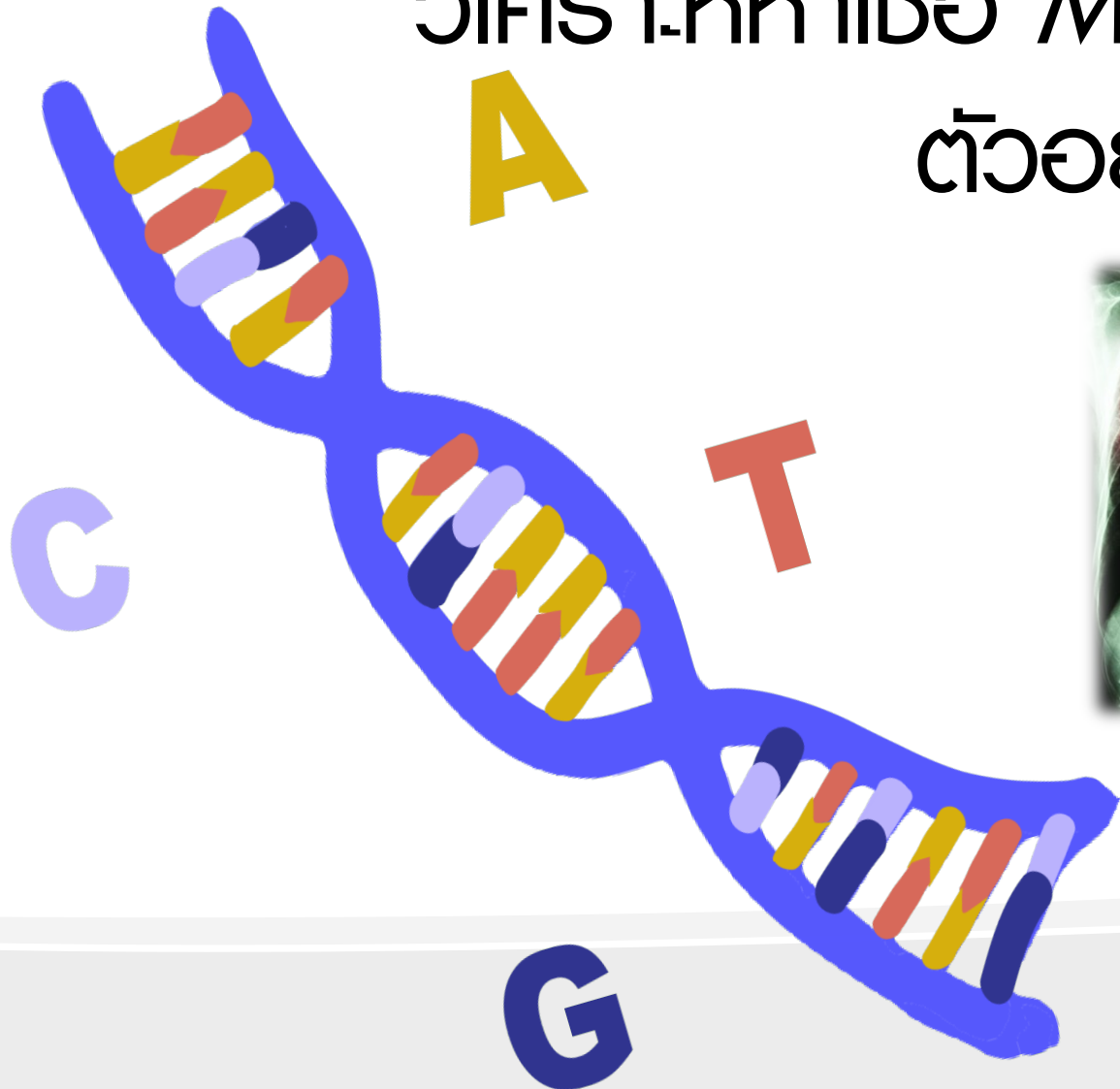


การพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR ตรวจ
วิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex จาก
ตัวอย่างบไลกชิ้นเนื้อ



