

การตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลิน
และฝังในพาราฟินด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR KIT
เปรียบเทียบกับวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิม

Mycobacterium tuberculosis Complex Detection in
Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Using
abTES™ MTB qPCR KIT in Comparison with
Conventional Polymerase Chain Reaction

ศิริรัตน์ สีขุนทด* และภานินี ถาวรังกูร

สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Sirirat Seekhantod* and Paninee Thavarungul

Institute of Pathology, Department of Medical Services, Ministry of Public Health,

Rajvithi Road, Thung Phaya Thai, Rajthevee, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อทั่วโลก ซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ถูกต้องและรวดเร็วมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการรักษาวัณโรค การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ระหว่างวิธีที่รวดเร็ว คือ ชุดน้ำยาสำเร็จรูป abTES™ MTB และวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (C-PCR) ที่ราคาสูงกว่า แต่ใช้เวลาในการวินิจฉัยนานกว่า การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ซึ่งส่งตรวจมายังสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ จำนวน 640 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อและตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB และวิธี C-PCR ผลการศึกษาพบว่าวิธี C-PCR มีความไวมากกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB โดยพบ 199 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) ให้ผลบวกด้วยวิธี C-PCR และ 192 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28) ให้ผลบวกด้วยวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ผลการเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธี โดยการวิเคราะห์ค่า Kappa พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกันยอมรับได้ระดับดีมาก ($K = 0.959$, 95 % CI 0.936-0.983) โดยสรุปวิธี C-PCR

*ผู้รับผิดชอบบทความ : sirirat.seekhantod@gmail.com

มีประสิทธิภาพมากกว่า มีค่าใช้จ่ายต่ำกว่า ถึงแม้จะใช้เวลามากกว่า โดยเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

คำสำคัญ : ไมโคแบคทีเรีย; เทคนิคพีซีอาร์แบบดั้งเดิม; เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์; ชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลิน และฝังในพาราฟิน

Abstract

Tuberculosis (TB) is the crucial cause of death from infectious diseases worldwide. The causative agents of TB are a group of closely related bacteria known as the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Accurate and rapid diagnosis by PCR method is helpful for the successful treatment of tuberculosis. The aim of this study was to compare the efficiency between a more rapid method by a commercial kit (abTES™ MTB qPCR kit) and a cheaper but less rapid method by conventional polymerase chain reaction (C-PCR) for the detection of *M. tuberculosis* complex in FFPE tissue. Six hundred and forty formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues that showed histomorphology suspected of tuberculous infection were collected from the Institute of Pathology, Department of Medical Services. DNA was isolated from the FFPE tissue and two methods of PCR were performed by using the abTES™ MTB qPCR kit and C-PCR for the detection of *M. tuberculosis* complex. The results showed that C-PCR was more sensitive for detection of *M. tuberculosis* complex than abTES™ MTB qPCR kit. There were 199 samples (30 %) positive for TB-DNA by C-PCR and 192 samples (28 %) positive for TB-DNA by abTES™ MTB qPCR kit. The comparison between these two methods by kappa analysis showed a very good agreement ($K = 0.959$, 95 % CI 0.936-0.983). In conclusion, C-PCR is more effective for the detection of TB DNA in FFPE tissue. This less costly method (even taking longer time) is an alternative method for the detection of MTBC infection in FFPE tissue.

Keywords: mycobacterium; C-PCR, real-time PCR; formalin-fixed & paraffin-embedded (FFPE) tissue

1. บทนำ

วัณโรคยังคงเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย โดยมีเชื้อสาเหตุคือ *Mycobacterium tuberculosis* complex [1,2] ซึ่งสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 นั้น องค์การอนามัยโลกรายงานว่าประเทศไทยติด 1 ใน 20 ประเทศ ที่อยู่ในกลุ่มประเทศที่พบการติดเชื้อมากที่สุด โดยพบว่าสถานการณ์การติดเชื้อวัณโรคในประเทศไทยมีอุบัติการณ์คิดเป็นอัตราประมาณ 172 ต่อประชากร

100,000 คน [1]

การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์มีความสำคัญในการช่วยสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยวัณโรคของแพทย์ผู้รักษา โดยห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาเชื้อที่ติดสีทากรด (acid fast bacilli) แล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ประหยัด ง่ายต่อการปฏิบัติ แต่ขาดความไว มีความไวเพียง 40-60 % เท่านั้น และยังไม่สามารถแยกแยะ

ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม Mycobacterium [3,4] การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งใช้ระยะเวลา 28-56 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ที่ใช้ระยะเวลา 7-42 วัน [5,6] ซึ่งการใช้ระยะเวลา ยาวนานนั้นอาจทำให้ผู้ป่วยแพร่เชื้อไปสู่ชุมชนได้ง่าย ดังนั้นการนำเทคนิควิธีการตรวจใหม่ ๆ โดยการตรวจระดับสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งอาศัยหลักการทางอณูชีววิทยา ได้แก่ เทคนิค polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR และ nucleic acid sequence based amplification (NASBA) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค พบว่ามีศักยภาพในการทดสอบสูง เชื่อถือได้ และรวดเร็ว [3,5] นอกจากนี้เทคนิค PCR ยังสามารถระบุชนิดของเชื้อในกลุ่ม Mycobacterium อีกด้วย [8] และการนำเทคนิค PCR หรือ real-time PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยนั้นใช้เวลาเพียง 4-5 ชั่วโมง เท่านั้น ซึ่งช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วยิ่งขึ้น [7,8]

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค PCR โดยห้องปฏิบัติการเอง (in-house PCR) นั้นเลือกใช้ตำแหน่งยีน IS6110 เพราะเป็นตำแหน่งที่ใช้เป็นเครื่องมือที่นำเชื้อถือในการตรวจตัวอย่างทางคลินิกมากที่สุด มีความไวและความจำเพาะสูง (92.4 และ 98 % ตามลำดับ) [9,10] เป็นยีนที่มีความคงตัวและมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ (conserved gene) [11-13] และใช้ยีน beta-globin ในการวัดคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างในการทำปฏิกิริยา C-PCR ในแต่ละครั้ง [10]

การตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยเทคนิค real-time PCR มีหลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับเทคนิค PCR สามารถทราบผลเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเชื้อวัณโรค [14,15] โดยตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมขณะทำปฏิกิริยานั้น ๆ หลักการ

นี้ คือ การติดฉลากสารเรืองแสง เช่น SYBR[®] Green I หรือโพรบที่ความยาวคลื่นต่างกัน เข้ากับสารพันธุกรรมข้างต้น และไพรเมอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะ เพื่อแสดงปริมาณขณะตรวจวิเคราะห์ [16-19] ปัจจุบันห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นำเทคนิค real-time PCR มาใช้เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยผู้ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อวัณโรค โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป abTEST[™] MTB qPCR KIT (AITbiotech, Singapore) สามารถตรวจ *M. tuberculosis* complex และประสบความสำเร็จในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะและน้ำไขสันหลัง [4] แต่ชุดตรวจสำเร็จรูปดังกล่าวข้างต้นยังไม่ถูกประเมินในกลุ่มตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน และอีก 1 ประเด็นสำคัญ ชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ต้องพึ่งเทคโนโลยีต่างประเทศ ซึ่งมีต้นทุนที่สูง อาจไม่เหมาะสมกับประเทศที่กำลังพัฒนา

การศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความไวของเครื่องมือและน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* complex ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน โดยวิธี C-PCR ที่พัฒนาขึ้นใช้เองในห้องปฏิบัติการ และวิธี real-time PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES[™] MTB qPCR kit และวิเคราะห์หาค่าความสอดคล้อง (Kappa analysis) กันของทั้ง 2 วิธี เพื่อประโยชน์สูงสุดของผู้ป่วยและลดต้นทุนขององค์กร

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ซึ่งส่งตรวจกับสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวง

สาธารณสุข ในช่วงปี พ.ศ. 2557-2560 จำนวน 640 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างถูกตรวจและประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยา (histopathology) จากสไลด์ย้อมสี hematoxylin และ eosin และวงพื้นที่บริเวณรอยโรคโดยพยาธิแพทย์ การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เอกสารรับรองเลขที่ IOP-KM-R56-001

2.2 การย้อมสี hematoxylin และ eosin บนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

ตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินด้วยเครื่องไมโครโตม (Leica, United States) เป็นแผ่นบาง ๆ ลักษณะเป็นริบบอน (ribbon) ให้มีความหนา 2-3 ไมโครเมตร ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว อบแผ่นสไลด์แก้วด้วยความร้อน 65-70 °C นาน 30 นาที แล้ว deparaffinization โดยการแช่ในสารละลายไซลีน จำนวน 3 โถ ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยการดึ่งน้ำออก ด้วยการแช่ใน 100 % isopropyl alcohol จำนวน 2 โถ ครั้งละ 5 นาที และแช่ใน 95 % isopropyl alcohol จำนวน 2 โถ ครั้งละ 5 นาที ต่อด้วยการล้างด้วยน้ำประปา โดยให้น้ำประปาไหลผ่านนาน 10 นาที และล้างชิ้นเนื้อด้วยน้ำกลั่น จากนั้นย้อมชิ้นเนื้อด้วยการแช่ในสารละลาย hematoxylin นาน 5 นาที ต่อด้วยการล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน นาน 5 นาที และล้างชิ้นเนื้อด้วยน้ำกลั่น ต่อด้วยการแช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย bluing ที่ผสมในสารละลายแอมโมเนีย 0.2 % นาน 30 วินาที ต่อด้วยการล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน นาน 5 นาที ต่อด้วยการแช่ในสารละลาย 95 % isopropyl alcohol โดยการยกแผ่นสไลด์แก้วขึ้น-ลง (dips) จำนวน 10 ครั้ง จากนั้น counterstain ชิ้นเนื้อด้วยการแช่ในสารละลาย eosin นาน 3 นาที ต่อด้วยการกระบวนการ dehydrate ด้วยการแช่ชิ้นเนื้อใน

