P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 6 (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2565) หน้า [98-111]

ประสิทธิภาพของวิธี Multiplex Real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit ในการตรวจวิเคราะห์หา *Mycobacterium tuberculosis* complex จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ

Performance of Multiplex Real-time PCR and abTES™ MTB qPCR Kit for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Formalin-fixed, Paraffin Embedded Tissue

ศิริรัตน์ สีขุนทด[1,*], ภานินี ถาวรังกูร[2]
[1]*สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 กรมควบคุมโรค นครราชสีมา 30000*
[2]*สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กรุงเทพมหานคร 10400*
Sirirat Seekhuntod[1,*], Paninee Thavarungul[2]
[1]*The Office of Disease Prevention and Control 9, Department of disease control Nakhon Ratchasima 30000*
[2]*Institute of Pathology, Department of Medical Services Bangkok 10400*
Received 30 September 2022; Received in revised 8 December 2022; Accpted 20 December 2022

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย มีสาเหตุจากการติดเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* complex (MTBC) การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยทั่วไปใช้วิธี C-PCR ซึ่งมีความซับซ้อน และใช้เวลานาน ไม่เหมาะสมในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจแบบ Multiplex real-time PCR (M-real-time PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจงมากกว่า 1 ชนิดยีนในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ ด้วยวิธี M-real-time PCR แล้วเปรียบเทียบผลการตรวจกับชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit ใช้ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ที่ส่งตรวจมายังสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ จำนวน 213 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอจากบล็อกชิ้นเนื้อ ดำเนินการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit และวิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ผลการศึกษาพบว่าวิธี M-real-time PCR มีความไวมากกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit โดยพบ 62 ตัวอย่าง (ร้อยละ 29.11) ให้ผลบวกโดยวิธี M-real-time PCR และ 59 ตัวอย่าง (ร้อยละ 27.70) ให้ผลบวกโดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit ผลการเปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธีโดยการวิเคราะห์ค่า Kappa พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกันยอมรับได้ระดับดีมาก (K=0.965, 95% CI 0.927-

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** sirirat.seekhuntod@gmail.com **doi:**

1.000) และวิธี M-real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อ MTBC ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 5 ng/µl ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น มีต้นทุนที่ต่ำกว่าเพียง 350.-บาท ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยสรุปวิธี M-real-time PCR มีความไวสูง มีประสิทธิภาพมากกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit และมีราคาต้นทุนต่ำ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ MTBC ในตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อได้ในหลอดเดียว สามารถช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วยิ่งขึ้น ลดการแพร่เชื้อวัณโรคสู่ชุมชนได้

คำสำคัญ: วัณโรค; บล็อกชิ้นเนื้อ; วิธีมัลติเพล็กซ์เรียลไทม์พีซีอาร์

Abstract

Tuberculosis (TB) is a common infectious disease and a serious public health problem in Thailand. The causative agents of TB are a group of closely related bacteria known as the *M. tuberculosis* complex (MTBC). Nevertheless, MTBC detection using the conventional polymerase chain reaction (C-PCR) assay is complicated, time-consuming, and thus unsuitable for mass screening. A faster multiplex real-time PCR (M-real-time PCR) assay has been developed to help us overcome these problems. The present study aimed to establish the M-real-time PCR assay for MTBC detection in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues that showed histomorphology suspected of tuberculous infection and compare the results with that of the abTES™ MTB qPCR Kit assay. Two hundred and thirteen FFPE tissue samples were collected from the Department of Medical Services, Institute of Pathology. DNA was extracted, and MTBC assays were performed using the abTES™ MTB qPCR kit and the developed M-real-time-PCR method. The results showed that M-real-time-PCR was more sensitive for detecting *M. tuberculosis* complex than abTES™ MTB qPCR kit. 62 samples (29.11%) were positive for TB-DNA by M-real-time-PCR, and 59 samples (27.70%) were positive for TB-DNA by abTES™ MTB qPCR kit. The comparison between these two methods by kappa analysis showed an excellent agreement (K=0.965, 95% CI 0.927-1.000). The M-real-time PCR assay for detection MTBC at the minimum DNA concentration of 5 ng/µl. In addition, the M-Real-time PCR assay used only 2 hours and a lower cost of 350 baht per 1 sample. In conclusion, M-real-time-PCR is a high-sensitivity, simple, and faster method for detecting *M. tuberculosis* complex infection in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue.

Keywords: Tuberculosis; Formalin-fixed; Paraffin embedded tissue; Multiplex real-time PCR

1. บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อร้ายแรง ติด 1 ใน 10 ของสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก พบผู้ป่วยทั่วโลก ประมาณการสูงถึง 10 ล้านคนต่อปี [1] ซึ่งมีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) เป็นสาเหตุ องค์การอนามัยโลกรายงานว่าสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทยในปี ค.ศ. 2019 มีอุบัติการณ์คิดเป็นอัตรา 105 ต่อจำนวนประชากร 100,000 คน [2] วัณโรคจึงมีผลกระทบและเป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบสาธารณสุขในประเทศไทยเป็นอย่างมาก การวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสี Ziehl-Neelsen (AFB) และการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture), Ziehl-Neelsen เป็นวิธีที่ประหยัด ง่ายต่อการปฏิบัติ แต่ขาดความไว (40-60%) [3] นอกจากนี้ยังไม่สามารถที่แยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มไมโคแบคทีเรียได้ [3] วิธีการเพาะเชื้อ (Culture) เป็นวิธีมาตรฐานแต่ต้องใช้ระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ [4] ซึ่งการใช้ระยะเวลายาวนานนั้นอาจทำให้ผู้ป่วยแพร่เชื้อไปสู่ชุมชนได้ง่าย ดังนั้นการนำเทคนิควิธีการตรวจใหม่ๆ โดยการตรวจระดับสารพันธุกรรมของเชื้อโดยอาศัยหลักการทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-time PCR และ nucleic acid sequence based amplification (NASBA) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค พบว่ามีศักยภาพในการทดสอบสูง เชื่อถือได้และรวดเร็ว [4] นอกจากนั้นเทคนิค PCR ยังสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* ได้อีกด้วย [5] และการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยนั้นใช้เวลาเพียง 4-5 ชั่วโมงเท่านั้น จะช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วยิ่งขึ้น [6] แต่อย่างไรก็ตามวิธี C-PCR ยังมีความซับซ้อน และใช้เวลานาน ไม่เหมาะสมในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก และวิธี C-PCR ยังต้องผ่านกระบวนการ gel electrophoresis ซึ่งอาจทำให้ผู้ปฏิบัติงานต้องสัมผัสกับสารก่อมะเร็งได้ เทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นเป็นเทคนิค Real-time PCR โดยเทคนิคนี้ไม่ต้องผ่านกระบวนการ gel electrophoresis และให้สามารถทราบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเกิดปฏิกิริยาได้อีกด้วย [7, 8] โดยตำแหน่งยีน IS6110 เป็นตำแหน่งที่ถูกใช้เป็นเครื่องมือที่น่าเชื่อถือ มี transposable element ที่เหมาะสม สามารถวินิจฉัย *M. tuberculosis* complex ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า IS6110 เป็นเป้าหมายที่ใช้ในการวินิจฉัย *M. tuberculosis* complex มากที่สุดในตัวอย่างทางคลินิก มีความไวและความจำเพาะสูง (92.4%, 98%) [4, 9-11] ตำแหน่งยีน *TBX-AS1* exon 9 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ thromboxane A ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นในชิ้นเนื้อทุกส่วนของร่างกาย เป็นตำแหน่งยีนที่น่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของชิ้นเนื้อได้ [12] นอกจากนี้ปัจจุบันมีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคโดยวิธีการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่ทางบริษัททางการค้าต่างๆ พัฒนาขึ้น ตัวอย่างชุดตรวจวัณโรคสำเร็จรูปเช่น ชุดตรวจ artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit (Qiagen, Hilden, German) สามารถตรวจ *M. tuberculosis* complex, *M. avium* subspecies และ *M. intracellulare* ได้ [13] ชุดตรวจ abTES™MTB qPCR I KIT (AITbiotech, Singapore) สามารถตรวจ *M. tuberculosis* complex ได้ [9] ชุดตรวจ Anyplex™MTB/NTM Real-time Detection (V2.0) (Seegene, South Korea) สามารถตรวจแยกกลุ่มเชื้อ Non-*tuberculosis mycobacteria* และเชื้อ *M. tuberculosis* complex ออกจากกันได้ [14] เป็นต้น แต่ประเด็นสำคัญชุดตรวจสำเร็จรูปเหล่านั้นต้องพึ่งเทคโนโลยีต่างประเทศ ซึ่งมีต้นทุนที่สูง อาจไม่เหมาะสมกับประเทศที่กำลังพัฒนา วิธี Multiplex real-time Polymerase Chain Reaction (M-real-time PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจงมากกว่า 1 ชนิดยีนหรือหลายตำแหน่งยีนในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว [15, 16] โดยโพรบที่จำเพาะจะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

เป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งที่ต้องการตรวจวัดได้ และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ทันที [17] โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ไม่จำเป็นต้องนำผลผลิตพีซีอาร์มาผ่านกระบวนการ gel electrophoresis อีก ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ได้ นอกจากนี้ผู้ปฏิบัติงานยังไม่ต้องสัมผัสกับสารก่อมะเร็งอีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งพัฒนาวิธี M-real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ และประเมินวิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ว่ามีความไวเทียบเท่าชุดตรวจวัณโรคสำเร็จรูปหรือไม่ เพื่อการวินิจฉัยวัณโรคได้เร็วยิ่งขึ้นลดการแพร่เชื้อวัณโรคสู่ชุมชนได้ และลดต้นทุนขององค์กร

2. วิธีการวิจัย

การพัฒนาวิธี M-real-time PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ในตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ และประเมินวิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวเทียบเท่าชุดตรวจวัณโรคสำเร็จรูปหรือไม่ โดยการศึกษาวิจัยนี้มีขอบเขตของการวิจัยคือการทดสอบจากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อจะไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อได้เพราะตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการ tissue processing ทำให้เชื้อวัณโรคอาจตายได้ส่งผลให้เพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ยังมี ดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคให้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ได้ และในการทดสอบปฏิกิริยาทุกครั้งจะดำเนินการควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่มีผลทางคลินิกและผลทางห้องปฏิบัติการแสดงผล Positive- MTBC ตรงกัน เป็น positive control

