วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การประเมินวิธี Real-time PCR สำเร็จรูป 2 ชนิด วิธี PCR แบบดั้งเดิมและการย้อมสี acid fast bacilli สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

ศิริรัตน์ สีขุนทด *, ภานินี ถาวรังกูร, ลิขิต ปักเหนือ

Received: *May 16, 2015*
Revised & Accepted: *July 24, 2015*

บทคัดย่อ

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรควัณโรค ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อลำดับที่สองทั่วโลก เนื่องจากวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานและยอมรับในการตรวจหาเชื้อ MTBC มีอยู่หลากหลายวิธีซึ่งมีความไว, ความจำเพาะ, เครื่องมือ และค่าใช้จ่ายที่แตกต่างกัน การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบความไวของ 4 วิธีที่ใช้ตรวจหาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ที่ส่งตรวจมายังสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 80 ตัวอย่าง ประกอบด้วย การย้อมทางฮีสโตเคมีสำหรับเชื้อ acid fast bacilli (AFB-stain), วิธี conventional polymerase chain reaction (C-PCR), วิธี Real-time PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit (artus® Mycobac) และ abTES™ MTB qPCR I KIT (abTES™ MTB) พบว่า 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51.2) ให้ผลบวกโดยวิธี C-PCR, 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50.0) ให้ผลบวกโดยวิธี abTES™ MTB, 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.5) ให้ผลบวกโดยวิธี artus® Mycobac และ 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.8) ตรวจพบเชื้อ acid fast bacilli โดยวิธี AFB-stain เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยวิธี C-PCR และวิธี abTES™ MTB พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความไวไม่แตกต่างกันและมีค่าความสอดคล้องยอมรับได้ระดับดี (K = 0.625, 95% CI 0.454-0.796) และทั้ง 2 วิธีมีความไวที่มากกว่าวิธี artus® Mycobac และ AFB-stain อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.005$)

คำสำคัญ: ไมโครแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซีส คอมเพล็กซ์, การย้อมสีทนกรด, พีซีอาร์แบบดั้งเดิม, ชุดตรวจสำเร็จรูป Artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit, ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR I Kit.

สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of two commercial real-time PCR assays, conventional PCR and acid fast bacilli stain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue

Sirirat Seekhuntod *, Paninee Thavarungkul, Likit Puknua

Abstract

Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) is a group of closely related organisms causing tuberculosis, which is the second-most common cause of death from infectious diseases worldwide. Several methods for detecting MTBC are available and different in sensitivity, specificity, tools and costs. We used four methods comprising histochemistry stain for acid fast bacilli (AFB stain), conventional polymerase chain reaction (C-PCR) and two commercial molecular assays, artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit (artus® Mycobac) and abTES™ MTB qPCR I KIT (abTES™ MTB) and compared the sensitivity in 80 paraffin-embedded tissue samples that showed histomorphology suspected of tuberculous infection. Positive results were detected in 41 samples (51.2 %) by C-PCR, 40 samples (50.0 %) by abTES™ MTB, 30 samples (37.5 %) by artus® Mycobac and 27 samples (33.8 %) by AFB stain. There was no significant difference for the sensitivity in the detection of MTBC by C-PCR and abTES™ MTB. Good agreement between these methods (K=0.625 and 95% CI = 0.454-0.796) was observed. Both methods showed significantly higher sensitivity than artus® Mycobac and AFB stain ($P < 0.005$).

Keywords : *M. tuberculosis* complex, AFB-stain, C-PCR, Artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit, abTES™ MTB qPCR I Kit

Institute of Pathology, Department of Medical Services, Ministry of Public Health
*Corresponding author: (e-mail: Aueye29@hotmail.com)