สารละลาย 95 % isopropyl alcohol โดยการ dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ และแช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย 100 % isopropyl alcohol โดยการ dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ ต่อด้วยการกระบวนการ clearing ด้วยการแช่ชิ้นเนื้อในสารละลายไซลีน โดยการ dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ และ mount โดยปิดทับชิ้นเนื้อด้วย cover glass และ mounting medium รอจนสไลด์แห้ง แล้วนำไปกำหนดพื้นที่บริเวณรอยโรค (granuloma, epithelioid cell, necrosis, caseous necrosis, Langhans giant cell) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยพยาธิแพทย์

2.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน มาตัดให้ชิ้นเนื้อหนา 10 ไมโครเมตร ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว ชุดชิ้นเนื้อ (microdissection) บริเวณรอยโรคที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรคด้วยเข็มปลอดเชื้อใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และละลายพาราฟินด้วยการเติมสารละลายไซลีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 10 นาที ต่อด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายไซลีนทิ้ง ต่อกระบวนการล้างด้วยการเติม 100 % แอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 10 นาที และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วเปิดฝาหลอด microcentrifuge ให้แอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมด จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากบล็อกชิ้นเนื้อโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, Germany) วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง nanodrop ปรับสารละลายดีเอ็นเอให้มีปริมาณความเข้มข้น 500 ng/μL และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่

-40 °C จนกว่าจะนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.4 การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ

M. tuberculosis complex ด้วยวิธี C-PCR

การทำปฏิกิริยา C-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* โดยการดัดแปลงและพัฒนามาจากวิธีของ Chantranuwat และคณะ [10, 13] โดยการปรับส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา C-PCR ให้เหมาะสม 2 หลอดการทดลอง ดังนี้ หลอดที่ 1 ทำปฏิกิริยาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ที่จำเพาะต่อยีน IS6110 ปริมาตรรวมทั้งหลอดสุทธิ 25 μ L ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 1.5 μ L, 10 mM dNTP (New England Biolabs, USA) ปริมาตร 0.5 μ L, Amplitaq gold DNA polymerase 5 Unit/ μ L (Applied Biosystems, USA) ปริมาตร 0.125 μ L, DNA template ความเข้มข้น 500 ng/ μ L ปริมาตร 2 μ L ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 16.375 μ L และ 0.4 μ M oligonucleotide primer จำนวน 2 เส้น คือ forward primer: 5'-CCT-GCG-AGC-GTA-GGC-GTC-GG-3' และ reward primer: 5'-CTC-GTC-CAG-CGC-CGC-TTC-GG-3' หลอดที่ 2 ทำปฏิกิริยาเพื่อประเมินคุณภาพดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน beta-globin ปริมาตรรวมทั้งหลอดสุทธิ 25 μ L ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 1.5 μ L, 10 mM dNTP (New England Biolabs, USA) ปริมาตร 0.5 μ L, Amplitaq gold DNA polymerase 5 Unit/ μ L (Applied Biosystems, USA) ปริมาตร 0.125 μ L, DNA template ความเข้มข้น 500 ng/ μ L ปริมาตร 2 μ L ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 16.375 μ L และ 0.4 μ M oligonucleotide primer จำนวน 2 เส้น คือ forward primer: 5'-ACA-CAA-CTG-TGT-TCA-CTA-GC-3' และ reward primer: 5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-

TCA-CC-3' โดยยีนเป้าหมายทั้ง 2 ยีน พัฒนาให้ใช้ PCR condition เดียวกัน คือ ขั้นตอน denaturation ที่ 95 °C นาน 10 นาที และตามด้วยการทำปฏิกิริยาซ้ำ จำนวน 40 รอบ ของขั้นตอน denaturation ที่ 95 °C นาน 45 วินาที, ขั้นตอน annealing ที่ 63 °C นาน 45 วินาที, ขั้นตอน extension ที่ 72 °C นาน 45 วินาที และขั้นตอนสุดท้ายด้วย final extension ที่ 72 °C นาน 10 นาที โดยเครื่องพีซีอาร์ยี่ห้อ Bio-RAD รุ่น C-1000 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ใน 6 % acrylamide gel ที่ 140 โวลท์ นาน 45 นาที เมื่อเสร็จสิ้นย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (1 : 400, Lonza, USA) นาน 30 นาที แล้วส่องและถ่ายภาพเจลดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene, USA) วิเคราะห์ผลโดยดูขนาด PCR product ของเชื้อ MTBC ที่ได้จะมีขนาด 123 bp และขนาด PCR product ของยีน beta-globin ที่ได้จะมีขนาด 110 bp ใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรค (positive-MTBC) เป็น positive control และใช้ sterilized DW เป็น negative control และทุก ๆ ตัวอย่างของผู้ป่วยแต่ละรายทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (รูปที่ 1)