น.ส.ศิริรัตน์ สียุนทด

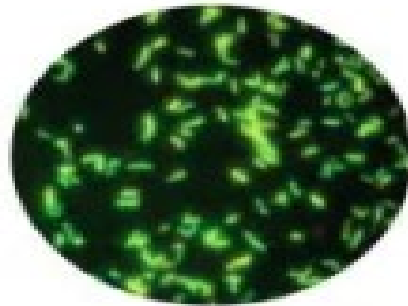
งานอนุพยาธิวิทยา กลุ่มงานชั้นสูงพิเศษ

ที่มาและความสำคัญ

Laboratory diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*



Acid-fast bacilli



Mycobacteria stained with Fluorescent stain



Mantoux tuberculin skin test

Laboratory Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection



M. Tuberculosis colonies in LJ medium



GeneXpert MTB/RIF Assay

RT-PCR

PCR-sequencing

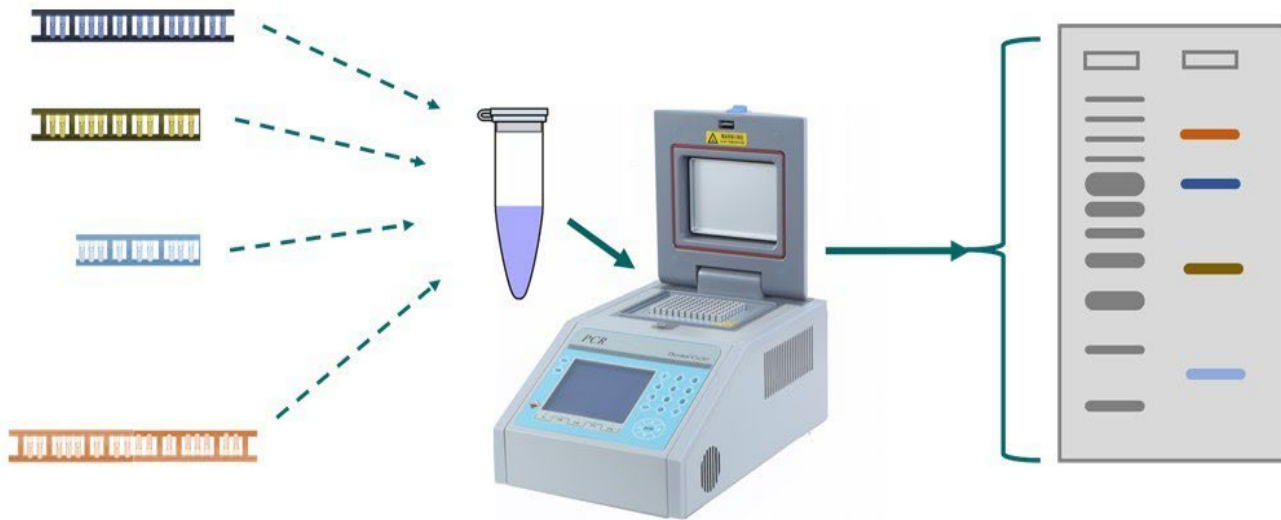


Molecular Biology Techniques

Multiplex PCR/Real-time PCR

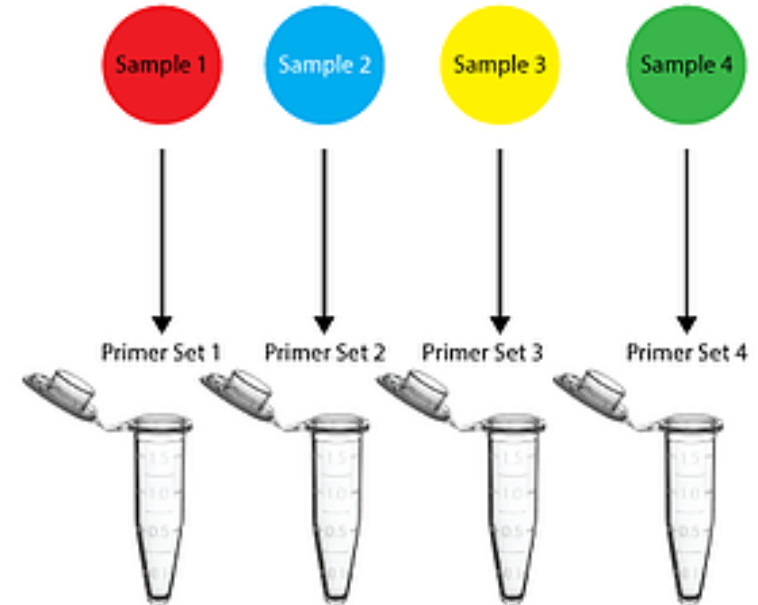


Multiplex PCR

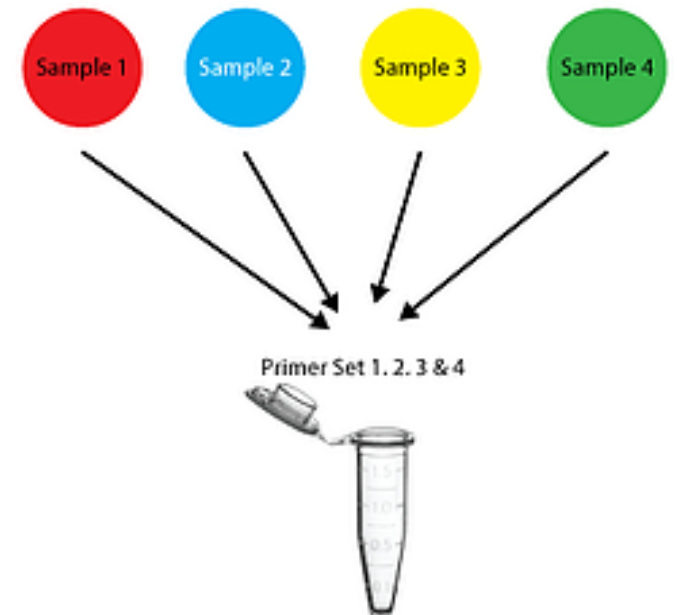


as if performing many separate PCR reactions all together in one reaction

Traditional PCR



Multiplex PCR

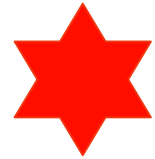




abTES™ MTB qPCR I Kit



ANALYTES	SPECIMENS
<p>abTES™ MTB qPCR I Kit</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB) • <u>Internal Control (IC)</u> 	<ul style="list-style-type: none"> • Sputum • Bronchial washing • Cultured cell • <u>Fresh tissue</u>



600-700 Baht / Run



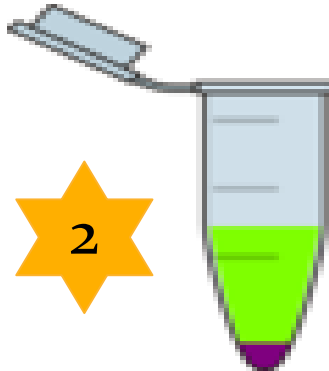
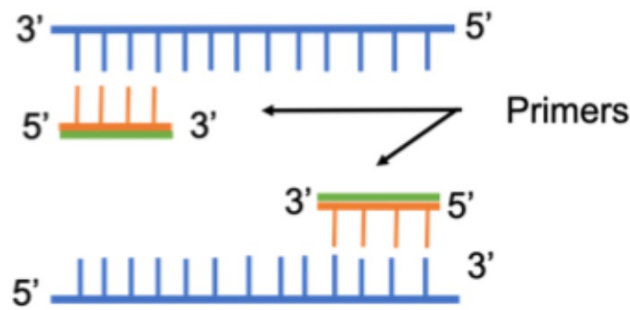
วัตถุประสงค์

- ❖ เพื่อพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ
- ❖ เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *M. tuberculosis* complex จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อ ด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น กับวิธี abTES™ MTB

ขั้นตอน/วิธีการทดลอง

Development

1



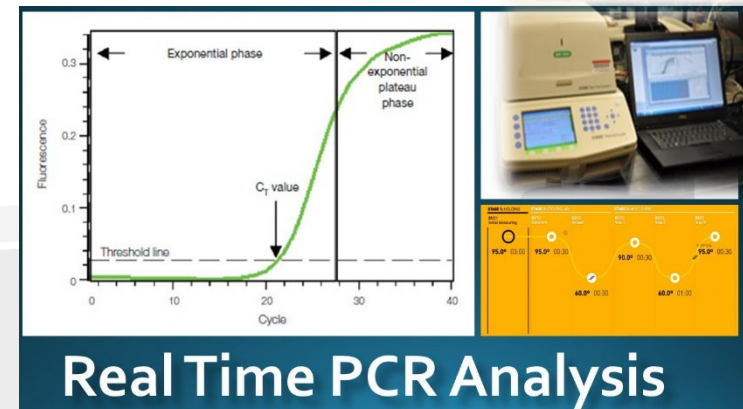
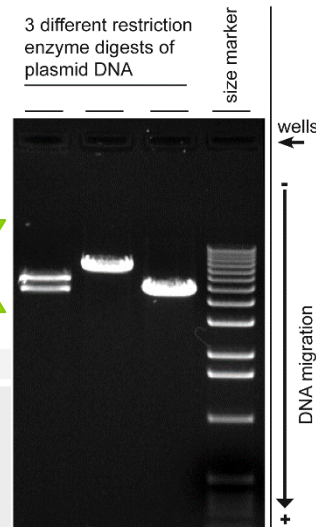
Develop; PCR conditions