บทนำ

วัณโรคเป็นสาเหตุสำคัญลำดับที่สองของการเสียชีวิตจากการติดเชื้อทั่วโลก ซึ่งมีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) เป็นสาเหตุ สถานการณ์วัณโรคในประเทศไทย องค์การอนามัยโรครายงานว่าในปี ค.ศ. 2011 มีอุบัติการณ์คิดเป็นอัตรา 161 ต่อจำนวนประชากร 100,000 คน[1, 2] วัณโรคจึงมีผลกระทบและเป็นปัญหาที่สำคัญต่อระบบสาธารณสุขไทยเป็นอย่างมาก ประเทศไทยมีการพัฒนาการควบคุมเชื้อวัณโรค วิธีการรักษา และการตรวจวินิจฉัย อย่างต่อเนื่อง การวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ทำด้วยวิธีการย้อมสีแบคทีเรียทนกรดแล้วตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ การย้อมสีแบคทีเรียทนกรดเป็นวิธีที่ประหยัด ง่ายต่อการปฏิบัติ แต่ขาดความไว (40-60%)[3, 4] และไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* ได้ [5] วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลาถึง 8 สัปดาห์ [6, 7] จึงเป็นปัญหาสำหรับผู้ป่วยที่มีสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS : Acquired Immune Deficiency Syndrome) ปัจจุบันวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคถูกพัฒนาไปมาก การตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยา โดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอนเอที่สนใจอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อตรวจหาดีเอนเอของเชื้อวัณโรค พบว่ามีศักยภาพในการทดสอบสูง เชื่อถือได้และรวดเร็ว[3,6] นอกจากนั้นเทคนิค PCR ยังสามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium* ได้อีกด้วย[8] การพัฒนาการตรวจโดยใช้เทคนิค PCR โดยห้องปฏิบัติการเอง (In-house PCR) นั้นเลือกใช้ตำแหน่งยีน IS6110 เพราะเป็นตำแหน่งที่ถูกใช้เป็นเครื่องมือที่น่าเชื่อถือในการตรวจตัวอย่างทางคลินิกมากที่สุด มีความไวและความจำเพาะสูง (ร้อยละ 92.4 และ 98)[5,8,9] เทคนิค real-time PCR ถูกพัฒนาขึ้น สามารถทราบผลเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของเชื้อวัณโรค[10-12] โดยเทคนิคนี้สามารถพัฒนาการตรวจโดยห้องปฏิบัติการเองและใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปที่ทางบริษัททางการค้าต่างๆพัฒนาขึ้น เช่น ชุดตรวจ artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) สามารถตรวจ *M. tuberculosis* complex (MTBC), *M. avium* subspecies และ *M. intracellulare* ได้ และประสพความสำเร็จในการตรวจหาดีเอนเอของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะ, น้ำล้างปอด, สารคัดหลั่งจากหลอดลม, น้ำไขสันหลัง, ของเหลวในกระเพาะอาหาร, ของเหลวในช่องท้อง [13] ชุดตรวจ abTES™ MTB qPCR I KIT (AITbiotech, Singapore) สามารถตรวจ MTBC ได้ และประสพความสำเร็จในการตรวจหาดีเอนเอของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะและน้ำไขสันหลัง [4] แต่ความไวของการตรวจเชื้อวัณโรคจากทั้ง 2 ชุดตรวจ ยังไม่ถูกเปรียบเทียบและประเมินในการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน การตรวจหาเชื้อวัณโรคมีอยู่หลากหลายวิธีซึ่งมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกัน การศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินหาวิธีการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ที่เหมาะสมในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างทางคลินิก

ตัวอย่างพาราฟินบล็อกชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินของผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรค ที่ส่งตรวจกับสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2556 จำนวน 80 ราย ทุกตัวอย่างถูกตรวจลักษณะทางพยาธิวิทยา (histopathology) จากสไลด์ Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) และวงพื้นที่บริเวณรอยโรค (necrosis/caseous necrosis และ granuloma) โดยพยาธิแพทย์ งานวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันพยาธิวิทยา เอกสารรับรองเลขที่ IOP-KM-R56-001

2. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

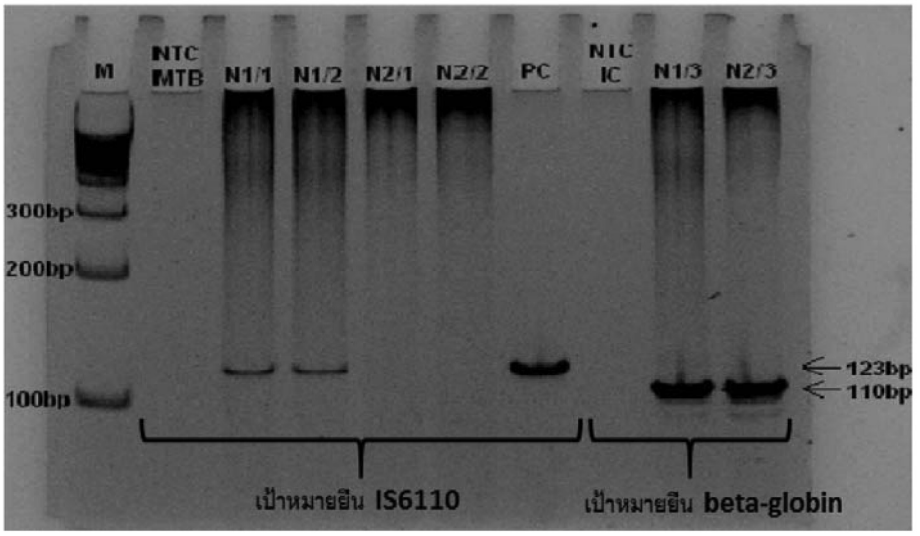
ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ถูกนำมาตัดชิ้นเนื้อหนา 10 ไมโครเมตรบนแผ่นสไลด์แก้ว ขูดชิ้นเนื้อ (macrodissection) บริเวณรอยโรคที่สงสัยด้วยเข็มปลอดเชื้อใส่ในหลอด 1.5 ml ละลายพาราฟินด้วยไซลีนปริมาตร 1 ml ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที และล้างด้วย 100% แอลกอฮอล์ ปริมาตร 1 ml ด้วยการปั่นด้วยความเร็วสูงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นสกัดดีเอนเอจากชิ้นเนื้อโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA FFPE tissue Kit (Qiagen, Germany) ดีเอนเอที่สกัดได้ วัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop ปรับให้มีปริมาณความเข้มข้น 50-100 ng/ul และเก็บไว้ที่ -40 °C จนถึงเวลานำไปใช้

3. การตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยวิธีย้อมสีทนกรด (AFB stain)

ตัดชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินให้มีความหนา 5 ไมครอนเมตรบนแผ่นสไลด์แก้ว อบแผ่นสไลด์ด้วยความร้อน 65-70 °C นาน 30 นาที ทำการ deparaffinization ด้วยการแช่ในสารละลาย Xylene 2 โถ ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยการดึงน้ำออกด้วยการแช่ใน 100% isopropyl alcohol 2 โถ ครั้งละ 5 นาที ตามด้วยแช่ใน 95% isopropyl alcohol 2 โถ ครั้งละ 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน แล้วย้อมชิ้นเนื้อด้วยการแช่ในสารละลาย carbol fuchsin นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำเพื่อให้สีส่วนเกินออกหมด จากนั้นล้างด้วย 1% acid alcohol จนชิ้นเนื้อเป็นสีชมพู ล้างด้วยน้ำเพื่อให้สีส่วนเกินออกหมด และ counter stain ด้วยสารละลาย 1% methylene blue ล้างด้วยน้ำเพื่อให้สีส่วนเกินออกหมด ปล่อยให้สไลด์แห้ง และ mount สไลด์ ด้วย mounting medium แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ acid fast bacilli ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพยาธิแพทย์

4. การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี C-PCR

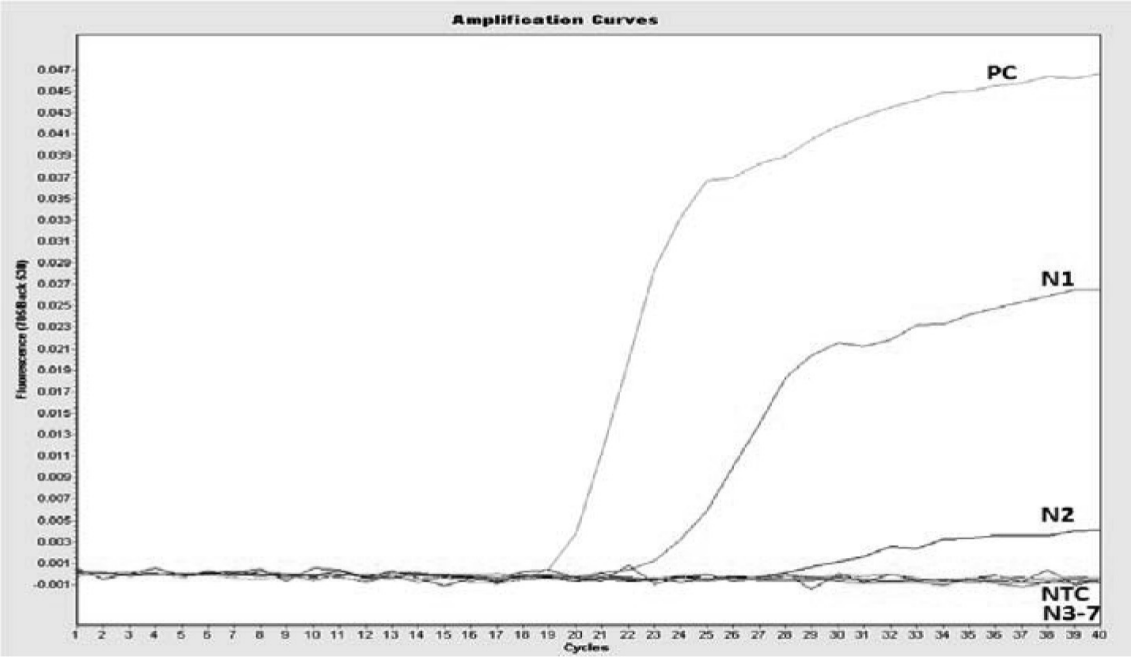
การทำ C-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC ดัดแปลงและพัฒนามาจากวิธีของ Chantranuwat และคณะ [8] โดยปรับเปลี่ยนส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสม ดังนี้ ปริมาตรสุทธิ 25 μl ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP (New England Biolabs), เอนไซม์ Amplitaq Gold DNA Polymerase 0.625 Unit (Applied Biosystems, USA), DNA template 50-100 ng/μl, ปรับปริมาตรด้วย steriled DW และ 0.4 μM Oligonucleotide primer 2 เส้นคือ 5'-CCT-GCG-AGC-GTA-GGC-GTC-GG- 3' และ 5'-CTC-GTC-CAG-CGC-CGC-TTC-GG-3 เป็น oligonucleotide primer ที่จำเพาะต่อยีน IS6110 ของเชื้อ MTBC และทำ internal control เพื่อประเมินคุณภาพของดีเอนเอร่วมด้วยคือ human beta-globin gene โดยทำปฏิกิริยา PCR ที่มีการปรับเปลี่ยนส่วนผสม จากวิธีของ Chantranuwat และคณะ[8] เช่นเดียวกับเป้าหมายยีน IS6110 โดยใช้ 0.4 μM oligonucleotide primer 2 เส้นคือ 5-'ACA-CAA-CTG-TGT-TCA-CTA-GC- 3' และ 5' –CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3' ทั้ง 2 เป้าหมาย พัฒนาให้ใช้ PCR-condition เดียวกัน คือ มีขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย denaturation 95 °C นาน 10 นาที, และตามด้วย 40 รอบของ denaturation 95 °C นาน 45 วินาที, annealing 63 °C นาน 45 วินาที, extension 72 °C นาน 45 วินาทีและสุดท้ายด้วย Final extension 72 °C นาน 10 นาที โดยเครื่อง Thermocycle ยี่ห้อ Bio-Rad , C1000 แล้วนำ PCR product ที่ได้ทำ gel electrophoresis บน 6% acrylamide ทดแทนการทำ gel electrophoresis บน 2% agarose ตามวิธีของ Chantranuwat และคณะ[8] ที่ 140 โวลท์ นาน 45 นาที ย้อมแผ่นเจลด้วย SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain (1:400, Lonza, USA) ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต วิเคราะห์ผลโดยดูขนาด PCR product ของเชื้อ MTBC ที่ได้มีขนาด 123 bp และในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกครั้ง ในแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 2 ครั้ง และขนาด PCR product ของ beta-globin มีขนาด 110 bp, ใช้ DNA template ของผู้ป่วยที่มี Positive- MTBC เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control **(รูปที่ 1)**