2.5 การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ

M. tuberculosis complex ด้วยวิธี ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit

การทำปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB (AITbiotech, Singapore) โดยชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน IS6110 มี PCR product ขนาด 130 bp [4] ทำปฏิกิริยา ปริมาตรทั้งหมดรวมสุทธิ 25 μ L ประกอบด้วย 2X MTB master mix ปริมาตร 12.5 μ L, MTB primer mix ปริมาตร 0.5 μ L, MTB probe mix ปริมาตร 0.5

μL, MTB Internal control ปริมาตร 0.2 μL, nuclease-free water ปริมาตร 6.3 μL และ DNA template ความเข้มข้น 500 ng/μL ปริมาตร 5 μL ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย ขั้นตอน tag activation ที่ 95 °C นาน 7 นาที ตามด้วย amplification จำนวน 42 รอบ ที่ 95 °C นาน 12 วินาที, annealing ที่ 64 °C นาน 25 วินาที โดย

เก็บข้อมูลที่ขั้นตอน annealing phase จะตรวจวัดในช่องแสง FAM สำหรับการตรวจวัดเป้าหมายเชื้อ MTBC และตรวจวัดในช่องแสง Texas Red สำหรับการตรวจวัดเป้าหมาย internal control ด้วยเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ ยี่ห้อ Bio-RAD รุ่น CFX96 วิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาแบบ qualitative detection โดยดูลักษณะ amplify curve เหนือเส้น threshold โดยมี

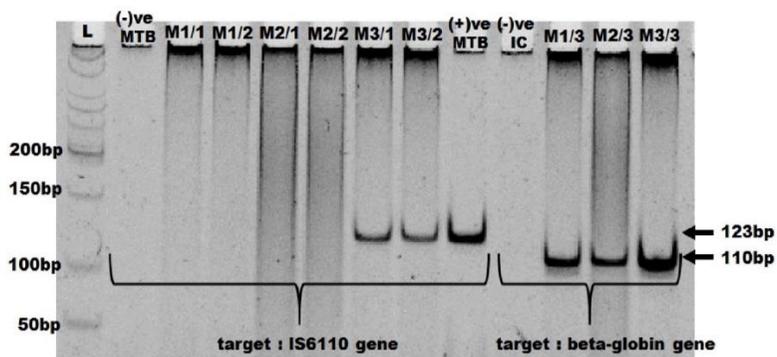


Figure 1 C-PCR assay distinguished IS6110 gene in *M. tuberculosis* complex and beta-globin gene. L: 50 bp DNA ladder; (-)ve MTB: negative control (IS6110 gene); M1/1-M1/2 and M2/1-M2/2: by duplication reaction with clinical sample number 1 and 2 showed no MTB infection; M3/1-M3/2: by duplication reaction with clinical sample number 3 showed MTB infection; (+)ve MTB: positive control (IS6110 gene); show PCR product at 123 bp; (-)ve IC: negative control (beta globin gene); M1/3, M2/3 and M3/3: clinical sample number 1, 2 and 3 were tested DNA quality and showed PCR product at 110 bp, respectively.

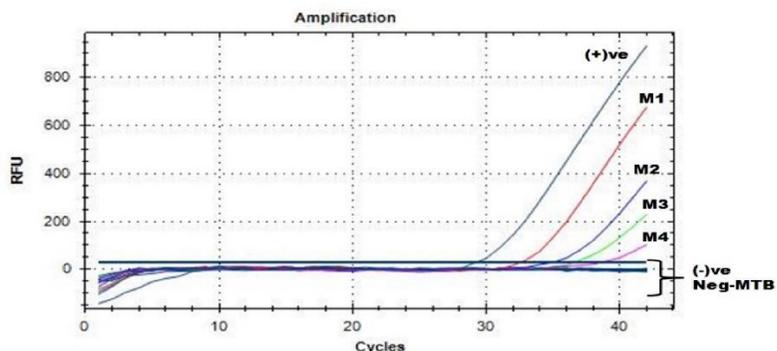


Figure 2 The abTES™ MTB qPCR assay; (+)ve: positive control; (-)ve: negative control; M1, M2, M3 and M4: the sample has MTB infection; Neg-MTB: the sample has no MTB infection.