2.1 ตัวอย่างทางคลินิกบล็อกชิ้นเนื้อ (Formalin-fixed, paraffin embedded tissue)

ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ที่ส่งตรวจกับสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 213 ตัวอย่าง โดยทุกตัวอย่างถูกตรวจและประเมินลักษณะทางพยาธิวิทยา (histopathology) จากสไลด์ย้อมสี Hematoxylin และ Eosin และวงพื้นที่บริเวณรอยโรคโดยพยาธิแพทย์ การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เอกสารรับรองเลขที่ IOP-KM-R63-001

2.2 การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin บนตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ตัดตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อด้วยเครื่องไมโครโตม (Leica, United States) เป็นแผ่นบางๆ เป็นลักษณะริบบอน (ribbon) ให้มีความหนา 2-3 ไมโครเมตร ลงบนแผ่นสไลด์แก้ว อบแผ่นสไลด์แก้วด้วยความร้อน 65-70 °C นาน 30 นาที จากนั้นทำการ deparaffinization โดยการแช่ในสารละลายไซลีน จำนวน 3 โถ ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยการดึงน้ำออก ด้วยการแช่ใน 100% isopropyl alcohol จำนวน 2 โถ ครั้งละ 5 นาที และแช่ใน 95% isopropyl alcohol จำนวน 2 โถ ครั้งละ 5 นาที ต่อด้วยการล้างด้วยน้ำประปา โดยให้น้ำประปาไหลผ่าน นาน 10 นาที และล้างชิ้นเนื้อด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยการแช่ในสารละลาย 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 จากนั้นทำการ Counterstain ชิ้นเนื้อด้วยการแช่ในสารละลาย Eosin นาน 3 นาที ต่อด้วยกระบวนการ Dehydrate ด้วยการแช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย 95% isopropyl alcohol โดยการ Dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ และแช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย 100% isopropyl alcohol โดยการ Dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ ต่อด้วยกระบวนการ Clearing ด้วยการแช่ชิ้นเนื้อในสารละลายไซลีน โดยการ Dips จำนวน 10 ครั้ง จำนวน 2 รอบ และทำการ

mount โดยการปิดทับชิ้นเนื้อด้วย cover glass ด้วย mounting medium รอจนสไลด์แห้ง แล้วนำไปกำหนดพื้นที่บริเวณรอยโรค (granuloma, epithelioid cells, necrosis, caseous necrosis, langhans giant cells) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพยาธิแพทย์

2.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ

นำตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อมาตัดให้ชิ้นเนื้อหนา 10 ไมโครเมตร ลงแผ่นสไลด์แก้ว ขูดชิ้นเนื้อ (Microdissection) บริเวณรอยโรคที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรคด้วยเข็มปลอดเชื้อใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และละลายพาราฟินด้วยการเติมสารละลายไซลีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 10 นาที ต่อด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายไซลีนทิ้ง ต่อกระบวนการล้างด้วยการเติม 100% แอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 10 นาที และปั่นด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายแอลกอฮอล์ทิ้ง จากนั้นเปิดฝาหลอด microcentrifuge ให้แอลกอฮอล์ระเหยออกจนหมด จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากบล็อกชิ้นเนื้อโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, Germany) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ วัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป ปรับสารละลายดีเอ็นเอให้มีปริมาณความเข้มข้น 500 ng/µl และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -40 °C จนกว่าจะนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.4 การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit

การทำปฏิกิริยา Real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit (AITbiotech, Singapore) โดยชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน IS6110 ที่มีขนาด PCR product ขนาด 130 bp [4] ทำปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมดรวมสุทธิ 25 µl ประกอบด้วย 2X MTB master mix ปริมาตร 12.5 µl, MTB primer mix ปริมาตร 0.5 µl, 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 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอน 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 โดยทำการเก็บข้อมูลที่ขั้นตอน Annealing phase จะทำการตรวจวัดในช่องแสง FAM สำหรับการตรวจวัดเป้าหมายเชื้อ MTBC และตรวจวัดในช่องแสง Texas Red สำหรับการตรวจวัดเป้าหมาย Internal control ด้วยเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ ยี่ห้อ Bio-RAD รุ่น CFX96 วิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาแบบ qualitative detection โดยดูลักษณะ amplify curve เหนือเส้น threshold โดยมีเกณฑ์การแปลผลคือ กรณีช่องแสง FAM ค่า ct < 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลบวก (Positive-MTBC) ค่า ct ≥ 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลลบ (Negative-MTBC) และกรณีช่องแสง Texas Red ค่า ct < 35 ถือว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์ (Valid) ใช้ Positive-MTBC ของชุดตรวจสำเร็จรูป abTESTM MTB เป็น Positive control และใช้ steriled DW เป็น Negative control (Figure 1)

2.5 การตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ M. tuberculosis complex ด้วยวิธี M-Real-time PCR