รูปที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อ MTBC โดยวิธี C-PCR ซึ่งพบขนาด PCR product ของเป้าหมายยีน IS6110 ที่ขนาด 123 bp และเป้าหมายยีน beta-globin ที่ขนาด 110 bp, N1/1, N1/2 คือตัวอย่างเดียวกันที่ให้ผลบวก พบการติดเชื้อ MTBC (พบแถบ DNA ขนาด 123 bp เหมือนกันทั้ง 2 ช่อง), N2/1, N2/2 คือตัวอย่างเดียวกันที่ให้ผลลบ ไม่พบการติดเชื้อ MTBC (ไม่พบแถบ DNA ขนาด 123 bp เหมือนกันทั้ง 2 ช่อง), N1/3, N2/3 คือ internal control ของยีน beta-globin (ทุกตัวอย่างต้องพบแถบ DNA ขนาด 110 bp), PC คือ positive control, NTC/MTB คือ negative control ของเป้าหมายยีน IS6110, NTC/IC คือ negative control ของเป้าหมายยีน beta-globin และ M คือ 100 bp size marker

5. การตรวจหาดีเอนเอของเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี Real-Time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit (artus® Mycobac)

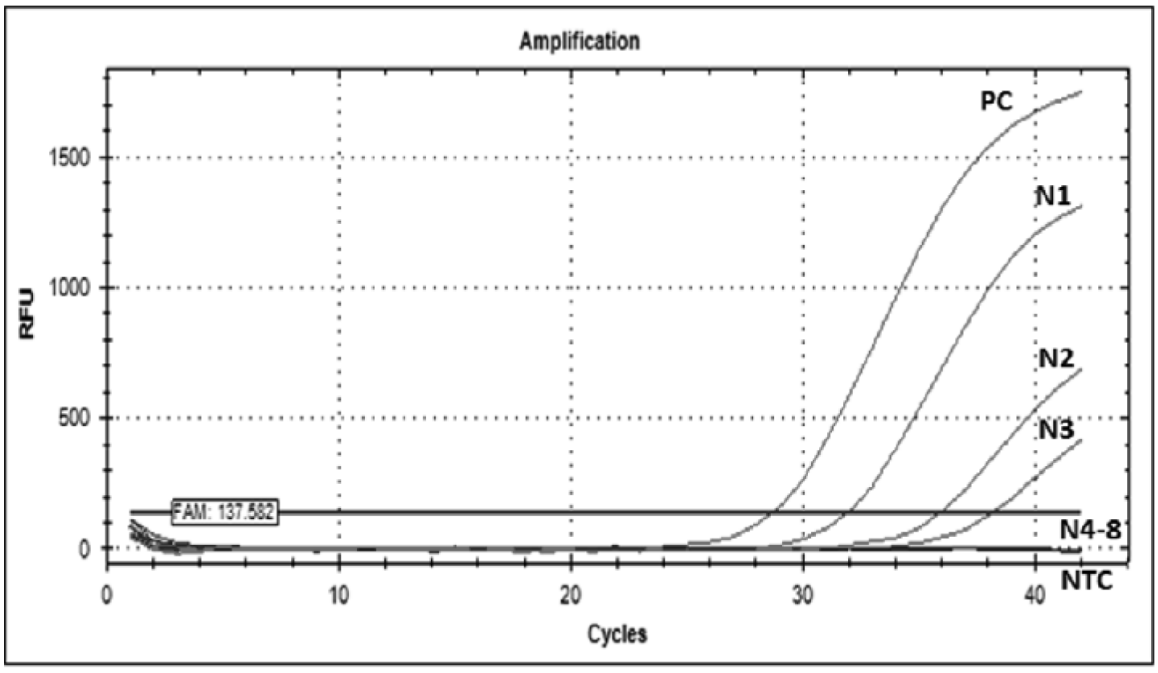
การทำ real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ artus® Mycobac (Qiagen, Hilden, Germany) โดยชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA ให้มีขนาด PCR-product ขนาด 159 bp[14] ทำปฏิกิริยา real-time PCR ปริมาตรสุทธิ 20 µl ประกอบด้วย Mycobac. Diff. LC Master 13 µl, Mycobac. Diff. LC Mg-Sol 2 µl และ DNA template 5 µl ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย program activation (95 °C นาน 20 วินาที) ตามด้วย program touch down (95 °C นาน 1 วินาที, และตามด้วย 65 °C นาน 15 วินาที 72 °C นาน 15 วินาที จำนวน 10 รอบ) (95 °C นาน 1 วินาที, 55 °C นาน 20, วินาที 72 °C นาน 15 วินาที) จำนวน 40 รอบ โดยเก็บข้อมูลที่ขั้นตอน annealing แบบ quantification ตามด้วย program melting curve ในช่วงการวิเคราะห์ melting phase จะทำการตรวจวัดในช่วงแสงที่มีความยาวคลื่นแสง 530 นาโนเมตร ตรวจวัดตั้งแต่อุณหภูมิที่ 45 °C ถึงอุณหภูมิที่ 80 °C ซึ่งในการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในช่วงนี้จะเพิ่มขึ้นในอัตรา 0.1 °C / วินาที โดยเครื่อง Light Cycler 480 system (Roach, Germany) และวิเคราะห์ผล แบบ qualitative detection โดยดูการลักษณะ amplify เทียบกับ negative control และ positive control ใช้ positive- MTBC ของชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control **(รูปที่ 2)**