- ❖ Primer/Probe conc.
- ❖ T_m
- ❖ MgCl₂, 10Xbuffer, dNTP
- ❖ Kappa Probe

2.2

Gene target	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		
B-globin-F	5'-ACA-CAA-CTG-TGT-TCA-CTA-GC-3'	Primer	B-globin	110 bp
B-globin-R	5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'	Primer		
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		

2.1



Real Time PCR Analysis

ขั้นตอน/วิธีการทดลอง

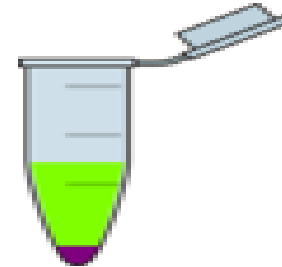
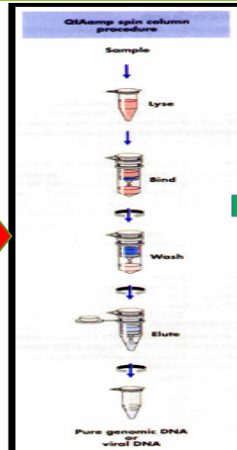
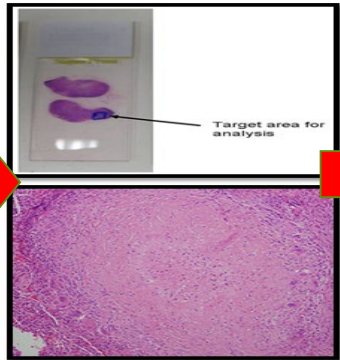
Comparision