Table 1 Correlation between MTB infections and patients' characteristics of 640 samples

Characteristics	N (%)	Negative-TB N (%)	Positive-TB N (%)	p-values
Total patients = 640 samples				
Median age (range) = 42 years				
<20 years	83 (12.5 %)	57 (12.93 %)	26 (13.07 %)	0.127
20-39 years	209 (33.5 %)	130 (29.48 %)	79 (39.70 %)	
40-59 years	201 (31.5 %)	147 (33.33 %)	54 (27.14 %)	
60-79 years	127 (19.5 %)	93 (21.09 %)	34 (17.09 %)	
80-99 years	20 (3 %)	14 (3.17 %)	6 (3.00 %)	
Gender				
Male	317 (49.5 %)	234 (53.06 %)	83 (41.71 %)	0.008
Female	323 (50.5 %)	207 (46.94 %)	116 (58.29 %)	
Organs				
Soft tissue	24 (3.75 %)	19 (4.31 %)	5 (2.51 %)	0.0001
Intestine	93 (14.53 %)	82 (18.59 %)	11 (5.53 %)	
Bone	58 (9.06 %)	47 (10.66 %)	11 (5.53 %)	
Cervical region	11 (1.72 %)	8 (1.81 %)	3 (1.51 %)	
Skin	39 (6.09 %)	31 (7.03 %)	8 (4.02 %)	
Testis	8 (1.25 %)	5 (1.13 %)	3 (1.51 %)	
Lung	57 (8.91 %)	41 (9.30 %)	16 (8.04 %)	
Breast	9 (1.41 %)	9 (2.04 %)	0	
Lymph node	213 (33.28 %)	110 (24.94 %)	103 (51.76 %)	
Neck mass	19 (2.97 %)	11 (2.49 %)	8 (4.02 %)	
Oral cavity	14 (2.19 %)	10 (2.27 %)	4 (2.01 %)	
Cerebellum	12 (1.88 %)	8 (1.81 %)	4 (2.01 %)	
Peritoneum	8 (1.25 %)	4 (0.91 %)	4 (2.01 %)	
Nasopharyngeal	8 (1.25 %)	6 (1.37 %)	2 (1.01 %)	
Liver	8 (1.25 %)	7 (1.59 %)	1 (0.50 %)	
Spine and bone marrow	8 (1.25 %)	7 (1.59 %)	1 (0.50 %)	
Synovitis	24 (3.75 %)	18 (4.08 %)	6 (3.01 %)	
Others	27 (4.22 %)	18 (4.08 %)	9 (4.52 %)	
Histological classification				
No granulomatous	162 (25.31 %)	147 (33.33 %)	15 (7.54 %)	0.0001
Chronic, inflammation, necrotic	377 (58.91 %)	254 (57.60 %)	123 (61.81 %)	
Caseation, granuloma, Langhans giant cells	101 (15.78 %)	40 (9.07 %)	61 (30.65 %)	

เกณฑ์การแปลผล คือ กรณีช่องแสง FAM ค่า ct <40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลบวก (positive-MTBC) ค่า ct \geq 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลลบ (negative-MTBC) และกรณีช่องแสง Texas Red ค่า ct <35 ถือว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์ (valid) ใช้ positive-MTBC ของชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB เป็น positive control และใช้ sterilized DW เป็น negative control (รูปที่ 2)

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของวิธี C-PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB คือ Chi-square test โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % และใช้ค่า Kappa (K) เพื่อประเมินค่าการยอมรับและความสอดคล้องกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี กรณีที่ค่า K=0.0-0.4 คือ ค่าการไม่ยอมรับในความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี หากค่า K=0.41-0.6 คือ ค่าการยอมรับได้ในระดับปานกลางในความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี หากค่า K=0.81-1.0 คือ ค่าการยอมรับในความสอดคล้องกันเป็นอย่างดีมากของทั้ง 2 วิธี [20] และใช้ Chi-square test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะตัวอย่างทางคลินิกของผู้ป่วย โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมอัตโนมัติ SPSS Statistics V.19

3. ผลการวิจัย

3.1 ลักษณะทางพยาธิวิทยาของตัวอย่างทางคลินิก

ตัวอย่างทางคลินิกจากผู้ป่วยทั้งหมด 640 ราย ผลการศึกษาพบว่าอายุเฉลี่ยของผู้ป่วย คือ 42 ปี กลุ่มอายุผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 20-39 ปี จำนวน 209 ราย คิดเป็น 33.5 % และ 40-59 ปี จำนวน 201 ราย คิดเป็น 31.5 % อัตราส่วนระหว่างเพศหญิงต่อเพศชาย 1.02 : 1 อวัยวะที่ส่งตรวจวินิจฉัยวัณโรคมากที่สุด 3 อวัยวะ ประกอบด้วยลำดับที่ 1 คือ