รูปที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อ MTBC โดยวิธี artus® Mycobac, N1-N2 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลบวก พบการติดเชื้อ MTBC, N3-N7 คือ ตัวอย่างที่ให้ผลลบ ไม่พบการติดเชื้อ MTBC, PC คือ positive control และ NTC คือ negative control

6. การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี Real-Time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR I Kit (abTES™ MTB)

การทำ real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC ใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปของ abTES™ MTB (AITbiotech, Singapore) โดยชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะกับยีน ยีน IS6110 ให้มีขนาด PCR-product ขนาด 130 bp [4] ทำปฏิกิริยา real-time PCR ปริมาตรสุทธิ 25 μl ประกอบด้วย 2X MTB Master mix 12.5 μl, MTB Primer Mix 0.5 μl, MTB Probe Mix 0.5 μl, MTB internal control 0.2 μl, nuclease-free water 6.3 μl และ DNA template 5 μl ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย *Taq* activation 95 °C นาน 7 นาที ตามด้วย amplification 42 รอบ 95 °C นาน 12 วินาที, annealing 64 °C นาน 25 วินาที โดยเก็บข้อมูลที่ annealing phase จะทำการตรวจวัดในช่องแสง FAM สำหรับตรวจวัดเป้าหมาย MTBC และตรวจวัดในช่องแสง Texas Red สำหรับการตรวจวัดเป้าหมาย internal control โดยเครื่อง CFX96 Real-Time PCR system (Bio-LAD) วิเคราะห์ผลแบบ qualitative detection โดยดูลักษณะ amplify curve เทียบกับ negative control และ positive control ใช้ Positive-MTBC ของชุดตรวจสำเร็จรูปของ abTES™ MTB เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control **(รูปที่ 3)**



รูปที่ 3 ผลการตรวจหาเชื้อ MTBC โดยวิธี abTES™ MTB, N1-N3 คือตัวอย่างที่ให้ผลบวก พบการติดเชื้อ MTBC, N4-N8 คือตัวอย่างที่ให้ผลลบ ไม่พบการติดเชื้อ MTBC, PC คือ positive control และ NTC คือ negative control

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างของวิธี AFB stain, C-PCR, ชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac และ abTES™ MTB คือ Chi-square test โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และใช้ค่า Kappa (K) เพื่อประเมินความสอดคล้องกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธีคือ abTES™ MTB และ C-PCR กรณีที่ค่า K = 0.0-0.4 คือค่าการไม่ยอมรับในความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี หากค่า K = 0.41-0.6 คือค่าการยอมรับได้ในระดับปานกลางในความสอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี หากค่า K = 0.61-0.8 คือค่าการยอมรับได้ในระดับดีในความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี และหากค่า K = 0.81-1.0 คือค่าการยอมรับในความสอดคล้องกันเป็นอย่างดีมากของทั้ง 2 วิธี

ผลการศึกษา

1. เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex ทั้ง 4 วิธี

การตรวจหาเชื้อ MTBC โดย 4 วิธีคือ AFB-stain, C-PCR, artus® Mycobac และ abTES™ MTB จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินของผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรค จำนวน 80 ตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงไว้ใน **ตารางที่ 1** จากผลการศึกษาเปรียบเทียบทั้ง 4 วิธีพบว่า วิธีที่มีความไวมากกว่ามี 2 วิธีคือ C-PCR ตรวจพบเชื้อใน 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51.25) และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ตรวจพบเชื้อใน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50.0) วิธีที่มีความไวรองลงมาคือ ชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac ตรวจพบเชื้อใน 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37.0) ส่วนวิธีที่มีความไวต่ำสุดคือ AFB stain ตรวจพบเชื้อใน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.8)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อ MTBC จากชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ของผู้ป่วยที่สงสัยการติดเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี AFB stain, C-PCR, real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac และ ชุดตรวจ abTES ™ MTB