การทำปฏิกิริยา M-real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex พัฒนาและปรับส่วนผสมให้ทำปฏิกิริยาใน 1 หลอดทดลองดังนี้ ปริมาตรรวมทั้งหมดสุทธิ 20 µl ประกอบด้วย 2X KAPA probe fast qPCR master mix ปริมาตร 10 µl, 10 µM Oligonucleotide primer IS6110-F, IS6110-R, TBXAS1-F, TBXAS1-R ปริมาตรอย่างละ 0.5 µl, 10 µM Oligonucleotide probe IS6110-P, TBXAS1-P ปริมาตรอย่างละ 0.5 µl, Nuclease-free water ปริมาตร 2 µl และ DNA template ความเข้มข้น 500 ng/µl ปริมาตร

5 µl ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอน Tag Activation ที่ 95 °C นาน 10 นาที ตามด้วย Amplification จำนวน 42 รอบ ที่ 95 °C นาน 45 วินาที, Annealing ที่ 63 °C นาน 45, Extension ที่ 72 °C นาน 45 วินาที โดยทำการเก็บข้อมูลที่ขั้นตอน Annealing phase จะทำการตรวจวัดในช่องแสง FAM สำหรับการตรวจวัดเป้าหมายเชื้อ MTBC และตรวจวัดในช่องแสง Texas Red สำหรับการตรวจวัดเป้าหมาย TBXAS1 exon 9 gene เพื่อวัดคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องเรียลไทม์พีซีอาร์ ยี่ห้อ Bio-RAD รุ่น CFX96 วิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาแบบ qualitative detection โดยดูลักษณะ amplify curve เหนือเส้น threshold โดยมีเกณฑ์การแปลผลคือกรณีช่องแสง FAM ค่า ct < 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลบวก (Positive-MTBC) ค่า ct ≥ 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลลบ (Negative-MTBC) และกรณีช่องแสง Texas Red ค่า ct < 38 ถือว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์ (Valid) ใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรค (Positive-MTBC) เป็น Positive control และใช้ steriled DW เป็น Negative control (Figure 2) รายละเอียดนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์และโพรบ (Table 1)

Table 1 Primers and Probes used in M-Real-time PCR for detection of M. tuberculosis complex in IS6110 and TBXAS1 genes.

Primer/Probe	Primer/Probe sequence	Primer/Probe	Gene target	Product length (bp)
IS6110-F	5'-CCT-GCG-AGC-GTA-GGC-GTC-GG- 3'	Primer	IS6110	123 bp
IS6110-R	5'-CTC-GTC-CAG-CGC-CGC-TTC-GG-3'	Primer		
IS6110-P	5'-FAM-TCA-CCT-ATG-TGT-CGA-CCT-GG-3'-BHQ-1	Probe		
TBXAS1-F	5'-GCC-CGA-CAT-TCT-GCA-AGT-CC- 3'	Primer	TBXAS1 exon 9	100 bp
TBXAS1-R	5'-GGT-GTT-GCC-GGG-AAG-GGT-T-3'	Primer		
TBXAS1-P	5'-Texas Red-CTC-CTC-TAC-TGG-GTG-CAA-GC-3'-BHQ-2	Probe		

2.6 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยวิธี M-Real-time PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรค (Positive-MTBC) ทำการปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นที่ 1200, 900, 500, 300, 200, 50, 25, 10 และ 5 ng/µl มาทำปฏิกิริยา M-real-time PCR โดยใช้ steriled DW เป็น Negative control โดยพิจารณาผลการทดสอบจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ ทั้ง 2 สัญญาณสี fluorescent คือช่องแสง FAM และช่องแสง Texas Red มี amplify curve โดยดูลักษณะ amplify curve เหนือเส้น threshold กรณีช่องแสง FAM ค่า ct < 40 ถือว่าปฏิกิริยาให้ผลบวก (Positive-MTBC) และกรณีช่องแสง Texas Red ค่า ct < 38 ถือว่าปฏิกิริยาสมบูรณ์ (Valid) (Figure 3)

2.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ด้วยวิธี M-real-time PCR ไม่ตรงกับผลของชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit มาทำการยืนยันด้วยการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ด้วยวิธี Direct sequencing โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทำปฏิกิริยา C-PCR เฉพาะหลอดเป้าหมายยีน IS6110 ตามวิธีของการศึกษาของ Sirirat และคณะ [9] โดยจะพบ

ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 123 bp และเตรียมตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวที่ความเข้มข้น 20 ng/µl ปริมาตร 20 µl และไพรเมอร์ IS6110-F ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing ที่บริษัท Bioneer Corporation, Daejeon, Republic ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IS6110 ของเชื้อ MTBC ใน GenBank เพื่อตรวจสอบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) [18]

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้วิเคราะห์และเปรียบเทียบผลคือใช้ค่า Kappa (K) เพื่อประเมินค่าการยอมรับและความสอดคล้องกัน (Agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี กรณีที่ค่า K = 0.0-0.4 คือ ค่าการไม่ยอมรับในความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี หากค่า K = 0.41-0.6 คือค่าการยอมรับได้ในระดับปานกลางในความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี หากค่า K = 0.81-1.0 คือค่าการยอมรับในความสอดคล้องกันเป็นอย่างดีมากของทั้ง 2 วิธี [19] และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วยประกอบด้วย อายุ เพศ ผลทางจุลพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค โดยใช้ chi-square test ในการทดสอบ และกำหนดใช้ค่า p-value ที่ 0.05 เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ โดยข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมอัตโนมัติ SPSS Statistics V.19