ต่อมน้ำเหลือง จำนวน 213 ราย คิดเป็น 33.28 % ลำดับที่ 2 คือ ลำไส้ จำนวน 93 ราย คิดเป็น 14.53 % และลำดับที่ 3 คือ กระดูกและปอด มีอัตราใกล้เคียงกัน กระดูก จำนวน 58 ราย คิดเป็น 9.06 % และปอด จำนวน 57 ราย คิดเป็น 8.91 % เมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับดูความแตกต่างกันของข้อมูลผู้ป่วยพบว่าผู้ป่วยทุกช่วงอายุพบการติดเชื้อวัณโรคหรือไม่ติดเชื้อวัณโรคไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เพศหญิงและเพศชายพบการติดเชื้อวัณโรคหรือไม่ติดเชื้อวัณโรคแตกต่างกัน ($p < 0.05$) อวัยวะที่แตกต่างกันพบการติดเชื้อ วัณโรคหรือไม่ติดเชื้อวัณโรคแตกต่างกัน ($p < 0.05$) และลักษณะทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อพบการติดเชื้อวัณโรคหรือไม่ติดเชื้อวัณโรคแตกต่างกัน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

3.2 การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis complex* ด้วยวิธี C-PCR และวิธี abTESTM MTB qPCR Kit

ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis complex* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน จำนวน 640 ตัวอย่าง โดยเทคนิค C-PCR ที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ และเทคนิค real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB qPCR Kit พบว่าเทคนิค C-PCR มีความไวสูงกว่า สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคใน 199 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30) และชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB qPCR Kit สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคใน 192 ตัวอย่าง (ร้อยละ 28)

เมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันของเครื่องมือ ผลการเปรียบเทียบและทดสอบความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี คือ วิธี C-PCR และวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB qPCR Kit ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 2 พบว่าทั้ง 2 วิธี ให้ผลบวกเหมือนกัน 190

ตัวอย่าง (29.69 %) ให้ผลลบเหมือนกัน 439 ตัวอย่าง (68.59 %) และให้ผลไม่สอดคล้องกันจำนวน 11 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.72 % ประกอบด้วย 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.41 % ที่วิธี C-PCR ตรวจพบเชื้อวัณโรค แต่วิธี ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค และ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.31 % ที่วิธี C-PCR

ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค แต่วิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ตรวจพบเชื้อวัณโรค เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า $K = 0.959$ และ 95 % CI มีค่า 0.936-0.983 ($p < 0.05$) ซึ่งมีความหมายรับและความสอดคล้องกันระดับดีมาก ของวิธีการตรวจทั้ง 2 วิธี ดังกล่าว (ตารางที่ 2)

Table 2 Pairwise comparison and agreement analyses between C-PCR and abTES™ MTB.

		abTES™ MTB		Total (%)
		Positive (%)	Negative (%)	
C-PCR	Positive (%)	190 (29.69 %)	9 (1.41 %)	199 (31.09 %)
	Negative (%)	2 (0.31 %)	439 (68.59 %)	441 (68.91 %)
	Total (%)	192 (30.00 %)	448 (70.00 %)	640 (100.00 %)

Kappa = 0.959; 95 % confidence interval: From 0.936 to 0.983

4. อภิปรายผล

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความไวของการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรค ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ด้วยวิธี real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB กับวิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (C-PCR) โดยการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ยืนยัน เพราะตัวอย่างชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการ tissue processing ซึ่งเชื้อวัณโรคอาจตายได้ ทำให้เพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ยังมีดีเอ็นเอของเชื้อให้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ได้ การทำปฏิกิริยาทุกครั้งจะดำเนินการควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อวัณโรคเป็น positive control และควบคุมลบโดยใช้ sterilized DW เป็น negative control และใช้ผลการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี H&E stain เป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐานยืนยันผลอีกทางหนึ่ง ซึ่งลักษณะรอยโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่พบ คือ necrosis/caseous necrosis/Langhans giant cell

วิธี C-PCR ในการศึกษาครั้งนี้เลือกการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน IS6110 มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 123 bp เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC โดยตำแหน่งที่ออกแบบให้ไพรเมอร์และโพรบไปจับอย่างเฉพาะเจาะจงกับยีน IS6110 สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ MTB ที่ต่างกัน 11 สายพันธุ์ คือ *M. tuberculosis* [Clinical T2, H37Rv (TMC102), H37Ra Goldman, Clinical T1, Clinical T3, Clinical T4, Clinical T5, Clinical T6], *M. bovis* [TMC401, TMC410, BCG Glaxo (TMC1024)], *M. Scrofulaceum* [TMC1315,41, TMC1309,42, LR121, 43] และ *M. simiae* [21] โดยวิธี C-PCR ที่ใช้ในการศึกษานี้มีรายงานและมีผลอ้างอิงกับวิธีมาตรฐาน (culture) ซึ่งเป็นที่ยอมรับจากการศึกษาของ Chantranuwat และคณะ [10] อีกด้วย

วิธี real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ผ่านการรับรองจากสถาบันรับรองความปลอดภัยของ