abTES™ MTB

DNA Extraction

H&E staining
Microdissection

FFPE tissue

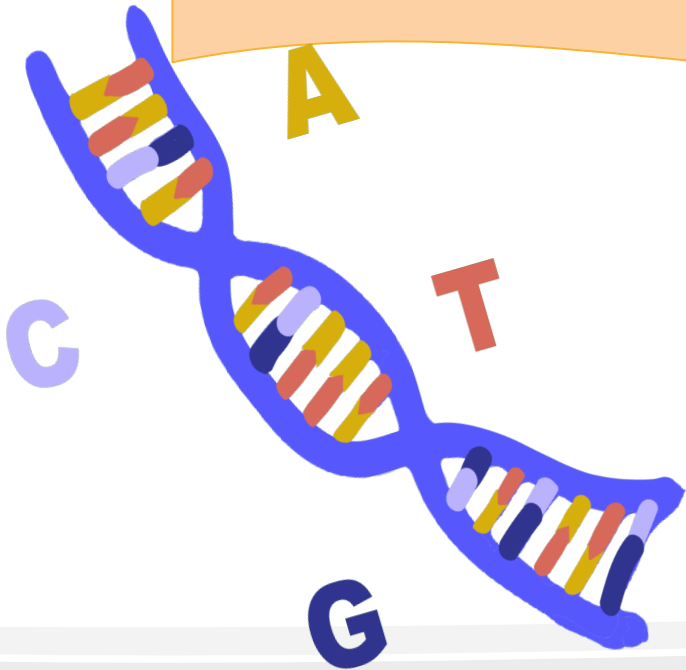


SS IOP™ MTB FFPE Kit

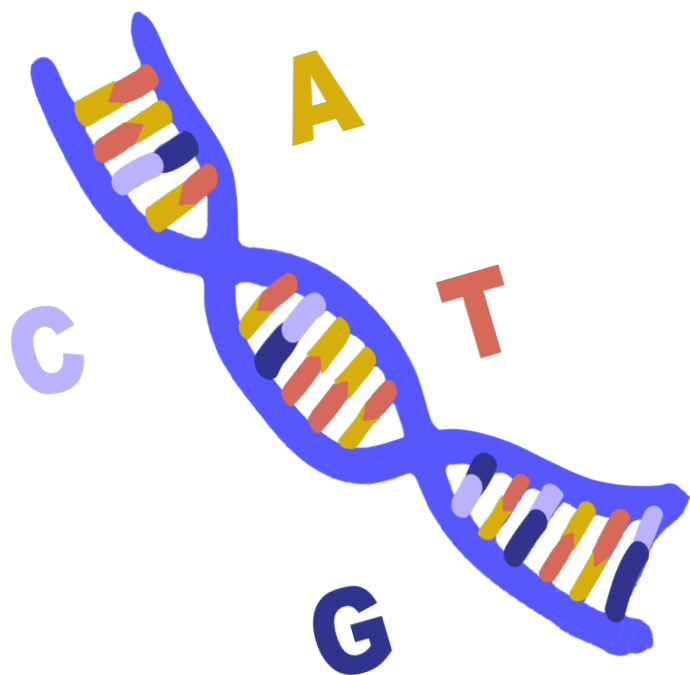
Kappa
Analysis



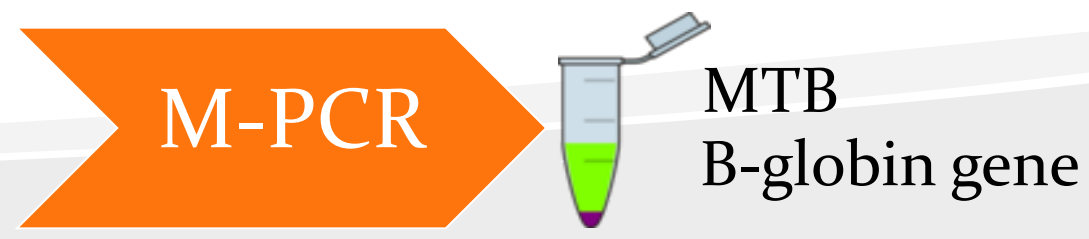
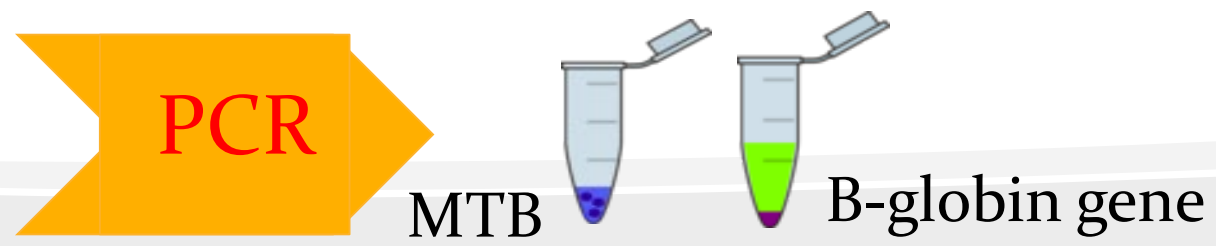
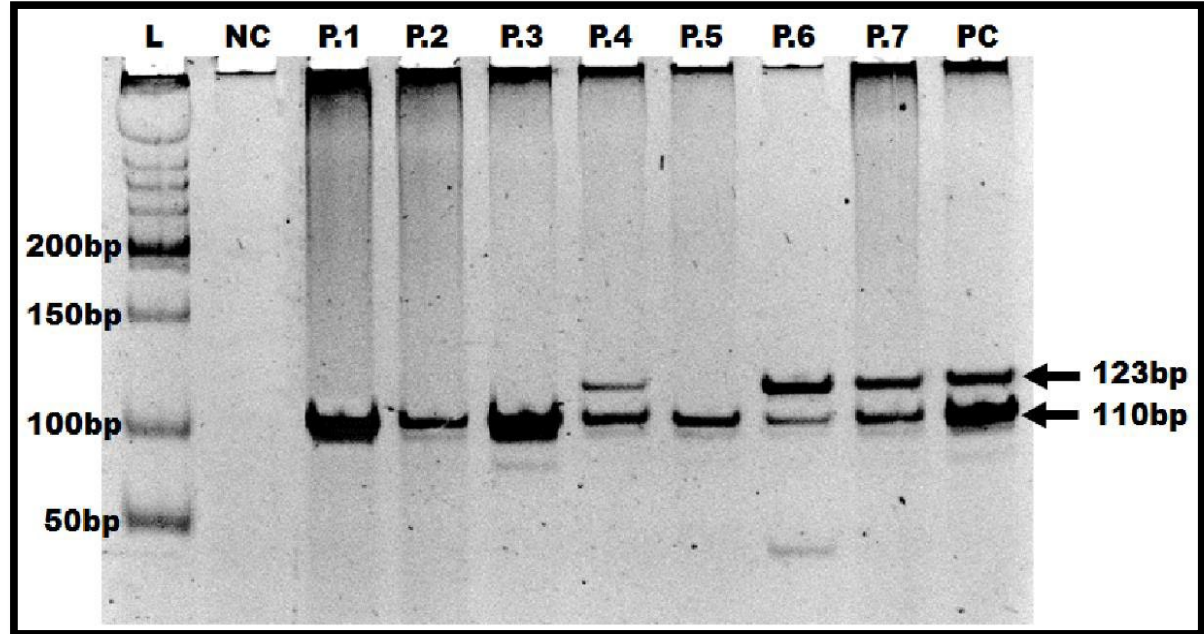
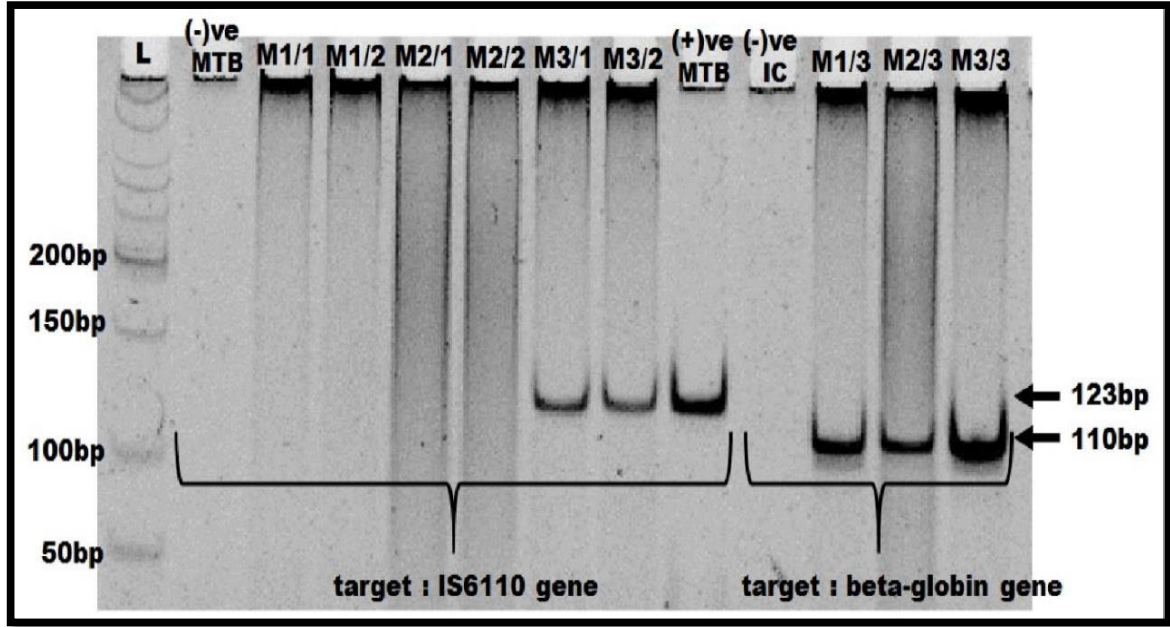
Result & Discussion



การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะพื้นฐานทั่วไป
ของผู้ป่วยจำนวน 213 ตัวอย่าง