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยวิธี M-Real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit

ผลการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* complex จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อจำนวน 213 ตัวอย่างโดยวิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น และวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit พบว่าวิธี M-real-time PCR มีความไวสูงกว่า สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคใน 62 ตัวอย่าง (29.1%) และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคใน 59 ตัวอย่าง (27.7%) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันของเครื่องมือ ผลการเปรียบเทียบและทดสอบความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธีคือวิธี M-real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit (Table 4) พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลบวกเหมือนกัน 59 ตัวอย่าง (27.7%) ให้ผลลบเหมือนกัน 151 ตัวอย่าง (70.9%) และให้ผลไม่สอดคล้องกันคือวิธี M-real-time PCR ตรวจพบเชื้อวัณโรค แต่ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.4% และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า K=0.965 ที่ 95% CI มีค่าระหว่าง 0.927 – 1.000 ซึ่งมีค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันระดับดีมากของวิธีการตรวจทั้ง 2 วิธีดังกล่าว (Table 2)

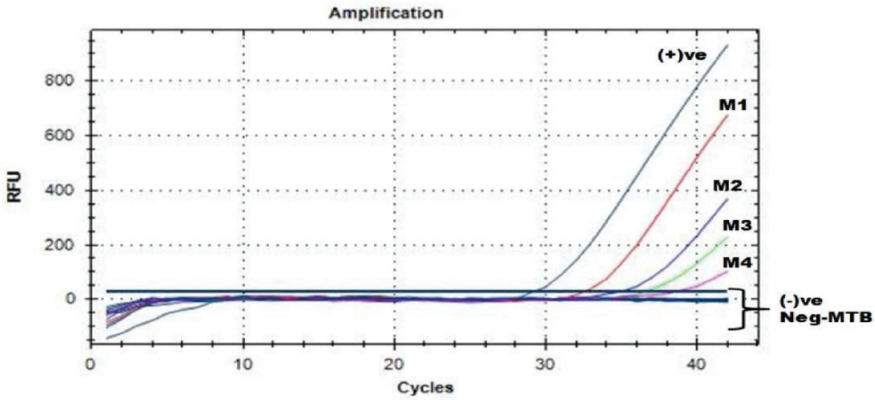

Figure 1 abTES™ MTB qPCR assay for detecting *M. tuberculosis* complex

The assay distinguished detection of *M. tuberculosis* complex using abTES™ MTB qPCR assay. M1, M2, M3 and M4: Samples were positive for TB-DNA; Neg-MTB: Samples were negative for TB-DNA; (+)ve: Positive control; (-)ve: Negative control.

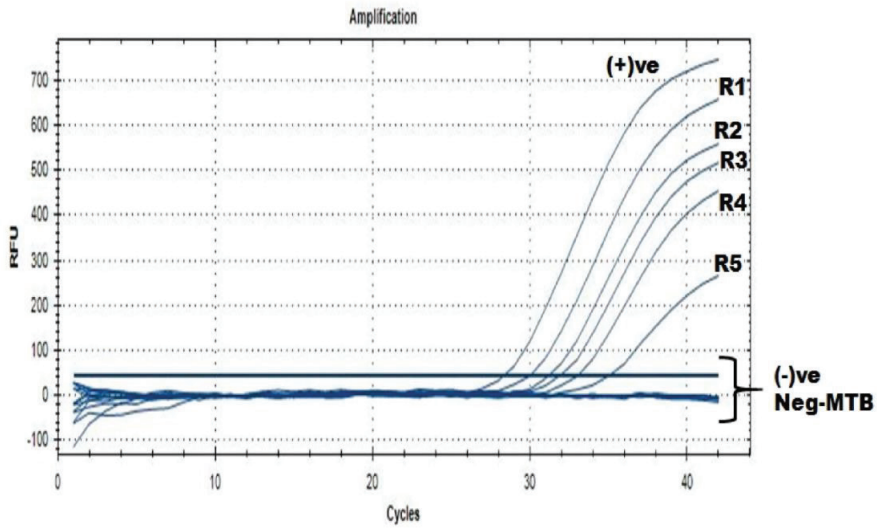

Figure 2 M-Real-time PCR assay for detecting *M. tuberculosis* complex

The assay distinguished detection of M. tuberculosis complex using M-Real-time PCR assay. R1, R2, R3, R4 and R5: Samples were positive for TB-DNA; Neg-MTB: Samples were negative for TB-DNA; (+)ve: positive control; (-)ve: negative control

Table 2 Pairwise comparison and agreement analyses between M-Real-time PCR and abTES™ MTB qPCR Kit.

		abTES™ MTB qPCR Kit		
		Positive (%)	Negative (%)	Total (%)
M-Real-time PCR	Positive (%)	59 (27.7%)	3 (1.4%)	62 (29.1%)
	Negative (%)	0	151 (70.9%)	151 (70.9%)
	Total (%)	59 (27.7%)	154 (72.3%)	213 (100.00%)
Kappa= 0.965				
95% confidence interval: From 0.927 to 1.000				