ประเทศเยอรมันนี้ สามารถใช้วินิจฉัยทางการแพทย์ ชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน IS6110 โดยมีผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 130 bp [4] สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC 6 สายพันธุ์ คือ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* และ *M. pinnipedii* โดยใช้เครื่อง real-time PCR ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น CPX96 ชุดตรวจนี้มีความไวและความจำเพาะ 81.3 และ 98.8 % ตามลำดับ [4]

วิธีที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC คือ วิธี C-PCR สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรค 199 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธี C-PCR ออกแบบให้ไพรเมอร์และโพรบจับกับยีน IS6110 ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กเพียง 123 bp ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB จึงเหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มากกว่า เพราะการที่ออกแบบผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น พบว่าไม่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการ fixation ด้วยฟอร์มาลินเป็นเวลานาน เป็นผลให้คุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเหล่านี้มีคุณภาพต่ำ และพบการแตกหักของดีเอ็นเอในอัตราสูง [22] รวมถึงดีเอ็นเออาจเกิดการ cross-linking ระหว่าง nucleic acid และโปรตีน ส่งผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ [23,24]

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี คือ วิธี C-PCR และวิธี abTES™ MTB พบว่ามีค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันระดับดีมาก $K = 0.959$, 95 % CI มีค่า 0.936-0.983, $p < 0.05$ โดยทั้ง 2 วิธี สามารถเป็นวิธีที่ทดแทนกัน โดยค่า K มีค่า 0.81-1.0 แต่ผลการศึกษาทั้ง 2 วิธี นี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ตรงกัน 11 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) คือ กรณี

ที่ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี abTES™ MTB แต่ให้ผลลบกับวิธี C-PCR จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้ตรวจยืนยันโดยชุดตรวจสำเร็จรูป Anyplex™ MTB/NTM real-time PCR kit พบว่า 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบเหมือนกับวิธี C-PCR และ 1 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกกับวิธี abTES™ MTB ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างกันในกระบวนการทำปฏิกิริยา เช่น ความแตกต่างของไพรเมอร์หรือโพรบที่ใช้ สภาวะอุณหภูมิและความเข้มข้นสารเคมีต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยา รวมถึงธรรมชาติของดีเอ็นเอที่สกัดมาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ซึ่งดีเอ็นเอมักแตกหักเป็นขนาดเล็กและอาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยาได้ [23-25] และกรณีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี C-PCR แต่ให้ผลลบกับวิธี abTES™ MTB จำนวน 9 ตัวอย่าง เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยวิธีชีวสารสนเทศ พบว่ามี 7 ตัวอย่าง (78 %) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100 % กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. Tuberculosis* strain 5005 (accession number: CP049108.1) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และมี 2 ตัวอย่าง (22 %) ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100 % กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* strain TCDC11 (accession number: CP046728.2) ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB นั้นสามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC เพียง 6 สายพันธุ์ คือ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* และ *M. pinnipedii* เท่านั้น ไม่ครอบคลุมสายพันธุ์ *M. tuberculosis* strain 5005 และ strain TCDC11

วิธี real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 2 ชั่วโมง สั้นกว่าวิธี C-PCR ที่ใช้เวลาถึง 4-5 ชั่วโมง

(โดยทั้ง 2 วิธี ไม่รวมถึงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ) และวิธี C-PCR ยังมีความยุ่งยากซับซ้อนกว่า อาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ที่มีปริมาณงานจำนวนมาก แต่ในแง่ของต้นทุนนั้น วิธี C-PCR ใช้เพียงเครื่องพีซีอาร์ธรรมดา และน้ำยาหรือสารเคมีมีราคาถูก จึงมีต้นทุนที่ต่ำกว่าเพียง 250 บาทต่อตัวอย่าง แต่วิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงถึง 1,770 บาทต่อตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยในครั้งต่อไปอาจต้องพัฒนาต่อยอดให้วิธี C-PCR สามารถทำปฏิกิริยาได้ในหลอดเดียว เพื่อลดระยะเวลาและขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา เพื่อรองรับปริมาณงานที่เพิ่มมากขึ้นในอนาคต และช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อลดการแพร่เชื้อวัณโรคสู่ชุมชน

5. สรุป

วิธีพีซีอาร์แบบดั้งเดิม (C-PCR) มีความไวสูง มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB และมีราคาต้นทุนต่ำ สามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน งานวิจัยในครั้งต่อไปอาจต้องพัฒนาต่อยอดให้ทำปฏิกิริยาได้ในหลอดเดียว เพื่อลดเวลาและขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา

6. กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

7. References

[1] Global Tuberculosis Report, 2016, World Health Organization (WHO), Geneva.