ที่	ชื่อตัวอย่าง	ผลการตรวจ				ที่	ชื่อตัวอย่าง	ผลการตรวจ			
		AFB stain	C-PCR	artus® Mycobac**	abTES™ MTB***			AFB stain	C-PCR	artus® Mycobac**	abTES™ MTB***
1	MP-1	-	+	+	+	41	MP-41	+	+	-	+
2	MP-2	-	-	-	-	42	MP-42	-	+	-	+
3	MP-3	-	-	-	-	43	MP-43	-	+	+	+
4	MP-4	+	+	+	+	44	MP-44	-	+	-	-
5	MP-5	+	-	+	+	45	MP-45	-	+	-	+
6	MP-6	+	-	-	+	46	MP-46	+	+	+	+
7	MP-7	-	+	-	-	47	MP-47	+	+	+	+
8	MP-8	-	-	-	-	48	MP-48	-	-	-	-
9	MP-9	-	-	-	-	49	MP-49	+	+	+	+
10	MP-10	-	-	-	-	50	MP-50	-	+	-	+
11	MP-11	+	-	-	-	51	MP-51	+	+	+	+
12	MP-12	+	-	+	-	52	MP-52	+	+	+	+
13	MP-13	-	-	-	-	53	MP-53	+	+	-	+
14	MP-14	-	-	-	-	54	MP-54	+	+	-	+
15	MP-15	-	-	-	-	55	MP-55	-	-	-	-
16	MP-16	-	+	-	+	56	MP-56	-	-	-	-
17	MP-17	-	-	+	+	57	MP-57	-	-	-	-
18	MP-18	-	+	-	-	58	MP-58	-	+	-	+
19	MP-19	+	+	-	+	59	MP-59	-	-	+	+
20	MP-20	-	-	-	-	60	MP-60	-	+	-	+
21	MP-21	+	-	+	+	61	MP-61	-	+	-	+
22	MP-22	+	+	-	-	62	MP-62	-	+	+	+
23	MP-23	-	+	-	-	63	MP-63	-	-	-	-
24	MP-24	-	-	+	+	64	MP-64	-	+	+	+
25	MP-25	+	-	+	+	65	MP-65	-	+	-	+
26	MP-26	+	+	+	+	66	MP-66	+	-	-	-
27	MP-27	-	-	-	-	67	MP-67	+	-	+	-
28	MP-28	+	-	-	-	68	MP-68	-	+	+	+
29	MP-29	-	+	-	+	69	MP-69	-	+	-	-
30	MP-30	-	+	+	+	70	MP-70	-	+	+	-
31	MP-31	-	+	+	-	71	MP-71	+	+	+	+
32	MP-32	+	+	+	+	72	MP-72	-	-	-	-
33	MP-33	-	-	-	-	73	MP-73	+	+	+	+
34	MP-34	-	+	+	+	74	MP-74	-	-	-	-
35	MP-35	+	+	-	+	75	MP-75	-	-	-	-
36	MP-36	-	+	+	+	76	MP-76	-	-	-	-
37	MP-37	-	-	-	-	77	MP-77	-	-	-	-
38	MP-38	-	-	+	-	78	MP-78	+	+	+	+
39	MP-39	-	-	-	-	79	MP-79	-	-	-	-
40	MP-40	-	-	-	-	80	MP-80	+	-	-	-

* การตรวจทั้ง 4 วิธี ตรวจจากตัวอย่างของผู้ป่วยรายเดียวกัน, ** artus® Mycobac คือ วิธี Real-time PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit, *** abTES™ MTB คือวิธี Real-time PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR I Kit, (+ : Positive) คือ ตรวจพบเชื้อ และ (- : Negative) คือ ตรวจไม่พบเชื้อ

2. การเปรียบเทียบผลของการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex โดย วิธี C-PCR และวิธี abTES™ MTB qPCR I Kit

ผลการเปรียบเทียบทั้งสองวิธีคือ วิธี C-PCR และวิธี abTES™ MTB ดังแสดงไว้ใน **ตารางที่ 2** พบว่าทั้งสองวิธี ให้ผลบวกเหมือนกัน 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 41.2) ให้ผลลบเหมือนกัน 32 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40.0) และให้ผลแตกต่างกัน 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 18.7) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีค่า K = 0.625 และ 95% CI มีค่าระหว่าง 0.454-0.796, $P < 0.05$ ซึ่งมีค่าการยอมรับในความสอดคล้องกันระดับดีของวิธีการตรวจทั้ง 2 วิธีดังกล่าว

ตารางที่ 2 ผลของการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* complex โดย วิธี C-PCR และ วิธี abTES™ MTB qPCR I Kit

วิธีตรวจ	*จำนวน C-PCR-Positive	จำนวน C-PCR-Negative	รวม
**abTES ™ MTB-Positive	33	7	40
abTES ™ MTB-Negative	8	32	40
รวม	41	39	80

* จำนวน คือ จำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ฝังพาราฟิน, ** abTES™ MTB คือ วิธี Real-time PCR ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB qPCR I Kit