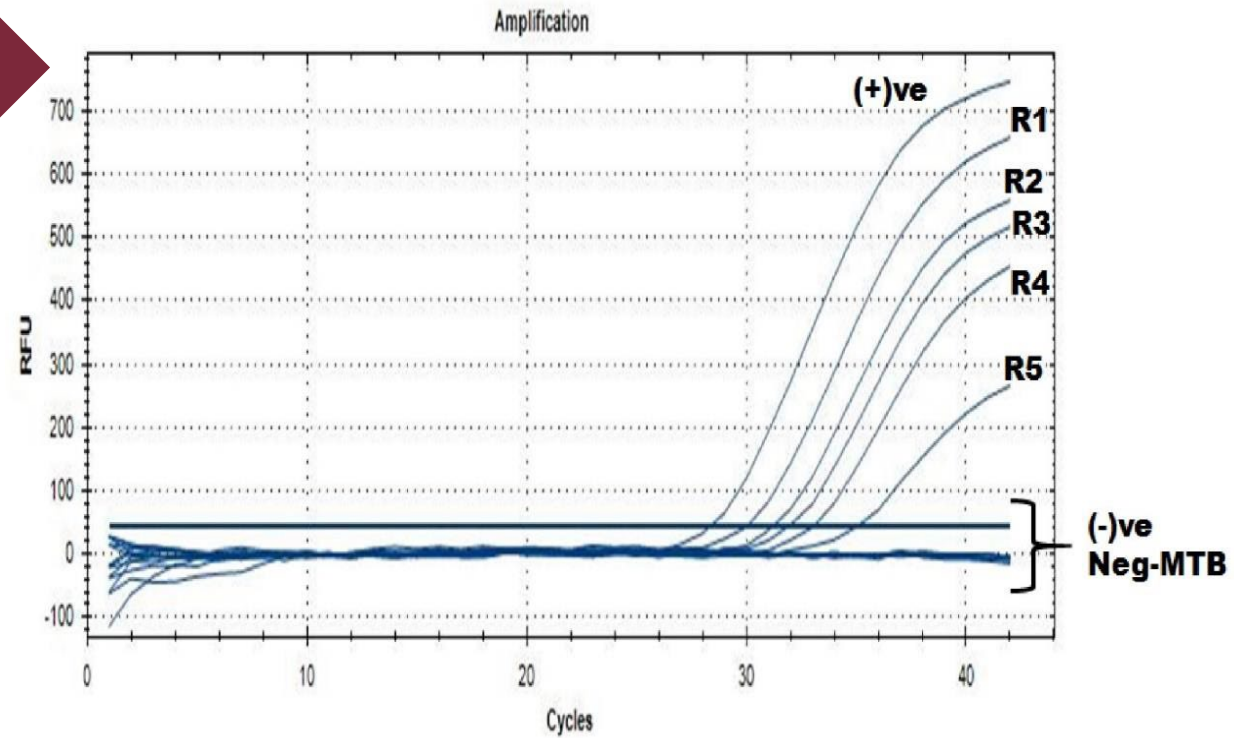
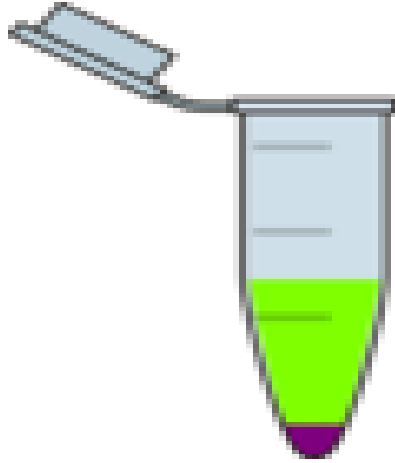


Characteristics	N (%)	Negative-TB N (%)	Positive-TB N (%)	p-value
Total patients	213			
Median age (range)	44			
<20 years	26 (12.2%)	18 (8.5%)	8 (3.8%)	0.775
20-39 years	64 (30.0%)	42 (19.7%)	22 (10.3%)	
40-59 years	62 (29.1%)	45 (21.1%)	17 (8.0%)	
60-79 years	55 (25.8%)	41 (19.2%)	14 (6.6%)	
80-99 years	6 (2.8%)	5 (2.3%)	1 (0.5%)	
Gender				
Male	108 (50.7%)	82 (38.5%)	26 (12.2%)	0.101
Female	105 (49.3%)	69 (32.4%)	36 (16.9%)	
Organs				
Lung	20 (9.4%)	13 (6.1%)	7 (3.3%)	0.263
Brain	2 (0.9%)	0	2 (0.9%)	
Peritoneum	38 (17.8%)	31 (14.6%)	7 (3.3%)	
Gallbladder	2 (0.9%)	2 (0.9%)	0	
Skin	19 (8.9%)	15 (7.0%)	4 (1.9%)	
Synovitis	3 (1.4%)	2 (0.9%)	1 (0.5%)	
Lymph node	86 (40.4%)	54 (25.4%)	32 (15.0%)	
Bone	15 (7.0%)	11 (5.2%)	4 (1.9%)	
Soft tissue	7 (3.3%)	6 (2.8%)	1 (0.5%)	
Breast	2 (0.9%)	2 (0.9%)	0	
Liver	2 (0.9%)	2 (0.9%)	0	
Oral cavity	6 (2.8%)	4 (1.9%)	2 (0.9%)	
Others	11 (5.2%)	9 (4.2%)	2 (0.9%)	
Histological classification				
no granulomatous	62 (29.1%)	57 (26.8%)	5 (2.3%)	0.0001
Chronic, Inflammation, Necrotic	79 (37.1%)	57 (26.8%)	22 (10.3%)	
Caseation, granuloma, Langhans giant cells	72 (33.8%)	37 (17.4%)	35 (16.4%)	