- [2] Gagneux, S., 2018, Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*, Nat. Rev. Microbiol. 16: 202-213.
- [3] Singh, K.K., Muralidhar, M., Kumar, A., Chattopadhyaya, T.K., Kapila, K., Singh, M.K., Sharma, S.K., Jain, N.K. and Tyagi, J.S., 2000, Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy, J. Clin. Pathol. 53: 355-361.
- [4] Inoue, M., Tang, W.Y., Wee, S.Y. and Barkham, T., 2011, Audit and improve evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 30: 131-135.
- [5] Cegielski, J.P., Devlin, B.H., Morris, A.J., Kitinya, J.N., Pulipaka, U.P., Lema, L.E., Wakatare, J.L. and Reller, L.B., 1997, Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis, J. Clin. Microbiol. 35: 3254-3257.
- [6] Nakiyingi, L., Kateete, D.P., Ocama, P., Worodria, W., Sempa, J.B., Asiimwe, B.B., Katabazi, F.A., Katamba, A., Huang, L., Joloba, M.L. and Mayanja-Kizza, H., 2012, Evaluation of in-house PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda, BMC Res. Notes 5: 487.

- [7] Hansen, W.L., Beuving, J., Bruggeman, C.A. and Wolffs, P.F., 2010, Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures, *J. Clin. Microbiol.* 48: 4432-4438.
- [8] Wang, H.Y., Lu, J.J., Chang, C.Y., Chou, W.P. and Hsieh, J.C., 2019, Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens, *Sci. Rep.* 9: 113.
- [9] Zakham, F., Lahlou, O., Akrim, M., Bouklata, N., Jaouhari, S., Sadki, K., Seghrouchni, F., Elmzibri, M., Benjouad, A., Ennaji, M. and Elaouad, R., 2012, Comparison of a DNA based PCR approach with conventional methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Morocco, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 4: e2012049.
- [10] Chantranuwat, C., Assanasen, T., Shuangshoti, S. and Sampatanukul, P., 2006, Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in papanicolaou-stained fine needle aspirated smears for diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis, *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 37: 940-947.
- [11] Singh, H.B., Singh, P., Jadaun, G.P., Srivastava, K., Sharma, V.D., Chauhan, D.S., Sharma, S.K. and Katoch, V.M., 2006, Simultaneous use of two PCR systems targeting IS6110 and MPB64 for confirmation of diagnosis of tuberculous lymphadenitis, *J. Commun. Dis.* 38: 274-279.
- [12] Thierry, D., Cave, M.D., Eisenach, K.D., Crawford, J.T., Bates, J.H., Gicquel, B. and Guesdon, J.L., 1990, IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Nucl. Acids Res.* 18(1): 188.
- [13] Das, N., Mendiratta, D., Narang, R., Thamke, D. and Narang, P., 2016, Suitability of IS6110 based polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum of new pulmonary tuberculosis cases, *J. Mahatma Gandhi Inst. Med. Sci.* 21: 35-39.
- [14] Lee, H.S., Park, K.U., Park, J.O., Chang, H.E., Song, J. and Choe, G., 2011, Rapid, sensitive, and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by real-time PCR on paraffin-embedded human tissues, *J. Mol. Diagn.* 13: 390-394.
- [15] Thakur, R., Sarma, S. and Goyal, R., 2011, Comparison of DNA extraction protocols for *Mycobacterium tuberculosis* in diagnosis of tuberculous meningitis by real-time polymerase chain reaction, *J. Glob. Infect Dis.* 3: 353-356.
- [16] Rao, X., Lai, D. and Huang, X., 2013, A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis, *J. Comput. Biol.* 20: 703-711.

- [17] Wilhelm, J. and Pingoud, A., 2003, Real-time polymerase chain reaction, *ChemBioChem* 4: 1120-1128.
- [18] Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C.N.Jr., 2006, Statistical analysis of real-time PCR data, *BMC Bioinform.* 7: 85.
- [19] Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J. and Moorman, A.F.M., 2009, Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 37: e45.
- [20] Landis, J.R. and Koch, G.G., 1977, The measurement of observer agreement for categorical data, *Biometrics* 33: 159-174.
- [21] Eisenach, K.D., Cave, M.D., Bates, J.H. and Crawford, J.T., 1990, Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Infect. Dis.* 161: 977-981.
- [22] Gilbert, M.T., Haselkorn, T., Bunce, M., Sanchez, J.J., Lucas, S.B., Jewell, L.D., Marck, E.V. and Worobey, M., 2007, The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?, *PLoS ONE* 2: e537.
- [23] Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E.E., Jung, M., Meller, S. and Kristiansen, G., 2013, Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition, *PLoS ONE* 8: e77771.
- [24] Ludyga, N., Grünwald, B., Azimzadeh, O., Englert, S., Höfler, H., Tapio, S. and Aubele, M., 2012, Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses, *Virchows Archiv* 460: 131-140.
- [25] Bastien, P., Procop, G.W. and Reischl, U., 2008, Quantitative real-time PCR is not more sensitive than conventional PCR, *J. Clin. Microbiol.* 46: 1897-1900.