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบหาวิธีการที่เหมาะสม ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน โดยเปรียบเทียบวิธีที่ได้มาตรฐานและเป็นที่ยอมรับ 4 วิธีคือ AFB stain, C-PCR, Real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB โดยการศึกษานี้ใช้ผลการตรวจวินิจฉัยชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาด้วยวิธี H&E stain เป็นวิธีอ้างอิงมาตรฐาน ซึ่งลักษณะรอยโรคที่พบคือ necrosis/caseous necrosis และ granuloma อาจเกิดจากสาเหตุอื่นที่นอกเหนือจากการติดเชื้อ MTBC และการศึกษานี้ไม่มีผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ยืนยัน ดังนั้นความไวที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จึงอาจจะต่ำกว่าความเป็นจริง การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีฮีสโตเคมี (AFB stain) จะเห็นรูปร่างลักษณะเชื้อเป็นแท่งติดสีแดง ของ carbol fuchsin[3, 4] แต่ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* ได้[5] วิธี C-PCR ในการศึกษาครั้งนี้เลือกการออกแบบไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน IS6110 มีขนาด PCR-product 123 bp เพื่อตรวจหาเชื้อ MTBC โดยตำแหน่งยีน IS6110 สามารถจับอย่างจำเพาะกับดีเอนเอเป้าหมายของเชื้อ MTB ที่แตกต่างกัน 11 สายพันธุ์ รวมถึงสามารถจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ *M. bovis* และสายพันธุ์ *M. simiae* ได้ด้วย[15] วิธี C-PCR นี้ได้มีการศึกษาและมีผลอ้างอิงกับมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับ จากการศึกษาของ Chantranuwat และคณะ[8] วิธี real-time PCR การศึกษานี้ตรวจวิเคราะห์โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac และ ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac ผ่านการรับรองจากกฎหมายเครื่องมือแพทย์แห่งสหภาพยุโรป สามารถใช้วินิจฉัยทางการแพทย์ได้ ชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์หรือโพรบ ที่จำเพาะกับยีน 16S rRNA ให้มี PCR-product ขนาด 159 bp[14] สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้ 6 สายพันธุ์คือ *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti* และ *M. pinnipedii* โดยใช้เครื่อง real-time PCR รุ่น 2.0 LightCycler โดยสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้ต่ำสุดที่ 1.6 copies/μl[16] ชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ผ่านการรับรองจากสถาบันรับรองความปลอดภัยของประเทศเยอรมันนี สามารถใช้วินิจฉัยทางการแพทย์ได้ ชุดตรวจนี้ออกแบบไพรเมอร์หรือโพรบ ที่จำเพาะกับยีน IS6110 ให้มี PCR-product ขนาด 130 bp[4] สามารถตรวจวิเคราะห์หาเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้ 6 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับชุดตรวจ artus® Mycobac โดยใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่น 96 CPX, Bio-Rad. มีความไวร้อยละ 81.3 และความจำเพาะร้อยละ 98.8[4, 17]

ในการศึกษาครั้งนี้ วิธี AFB stain พบความไวต่ำสุด ตรวจพบเชื้อ 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 33.8) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Singh และคณะ [3] และงานวิจัยของ Inoue และคณะ [4] ซึ่งตรวจพบความไวร้อยละ 40-60 วิธี real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป artus® Mycobac มีความไวรองลงมาตรวจพบเชื้อ 30 ตัวอย่าง (ร้อยละ 37) เนื่องจากชุดตรวจนี้ ออกแบบ PCR-product ที่มีขนาดใหญ่ถึง 159 bp ทำให้อาจไม่เหมาะสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ที่ดีเอ็นเอมีการแตกหักสูง[18, 19] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Drews และคณะ ได้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน โดยวิธี artus® Mycobac เช่นเดียวกัน พบว่าวิธีนี้มีขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อได้ที่ 10 copies/reaction ซึ่งเป็นข้อจำกัดกับตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟินที่มี Inhibitor สูง สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา PCR ได้ ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้จำเป็นต้องปรับความเข้มข้นให้ต่ำ อาจเป็นผลให้จำนวน copies ของเชื้อต่ำลง ทำให้วิธี artus® Mycobac ตรวจไม่พบเชื้อ [20] และวิธีที่มีความไวสูงในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ MTBC คือ วิธี C-PCR และ real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ตรวจพบ 41 ตัวอย่าง (ร้อยละ 51.25) และ 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 50) ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธี C-PCR และชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ถูกออกแบบเป้าหมายที่จำเพาะของไพรเมอร์ ที่ยีนเดียวกัน คือ IS6110 โดยวิธี C-PCR และวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ออกแบบ PCR-product ที่มีขนาดเล็กเพียงขนาด 123 bp และ 130 bp ตามลำดับ ซึ่งอาจมีความเหมาะสมกับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มาจากชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ซึ่งดีเอ็นเอมักแตกหักเป็นขนาดเล็ก

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี คือ วิธี C-PCR และ วิธี abTES™ MTB พบว่ามีความสอดคล้องกันระดับดี (K = 0.625, 95% CI 0.454-0.796, $P < 0.005$) แต่ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวยังไม่สามารถเป็นวิธีที่ทดแทนกันได้ เพราะหากจะสามารถทดแทนกันได้ค่าความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี ควรอยู่ในระดับดีมาก (K = 0.81-1.0) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเปรียบเทียบในทั้ง 2 วิธี ในการศึกษาครั้งนี้ ยังใช้ตัวอย่างไม่มากพอในการศึกษา และจากผลการศึกษาใน 2 วิธีนี้ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่ตรงกัน 15 ตัวอย่าง (**ตารางที่ 2**) คือ มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี C-PCR แต่ให้ผลลบกับวิธี abTES™ MTB จำนวน 8 ตัวอย่าง และในทางตรงกันข้ามมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี abTES™ MTB แต่ให้ผลลบกับวิธี C-PCR จำนวน 7 ตัวอย่าง ทั้งนี้ 2 วิธีดังกล่าวมียีนเป้าหมายเหมือนกันคือ IS6110 ดังนั้นความแตกต่างนี้อาจจะเนื่องจากไพรเมอร์หรือโพรบที่ใช้ สภาวะและความเข้มข้นของการทำปฏิกิริยา รวมถึงธรรมชาติของดีเอนเอเป้าหมาย[21] ดังนั้นการใช้ทั้ง 2 วิธีนี้ร่วมกันในการตรวจวิเคราะห์น่าจะเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อ MTBC ได้ดียิ่งขึ้น