3.2 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ด้วยวิธี M-Real-time PCR

ผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* complex พร้อมทั้งการวัดคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยวิธี M-real-time PCR คือที่ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 ng/µl และพบว่าดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่ควรมากกว่า 900 ng/µl (Figure 3)

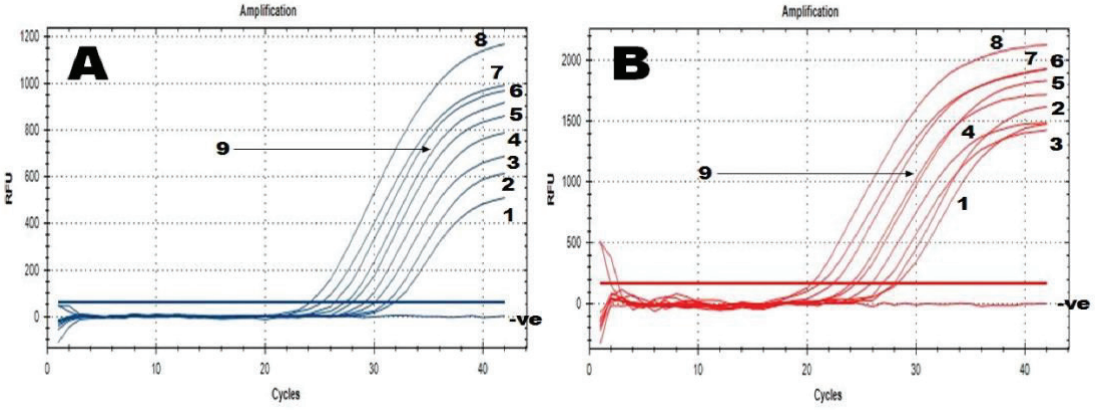

Figure 3 Minimum of DNA concentration using M-Real-time PCR assay for detecting *M. tuberculosis* complex

A amplification curve is shown. Dilutions of *M. tuberculosis* complex DNA (from 1200, 900, 500, 300, 200, 50, 25, 10 and 5 ng/µl) 3A: (IS6110 target); 3B: (TBXAS1 target); -ve: Negative control; Number 1-9: corresponded to Amplification from 5 ng/µl to 1200 ng/µl

4. วิจารณ์ผลการวิจัย

วัณโรค (Tuberculosis:TB) เป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบสาธารณสุขในประเทศไทยเป็นอย่างมาก เกิดจากการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC คือวิธีการเพาะเชื้อ (Culture) แต่ต้องใช้ระยะเวลานานถึง 8 สัปดาห์ [3, 4] ซึ่งการใช้ระยะเวลายาวนานนั้นอาจทำให้ผู้ป่วยแพร่เชื้อไปสู่ชุมชนได้ง่าย ปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคก้าวหน้าไปมาก โดยมีการตรวจระดับสารพันธุกรรมของเชื้อโดยอาศัยหลักการทางอณูชีววิทยา Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจง พบว่ามีศักยภาพในการทดสอบสูง เชื่อถือได้และรวดเร็ว [4] ยังสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* ได้อีกด้วย ใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยนั้นใช้เวลาเพียง 4-5 ชั่วโมงเท่านั้น [5] การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค PCR โดยห้องปฏิบัติการเอง (In-house PCR) นั้นส่วนใหญ่เลือกใช้ตำแหน่งยีน IS6110 เพราะเป็นตำแหน่งที่น่าเชื่อถือ มี transposable element ที่เหมาะสม สามารถวินิจฉัย *M. tuberculosis* complex ได้ ใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจตัวอย่างทางคลินิกมากที่สุด มีความไวและความจำเพาะสูง (92.4%, 98%) [4, 9] เป็นยีนที่มีความคงตัวและมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ (conserved gene) [9-11] และใช้ยีน Beta-globin ในการวัดคุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างในการทำปฏิกิริยา C-PCR ในแต่ละครั้ง [9, 11] งานวิจัยของ Chantranuwat C. และคณะ [11] ใช้ตำแหน่งยีน IS6110 และยีน B-globin เช่นเดียวกันแต่ทำวิจัยกับตัวอย่างจาก Papanicolaou stained fine needle aspirated smears งานวิจัยของ Seekhuntod S. และคณะ [9] ประยุกต์ให้ยีน IS6110 ในการพัฒนา PCR ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน (FFPE) และได้เปรียบเทียบเทคนิคดังกล่าวกับชุดตรวจสำเร็จรูป 2 ชนิด พบว่าวิธี PCR ที่ใช้ยีน IS6110 นั้นมีความไวดีกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit และมีความไวเทียบเท่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit อีกด้วย [9] แต่ทั้ง 2 งานวิจัยที่กล่าวมานั้น ต้องทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 2 หลอดทดลอง โดยแยก 1 หลอดทดลองจำเพาะต่อยีน IS6110 สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC และอีก 1 หลอดทดลองจำเพาะต่อยีน B-globin สำหรับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอของตัวอย่างนั้นๆ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นพัฒนาวิธี Multiplex real-time Polymerase Chain Reaction (M-real-time PCR) ที่จะให้สามารถทำปฏิกิริยาใน 1 หลอดการทดลอง โดยหลักการของวิธี M-real-time PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจง มากกว่า 1 ชนิดยีน หรือหลายตำแหน่งยีน ในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยการศึกษาครั้งนี้จะไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ยืนยันได้เพราะตัวอย่างชิ้นเนื้อผ่านกระบวนการ tissue processing ทำให้เชื้อวัณโรคอาจตายได้ทำให้เพาะเชื้อไม่ขึ้น แต่ยังมีดีเอ็นเอของเชื้อให้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ต่อได้ และในการศึกษานี้การทำปฏิกิริยาทุกครั้งจะดำเนินการควบคุมบวก (positive control) โดยใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อวัณโรคเป็น positive control และควบคุมลบโดยใช้ steriled DW เป็น negative control ทุกครั้งในการทำปฏิกิริยา และใช้ผลการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี H&E stain เป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐานยืนยันผลอีกทางหนึ่ง ซึ่งลักษณะรอยโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่พบคือ necrosis/caseous necrosis/langhans giant cells วิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้เลือกการออกแบบไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน IS6110 มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 123 bp เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC โดยตำแหน่งที่ออกแบบให้ไพรเมอร์และโพรบไปจับอย่างเฉพาะเจาะจงกับยีน IS6110 นั้นสามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ MTB ที่แตกต่างกัน 11 สายพันธุ์ คือ *M. tuberculosis* [Clinical T2, H37Rv (TMCI02), H37Ra Goldman, Clinical TI,