M-PCR

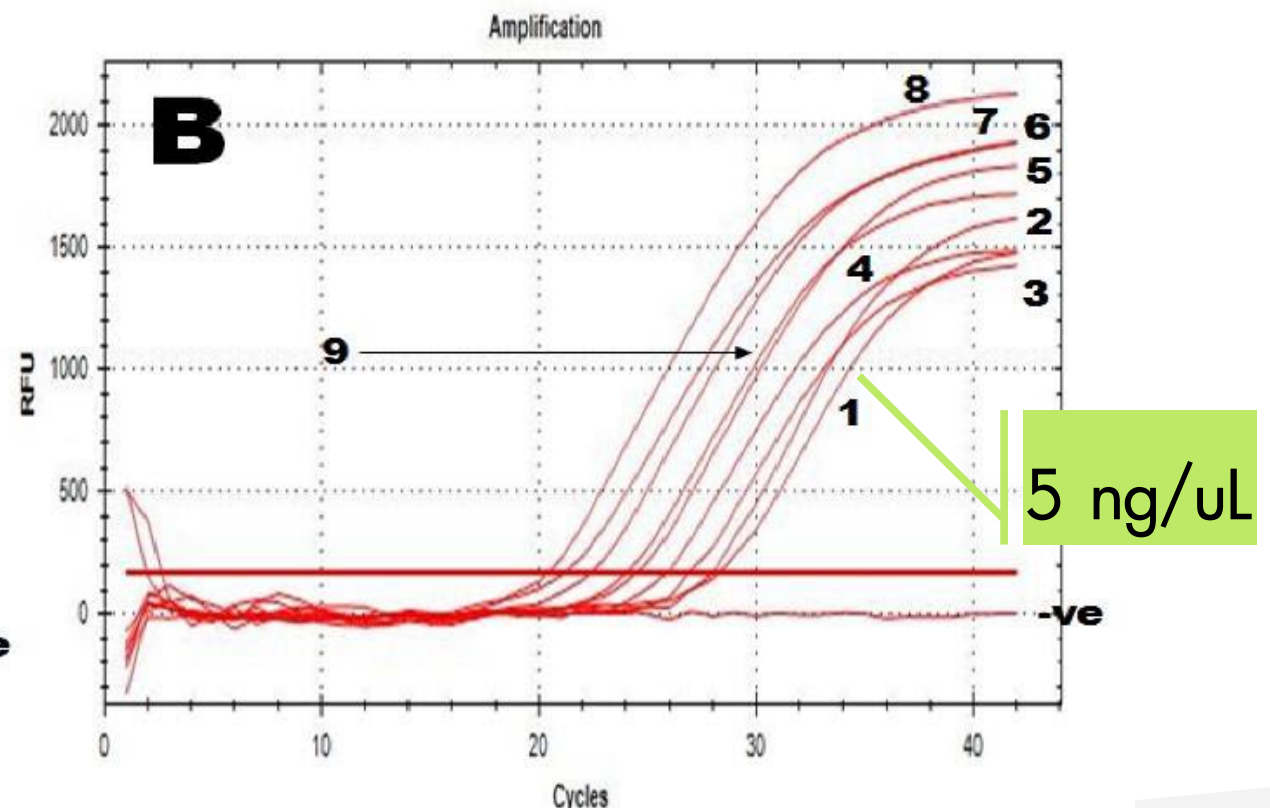
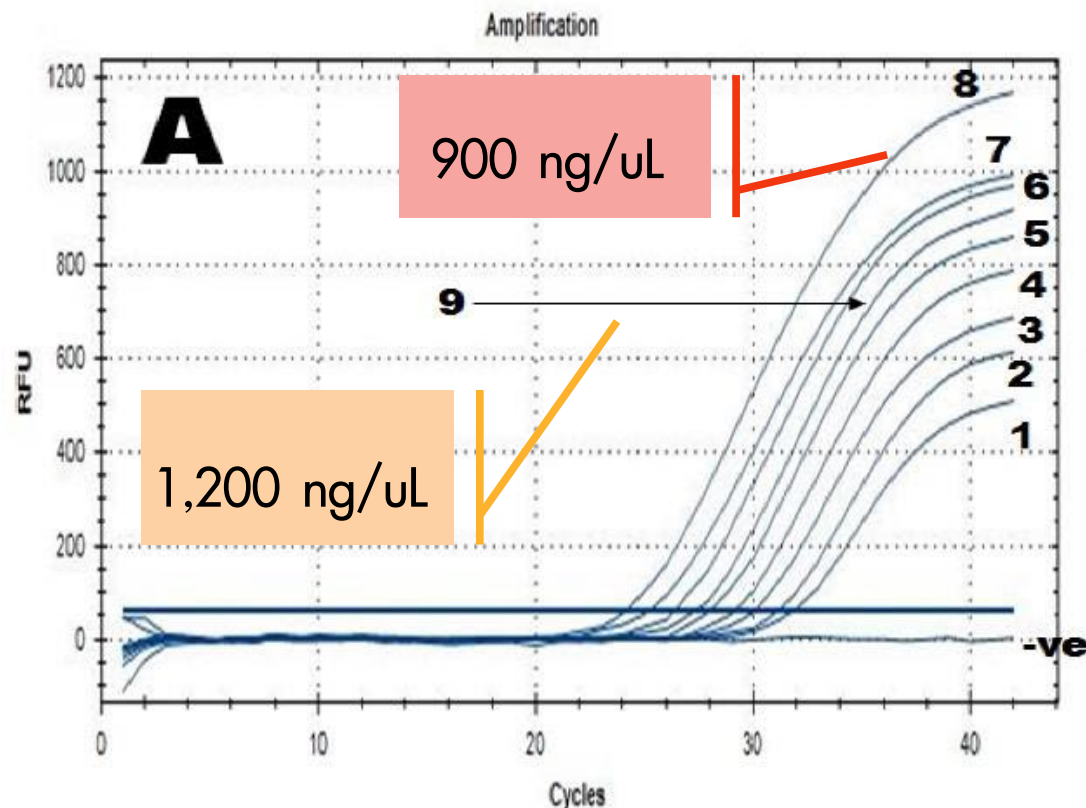
M-Realtime
PCR



Reagent	Volume (µL)
2X KAPA Probe fast qPCR	10 µL
Oligonucleotide primer (10 µM)	4 primer each: 0.5 µL
Probe (10 µM)	2 probe each: 0.5 µL
DW	2 µL
DNA template (500ng/µL)	5 µL



ทดสอบหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดในการตรวจหาเชื้อ
M. tuberculosis complex ด้วยวิธี M-Real-time PCR



ผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* complex พร้อมทั้งการวัดคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยวิธี M-Real-time PCR คือที่ดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 ng/uL และพบว่าดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสูงสุดไม่ควรมากกว่า 900 ng/uL (แสดงดังรูปที่ 8)

ผลการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ MTBC จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี SS IOP™ MTB FFPE Kit และวิธี abTES™ MTB qPCR I Kit

		abTES™ MTB		
		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



❖ K=0.965, 95% CI มีค่าระหว่าง 0.927 – 1.000

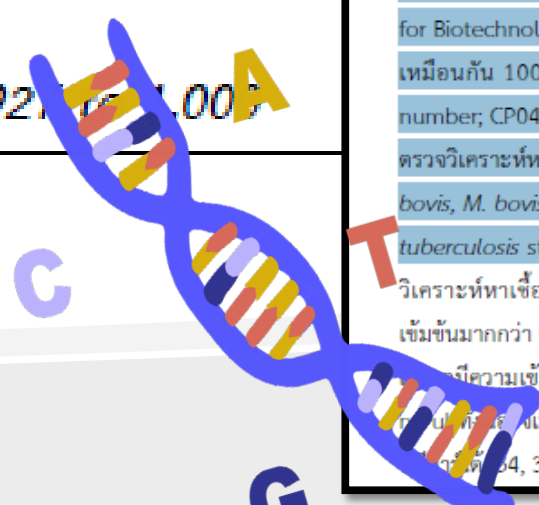
❖ 2 วิธีมีค่าการยอมรับและความสอดคล้องกันระดับดีมาก

ผลการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ MTBC จากตัวอย่างบล็อกชิ้นเนื้อของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี SS IOP™ MTB FFPE Kit และวิธี abTES™ MTB qPCR I Kit

		abTES™ MTB		
		Positive (%)	Negative (%)	Total (%)
M-Real-time-PCR	Positive (%)	59 (27.7%)	3 (1.4%)	62 (29.1%)
	Negative (%)			
	Total (%)	59 (27.7%)	3 (1.4%)	62 (29.1%)

Kappa= 0.965
95% confidence interval: From 0.921 to 1.005

ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB 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 ซึ่งวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB นั้นสามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้เพียง 6 สายพันธุ์ คือ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti* และ *M. pinnipedii* เท่านั้นไม่ครอบคลุมถึงสายพันธุ์ *M. tuberculosis* strain 5005 และ strain TCDC11 ยิ่งไปกว่านั้นวิธี M-Real-time PCR สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ได้ที่ตีเอ็นเอความเข้มข้นต่ำสุด < 5 ng/ul และไม่ควรรใช้ตีเอ็นเอที่ความเข้มข้นมากกว่า 900 ng/ul ในการทำปฏิกิริยา M-Real-time PCR เพราะผลการทดลองพบว่าเมื่อตีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 1200 ng/ul พบ Amplification signal ขึ้นช้ากว่าตีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 900 ng/ul ที่จริงแล้วเป็นเพราะการที่ความเข้มข้นของตีเอ็นเอสูงเกินไป อาจมีโอกาสดึงสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR (เช่น 34, 36, 37) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยา M-Real-time PCR ผิดพลาดได้





Conclusion

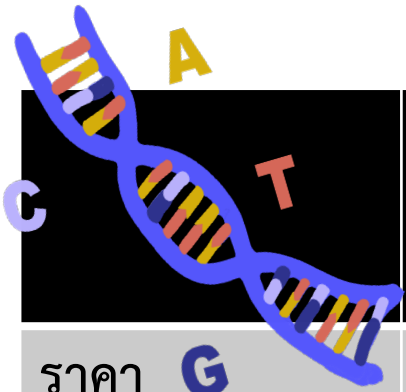
- ❖ Multiplex Real-time PCR assay can be used for the detection of *M. tuberculosis* complex in FFPE tissue, by performing the IS6110 gene and TBXAS₁ gene in a single tube.
- ❖ This method has a great potential to improve the clinicians' ability for early and rapid diagnosis of MTBC, thus ensuring early treatment and preventing further transmission of disease.
- ❖ Minimum concentration that can be used to detect the positivity for MTBC in the FFPE tissue is 5 ng/μl.

ราคาต้นทุน

Test	รายการ	abTES™ MTB qPCR Kit	SS IOPT™ MTB FFPE Kit
MTB qPCR Test	ราคา Reagent ต่อ 1 ตัวอย่าง	600-700 บาท	50-80 บาท
	ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ 1 ตัวอย่าง (ค่า DNA extraction/เครื่องมือ ในขั้นตอนอื่นๆ 500 บาท)	1,200	580
	ค่าบริการที่เรียกเก็บ	2,000 บาท	
	กำไรที่ได้ต่อ 1 ตัวอย่าง	800	1,420

****หมายเหตุ การคำนวณไม่รวม +ve และ -ve**

ข้อดี-ข้อเสีย



abTES™ MTB qPCR Kit

SS IOP™ MTB FFPE Kit

ราคา

600-700 บาท

50-80 บาท

Sensitivity/
Specificity

Specificity 100%
Sensitivity 100 copies/reaction


บอกไม่ได้เพราะไม่ได้เทียบกับ Culture เพราะ
FFPE tissue มีแต่ DNA ของเชื้อ ไม่มีเชื้อเป็น
ไม่สามารถเพราะเชื้อได้

ข้อจำกัด kit

ไม่มีข้อแนะนำให้ใช้ใน FFPE tissue

สามารถใช้กับ FFPE tissue และมี TBXAS1
gene ที่สามารถบอก Quality DNA ที่แท้จริงได้

Acknowledgements



กลุ่มงานงบประมาณ กองบริหารการคลัง
กรมการแพทย์
รับที่ 5130
วันที่ 15 พ.ย. 2562
เวลา 11-50น.

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข
ทางการแพทย์ กรมการแพทย์
รับที่ MSO
วันที่ 11-11-62
เวลา 11-50น.

กองบริหารการคลัง
กรมการแพทย์
รับที่ 18 108
วันที่ 14 พ.ย. 2562
เวลา 14.50

ส่วนราชการ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ โทร. ๐ ๒๓๕๔ ๘๒๐๘ โทรสาร ๐ ๒๓๕๔ ๘๒๐๐
ที่ สธ ๐๓๑๕/๓๒๑๑ วันที่ ๑๕ พฤศจิกายน ๒๕๖๒

เรื่อง ขออนุมัติดำเนินการโครงการวิจัย "การพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ
M. tuberculosis complex จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

เรียน อธิบดีกรมการแพทย์ (ผ่านกองบริหารการคลัง กรมการแพทย์)

ตามหนังสือ กองวิชาการแพทย์ กรมการแพทย์ ที่ สธ ๐๓๐๕/๑๑๗๗๗ ลงวันที่ ๖ พฤศจิกายน ๒๕๖๒ เรื่อง ขอแจ้งผลการอนุมัติค่าใช้จ่ายโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนวิชาการ กรมการแพทย์ โดยสถาบันพยาธิวิทยาได้รับการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนงานวิชาการ จำนวน ๑ โครงการวิจัย นั้น

ในการนี้ สถาบันพยาธิวิทยา ขออนุมัติดำเนินการโครงการวิจัย "การพัฒนาวิธี Multiplex Real-time PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน" ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๓ วงเงิน ๓๕๐,๐๐๐ บาท

พร้อมหนังสือนี้

การดำเนินการอนุมัติด้วย จะเป็นพระคุณ

กลุ่มงานวิจัยทางการแพทย์
รับที่ 793
วันที่ 6 ธ.ค. 62
เวลา 10:00 น.

(นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด)
หัวหน้าโครงการ
ผู้รับผิดชอบโครงการ

(นายทรงคุณ วิญญูวรรณ)
รองผู้อำนวยการด้านการแพทย์
ผู้เสนอโครงการ

(นางภัทรา อังสุวรรณ)
ผู้อำนวยการสถาบันพยาธิวิทยา
ผู้ขออนุมัติโครงการ

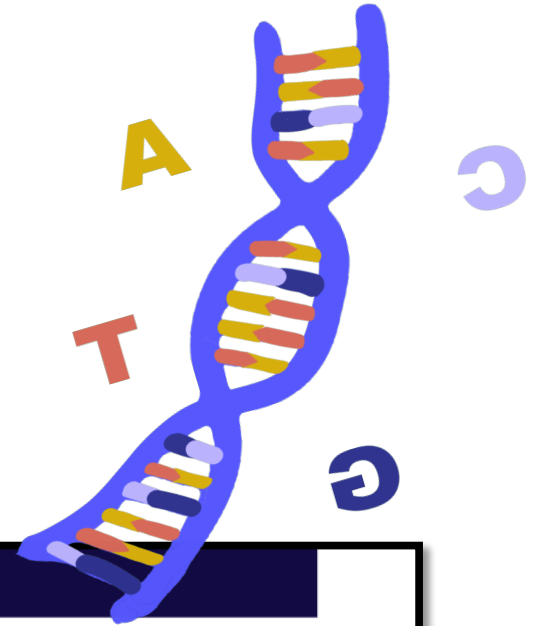
(นายณรงค์ อภิกุลวณิช)
รองอธิบดี ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมการแพทย์

(นางภัทรา อังสุวรรณ)
ผู้อำนวยการสถาบันพยาธิวิทยา

สำนักงานเลขานุการกรม
กรมการแพทย์
1 ๐๐๐ ๐๐๐

- ❖ To thank the Department of Medical Services, Institute of Pathology, Ministry of Public Health for providing FFPE tissue specimens
- ❖ This research was financial support from the Academic Fund, Department of Medical Services.

Publication



Arch AHS
ARCHIVES OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Home Publication Ethics Submission Archives Current Announcements Editorial members Contact

Home / Archives / Vol. 33 No. 3 (2021): September - December (ahead of print)

Vol. 33 No. 3 (2021): September - December (ahead of print)

Published: 2021-08-09

ORIGINAL ARTICLE

Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay
Sirirat Seekhantod, Paninee Thavarungkul

Discriminative ability of the Spinal Cord Independence Measure III on levels of independence among ambulatory individuals with spinal cord injury
Narongsak Khamnon, Nisara Musika, Panumas Jitmongkolsri, Napaporn Kongngen, Manatsavee Haisirikul, Kittiyaporn Jaikarsen, Sunalva Amatachaya

Arch AHS
ARCHIVES OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Archives of Allied Health Sciences

Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

ARTICLE ONLINE FIRST

This provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon a published version.
A copyedited and fully printed version will be made available via this website soon.
<https://he01.tci-thaijo.org/index.php/ams/index>

Arch AHS 2021; 33(3): 00-00.

Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay

Sirirat Seekhantod^{1*}, Paninee Thavarungkul¹

¹ Institute of Pathology, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand.

การนำไปใช้ประโยชน์



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ...งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา โทร. ๒๓๓
ที่ ๑๓๗/๒๕๖๔ วันที่ ๑๕ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๔

เรื่อง ขออนุมัติในหลักการการถ่ายทอดและเผยแพร่งานวิจัย/นวัตกรรมแก่หน่วยงานภายนอก

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันพยาธิวิทยา (ผ่านรองผู้อำนวยการด้านการแพทย์)

เนื่องด้วยงานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ ได้มีการวิจัยพัฒนานวัตกรรม เรื่องการพัฒนาวิธี Multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* เนื่องจากวิธี Multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* ที่พัฒนาขึ้นนั้นสามารถตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* ได้จริงและมีความแม่นยำเชื่อถือได้

ในการนี้ทางห้องปฏิบัติการอณูพยาธิวิทยา ขออนุมัติในหลักการการดำเนินการดังกล่าว แก่หน่วยงานภายนอก

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และดำเนินการต่อไป จะเป็นพระคุณ

(นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด)
นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการ
16 กพ 2564

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ...กลุ่มงานพยาธิวิทยาและเทคนิคการแพทย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี
ที่ ๑๓๗/๒๕๖๔ วันที่ ๑๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๔

เรื่อง การเผยแพร่นวัตกรรมเรื่อง "วิธี Multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน"

เรียน ผู้อำนวยการสถาบันพยาธิวิทยา

อ้างถึง หนังสือที่ สร ๐๓๑๔/๖๐ ลงวันที่ ๑๖ กุมภาพันธ์ ๒๕๖๔

ตามที่ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ ได้ส่งนวัตกรรมเรื่องวิธี Multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis complex* จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน โดยนางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา เพื่อเผยแพร่นวัตกรรมให้กับกลุ่มงานพยาธิวิทยาและเทคนิคการแพทย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี นั้น

ในการนี้กลุ่มงานพยาธิวิทยาและเทคนิคการแพทย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ได้รับนวัตกรรมดังกล่าวข้างต้นเรียบร้อยแล้ว ซึ่งจะนำมาใช้ประโยชน์กับหน่วยงานของกลุ่มงานพยาธิวิทยาและเทคนิคการแพทย์ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี กรมการแพทย์ ต่อไป และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ทพ. สิงห์
(นางสาวพอน สิงห์มาตร)
นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการพิเศษ
กลุ่มงานพยาธิวิทยาและเทคนิคการแพทย์

❖ Backup Methods ; Molecular Lab @ IOP

❖ ถ่ายทอดความรู้แก่สถาบันสุขภาพเด็กฯ





THANK YOU