที่ไวต่อยาในวันที่ 3 มีค่าเท่ากับ 1.25 μg/ml วันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 0.625 μg/ml วันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 0.156 μg/ml และ วันที่ 10 มีค่าเท่ากับ 0.078 μg/ml สำหรับค่า MIC ของยา rifampicin ที่สามารถยับยั้งเชื้อที่ไวต่อยาในวันที่ 3, 5, 7 และ 10 มีค่าเท่ากับ 0.312 μ

g/ml เหมือนกันหมดทุกวัน ส่วน การเจริญเติบโตของเชื้อที่ดื้อยาจะไม่ถูกยับยั้งแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของยาขึ้นไปสูงถึง 5.0 μg/ml ก็ตาม

โดยสรุปจากการศึกษานี้พบว่าเซลล์ macrophages จากหนูตะเภาเอื้อต่อการเจริญแบ่งตัวภายในเซลล์ของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ได้ดีที่สุด และพบว่าสามารถพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา isoniazid และ rifampicin กับเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่อยู่ในเซลล์ macrophages โดยยาสามารถออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อที่อยู่ในเซลล์ได้ดีกว่าเชื้อที่อยู่นอกเซลล์ นอกจากนี้พบว่าการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้สี MTT สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ประหยัด เหมาะสำหรับนำไปตรวจกรองหาเชื้อวัณโรคดื้อยาได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University