ทั้งนี้การเลือกใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน ระหว่างวิธี C-PCR หรือวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB นั้นขึ้นอยู่กับขีดความสามารถของแต่ละห้องปฏิบัติการ ทั้งในเรื่องงบประมาณ ทรัพยากรบุคคล เครื่องมือ เพราะทั้ง 2 วิธีมีข้อดี-ข้อเสีย และข้อจำกัดแตกต่างกัน คือวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน และใช้เวลาน้อย แต่มีต้นทุนที่สูง เนื่องจากเครื่องมือและน้ำยามีราคาสูง ส่วนวิธี C-PCR นั้นใช้เครื่องมือ PCR ธรรมดาและน้ำยามีราคาถูกกว่า แต่วิธี C-PCR นั้นไม่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการที่มีตัวอย่างจำนวนมาก เนื่องจากขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ยังมีความซับซ้อนและใช้เวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง[22] แต่วิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ประมาณ 1 ชั่วโมง ดังนั้นการตรวจหาเชื้อ MTBC ด้วยวิธี C-PCR จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับหน่วยงานที่มีงบประมาณและเครื่องมือที่จำกัด ส่วนวิธีชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับหน่วยงานที่มีตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์จำนวนมากและมีงบประมาณ เครื่องมือที่เพียงพอ

โดยสรุปการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี C-PCR และวิธี Real-time PCR โดยชุดตรวจสำเร็จรูป abTES™ MTB ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความไวใกล้เคียงกันในการตรวจหาเชื้อ MTBC ในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังในพาราฟิน

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ขอขอบพระคุณ นายแพทย์ทรงคุณ วิญญูวรรธน์ นายแพทย์ทรงคุณวุฒิ สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ ที่ช่วยอ่านตรวจทานและ

ช่วยแก้ไขงานวิจัยชิ้นนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ร.อ. ดร. กิติพงษ์ หาญเจริญ ที่ช่วยให้คำปรึกษาทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. WHO report 2011 : Global TB Control. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
2. ศรีประพา เนตรนิยมและคณะ. รายงานผลการดำเนินงานควบคุมวัณโรคของประเทศไทยปีงบประมาณ 2551. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย ed. กรุงเทพ สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข 2553
3. Singh K, Muralidhar M, Kumar A, Chattopadhyaya T, Kapila K, Singh M, et al. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in granulomatous lymphadenopathy. J Clin Pathol 2000;53:355-61.
4. 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. Eur J Clin Microb Infect Dis 2011;30:131-5.
5. Zakham F, Lahlou O, Akrim M, Bouklata N, Jaouhari S, Sadki K, et al. Comparison of a DNA based PCR approach with conventional methods for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Morocco. Med J Hematol Infect Dis 2012;4:e2012049.
6. Cegielski JP, Devlin BH, Morris AJ, Kitinya JN, Pulipaka UP, Lema LE, et al. Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis. J Clin Microbiol 1997;35:3254-7.
7. 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 Research Notes 2012;5:487-94.
8. 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. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006;37:940-7.
9. Amir Hossein Jafarian AO, Ghenaat J, Ghazvini K, Ayatollahi H, Erfanian M, Shakeri TM, Bagheri M, Tavassolian H. Comparison of multiplex PCR and acid fast and Auramine -Rhodamine staining for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and non tuberculosis *Mycobacteria* in paraffin- embedded pleural and bronchial tissues with granulomatous inflammation and caseous necrosis. Iran J Basic Med Sci 2008;10:216-21.
10. 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 paraffin-embedded human tissues. J Mol Diagn 2011;13:390-4.
11. 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 Global Infect Dis 2011;3:353-6.
12. Causse M, Ruiz P, Gutiérrez-Aroca JB, Casal M. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. J Clin Microb 2011;49:3065-7.
13. Beqaj SH, Flesher R, Walker GR, Smith SA. Use of the real-time PCR assay in conjunction with MagNA Pure for the detection of mycobacterial DNA from fixed specimens. Diagn Mol Pathol part B. 2007;16:169-73.
14. Hur M, Moon HW, Yun YM, Kang TY, Kim HS, Kim HS, et al. Detection of tuberculosis using artus M. tuberculosis PCR kit and COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* test. Int J

Tuberculosis Lung Dis 2011;15:795-8.

15. Eisenach KD, Donald Cave M, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis.* J Infect Dis 1990; 161: 977-81.
16. Quantitative in vitro Diagnostics : Artus® Mycobac. Diff. LC PCR Kit Handbook.July 2009.
17. A real-time PCR (qPCR) assay for detection of the *Mycobacterium Tuberculosis* complex : abTES ™MTB qPCR I kit.17 Feb 2014.
18. Swango KL, Timken MD, Chong MD, Buoncristiani MR. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. Forensic Sci Int 2006;158:14-26.
19. Sjoholm MI, Hoffmann G, Lindgren S, Dillner J, Carlson J. Comparison of archival plasma and formalin-fixed paraffin-embedded tissue for genotyping in hepatocellular carcinoma. Cancer Epidemiol, Biomark Prev 2005;14:251-5.
20. Drews SJ, Eshaghi A, Pyskir D, Chedore P, Lombos E, Broukhanski G, et al. The relative test performance characteristics of two commercial assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-fixed human biopsy specimens. Diagn Pathol 2008;3:37.
21. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than conventional PCR. J Clin Microb 2008;46:1897-900.
22. Tiwawech D, Srivatanakul P, Karalak A, Ishida T. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism in Thai nasopharyngeal carcinoma. Asian Pacific J Cancer Prev 2005;6:270-5.