Clinical T3, Clinical T4, Clinical T5, Clinical T6], *M. bovis* [TMC401, TMC4IO, BCG Glaxo (TMCI024)], *M. scrofulaceum* [TMC1315,41, TMC1309,42, LR121, 43] และ *M. simiae* (33) โดยวิธี M-real-time PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการศึกษาและมีผลอ้างอิงกับมาตรฐาน (culture) ที่เป็นที่ยอมรับ จากการศึกษาของ Chantranuwat และคณะ [11] อีกด้วย โดยการพัฒนาวิธี M-real-time PCR ในโครงการวิจัยนี้ เพื่อให้เป็นวิธีที่สามารถรองรับตัวอย่างจำนวนมากในอนาคตได้ และผู้ปฏิบัติยังปลอดภัยจากสารก่อมะเร็งอีกด้วย โดยวิธี M-real-time PCR จะสามารถทราบผลเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ [15-16] โดยจะทำการตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมหรือผลผลิตพีซีอาร์ในขณะทำปฏิกิริยานั้นๆ หลักการนี้คือการติดฉลากสารเรืองแสง เช่น SYBR Green I หรือโพรบที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน เข้ากับสารพันธุกรรมข้างต้น และไพรเมอร์ที่ตำแหน่งจำเพาะของยีน เพื่อแสดงปริมาณในขณะตรวจวิเคราะห์ได้ [15-17] วิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ ผู้วิจัยได้การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความไวของการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรค เทียบกับวิธี Real-time PCR คือชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ที่ผ่านการรับรองจากสถาบันรับรองความปลอดภัยของประเทศเยอรมันนี สามารถใช้วินิจฉัยทางการแพทย์ได้ ชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ที่จำเพาะกับยีน IS6110 ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 130 bp [5, 9] สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้ 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 ชุดตรวจนี้มีความไว 81.3% และความจำเพาะ 98.8% [9]

ผู้วิจัยประสบความสำเร็จสามารถพัฒนาวิธี M-real-time PCR โดยวิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC สามารถตรวจพบเชื้อ MTBC จำนวน 62 ตัวอย่าง (29.1%) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธี M-real-time PCR ถูกออกแบบให้ไพรเมอร์และโพรบจับกับยีน IS6110 ให้มีผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กเพียง 123 bp ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit จึงเหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มากกว่า เพราะการที่ออกแบบผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดใหญ่นั้นพบว่าไม่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวต้องผ่านกระบวนการ fixation ด้วยฟอร์มาลินเป็นเวลานาน เป็นผลให้คุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างเหล่านี้มีคุณภาพต่ำ และพบการแตกหักของดีเอ็นเอในอัตราสูง [20] รวมถึงดีเอ็นเออาจเกิดการ cross-linking ระหว่าง nucleic acid และโปรตีน ส่งผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ [20-21]

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธีคือวิธี M-real-time PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR Kit พบว่ามีค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันระดับดีมาก K = 0.965, 95% CI มีค่าระหว่าง 0.927 – 1.000 อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาใน 2 วิธีนี้ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ตรงกันจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.4% คือกรณีที่วิธี M-real-time PCR ตรวจพบเชื้อ MTBC แต่ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR kit ตรวจไม่พบเชื้อ MTBC โดยทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยวิธีชีวสารสนเทศ พบว่าจำนวน 2 ตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* strain 5005 (Accession number; CP049108.1) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และมีจำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกัน 100% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *M. tuberculosis* strain TCDC11 (Accession number; CP046728.2) ในฐานข้อมูล NCBI ยิ่งไปกว่านั้นวิธี M-real-time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ได้ที่ดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุด < 5 ng/µl และไม่ควรใช้ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น

มากกว่า 900 ng/µl ในการทำปฏิกิริยา M-real-time PCR เพราะผลการทดลองพบว่าเมื่อดีเอ็นเอมีความเข้มข้น 1200 ng/µl พบ amplification signal ขึ้นช้ากว่าดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 900 ng/µl ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงเกินไป อาจมีโอกาสเพิ่มสารยับยั้งปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ [21-22] ซึ่งอาจส่งผลต่อปฏิกิริยา M-real-time PCR ผิดพลาดได้ วิธี M-real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน สามารถรองรับตัวอย่างจำนวนมากได้ ผู้ปฏิบัติงานไม่ต้องสัมผัสสารก่อมะเร็ง มีต้นทุนที่ต่ำกว่าเพียง 350.-บาท ต่อ 1 ตัวอย่างเท่านั้น แต่ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR kit ที่ต้องพึงเทคโนโลยีต่างประเทศต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงถึง 1,770.-บาท ต่อ 1 ตัวอย่าง

5. สรุปผลการวิจัย

โดยสรุปวิธี M-real-time PCR มีความไวสูง มีประสิทธิภาพมากกว่าชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR kit และมีราคาต้นทุนต่ำ สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* complex ในตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อได้ในหลอดปฏิกิริยาเดียว สามารถช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคที่รวดเร็วยิ่งขึ้น เพื่อลดการแพร่เชื้อวัณโรคสู่ชุมชนได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อจากสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ และได้งบประมาณจากกองทุนสนับสนุนวิจัยและวิชาการ กรมการแพทย์ ประจำปีงบประมาณ 2563

7. References

[1] Zaman K. Tuberculosis: a global health problem. J Health Popul Nutr. 2010;28(2):111-3.

[2] WHO. Global tuberculosis report 2019 [Internet]. WHO. World Health Organization; [cited 2022 Feb 15]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

[3] Inoue M, Tang WY, Wee SY, Barkham T. Audit and improve! Evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2011;30(1):131-5.

[4] Nakiyingi L, Kateete DP, Ocama P, Worodria W, Sempa JB, Asiimwe BB, et al. Evaluation of in-house PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. BMC Res Notes. 2012;5:487-98.

[5] Wang HY, Lu JJ, Chang CY, Chou WP, Hsieh JC. Development of a high sensitivity TaqMan-based PCR assay for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in both pulmonary and extrapulmonary specimens. 2019;9(1):113-9.

[6] Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, Wolffs PF. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures. Journal of clinical microbiology. 2010;48(12):4432-8.

[7] Lee HS, Park KU, Park JO, Chang HE, Song J, Choe G. Rapid, sensitive, and specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR on paraf-

fin-embedded human tissues. J Mol Diagn. 2011;13(4):390-4.

[8] Thakur R, Sarma S, Goyal R. Comparison of DNA Extraction Protocols for Mycobacterium Tuberculosis in Diagnosis of Tuberculous Meningitis by Real-time Polymerase Chain Reaction. J Glob Infect Dis. 2011;3(4):353-6.

[9] Sirirat Seekhuntod, Paninee Thavarungkul. Detection of M. tuberculosis complex detection in formalin-fixed, paraffin embedded tissue by Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. Archives of Allied Health Sciences 2021; 33(3):1-8

[10] Singh HB, Singh P, Jadaun GP, Srivastava K, Sharma VD, Chauhan DS, et al. Simultaneous use of two PCR systems targeting IS6110 and MPB64 for confirmation of diagnosis of tuberculous lymphadenitis. The Journal of communicable diseases. 2006;38(3):274-9.

[11] Chantranuwat C, Assanasen T, Shuangshoti S, Sampatanukul P. Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in papanicolaou-stained fine needle aspirated smears for diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health. 2006;37(5):940-7.

[12] Miyata A, Yokoyama C, Ihara H, Bandoh S, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (TBXAS1) encoding thromboxane synthase. Eur J Biochem. 1994 Sep 1;224(2):273-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00273.x. PMID: 7925341.

[13] Kohlmorgen B, Elias J, Schoen C. Improved performance of the artus Mycobacterium tuberculosis RG PCR kit in a low incidence setting: a retrospective monocentric study. Scientific reports. 2017;7(1):14127-38.

[14] Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory. Journal of clinical microbiology. 2014;52(5):1708-10.

[15] Gurvich OL, Skoblov M. Real-Time PCR and Multiplex Approaches. In: O'Driscoll L, editor. Gene Expression Profiling: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 1-13.

[16] Seekhuntod S, Thavarungkul P, Chaichanawongsaroj N. Validation of a Multiplex Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of KRAS Gene Mutations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues from Colorectal Cancer Patients. PloS one. 2016;11(1): e0147672.

[17] Rao X, Lai D, Huang X. A new method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. J Comput Biol. 2013;20(9):703-11.

[18] Blast. Necleotide blast [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 12]. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.

[19] Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med. 2005;37(5):360-3.

[20] Gilbert MT, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? PloS one. 2007; 2(6):e537.

[21] Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, et al. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. PloS one. 2013;8(10):e77771.

[22] Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, Englert S, Hofler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 2012;460(2): 131-40.