

การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิครีลไทม์ พีซีอาร์

Detection of Tuberculosis by Real-Time Polymerase Chain Reaction

วสุวัฒน์ ภาวงค์(Wasuwat Phawong)*

อรอนงค์ กฤษเพชรรัตน์(Onanong Kritpetcharat)** อนุชา พัวไพโรจน์(Anucha Puapairoj)***

ภาณุทรรัตน์ กฤษเพชรรัตน์(Panutas Kritpetcharat)****

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการตรวจหาเชื้อ mycobacteria ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ melting curve analysis เพื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* และกลุ่ม nontuberculous mycobacteria (NTM) ในสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้ melting curve analysis เพื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ แต่ยังไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อสายแบคทีเรียในกลุ่ม NTM ได้ เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้มีค่า melting temperature ที่ซ้อนทับหรือเหลื่อมล้ำกัน มีเพียงเชื้อ *M. tuberculosis* เชื้อสายเดียวเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนในการตรวจหาเชื้อ mycobacteria ในเสมหะของผู้ป่วย 96 ราย พบว่ามีจำนวน 10 ราย ที่ให้ผลบวกจากการย้อมสีทึบกรด และทั้ง 10 รายนี้ สามารถตรวจพบเชื้อ mycobacteria ได้ด้วย melting curve analysis โดยผู้ป่วย 8 ราย ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* และอีก 2 ราย ตรวจพบเชื้อในกลุ่ม NTM และพบว่าผู้ป่วยที่เสมหะมีผลลบจากการย้อมสีทึบกรดจำนวน 5 ราย สามารถตรวจพบเชื้อกลุ่ม NTM เช่นกัน

ABSTRACT

Real-time PCR was used to detect mycobacteria and differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria (NTM) in sputum specimen by using the melting curve analysis. The result showed that the melting temperature could be used to distinguish *M. tuberculosis* from NTM. However the use of melting temperature could not differentiate species of NTM. From the implementation of real-time PCR to 96 sputum specimens, it was shown that all of 10 cases with positive acid-fast stain were also positive by melting curve analysis. Of these 10 cases, 8 cases contained *M. tuberculosis* and 2 cases had NTM. In addition, 5 cases with negative acid-fast stain were positive for NTM by melting curve analysis.

คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค วิธีรีลไทม์ พีซีอาร์

Key Words : Tuberculosis, Real-Time Polymerase Chain Reaction

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis ; TB) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาหลักของสาธารณสุขทั่วโลก โดยเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Mycobacterium tuberculosis* วัณโรคเกิดได้ทั้งในปอด (pulmonary tuberculosis) พบประมาณร้อยละ 67 และนอกปอด (extra pulmonary tuberculosis) พบประมาณร้อยละ 37 ของผู้ป่วยวัณโรค (Ahmed & Aziz, 1998) เมื่อมีการแพร่ระบาดของ HIV ยิ่งทำให้ผู้ป่วยดังกล่าวติดเชื้อวัณโรคเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะวัณโรคนอกปอด เช่น ไช้กระดูก ต่อมน้ำเหลือง เชื้อหุ้มสมอง เป็นต้น (Akpek et al., 2001; Carrol et al., 2001; Shafer et al., 1991) ในปัจจุบันยังพบว่า mycobacteriua อื่นก็สามารถเป็นต้นเหตุของการติดเชื้อได้ เชื้อกลุ่มนี้เรียกว่า nontuberculous mycobacteria (NTM)

การจัดจำแนกเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการรักษาที่แตกต่างกัน รวมทั้งระยะเวลาที่รักษาก็แตกต่างกันด้วย (Small & Fujiwara, 2001) ดังนั้นหากสามารถจัดจำแนกเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้ออกจากกันได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อตัวผู้ป่วยเอง และเป็นประโยชน์ในด้านการตัดสินใจเลือกการรักษาของแพทย์ แต่อย่างไรก็ตามการวินิจฉัยการติดเชื้อ mycobacteria ทั้งกลุ่ม MTC และ NTM ทำได้ยาก มีผู้ป่วยส่วนหนึ่งวินิจฉัยไม่ได้ (Katz et al., 1985) ซึ่งการวินิจฉัยการติดเชื้อเหล่านี้ที่ใช้กันตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันประกอบด้วย การ x-ray ปอดหรือวิธีทางรังสีอื่นๆ (Lundstedt et al., 1996) อย่างไรก็ตามมีผู้ป่วยที่ติดเชื้อให้ผลปกติ (Leahy et al., 1994; Schaaf et al., 1994; Pedro-Botet et al., 1992) การตรวจทางห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ skin test (Katz et al., 1985), การย้อม acid-fast bacilli (AFB) (Hodes & Seyoum, 1989) , การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเป็นชุดเพื่อแยกชนิดซึ่งทำยากใช้เวลานาน การตรวจชิ้นเนื้อต่างๆ ซึ่งเป็นการ

ตรวจเพื่อดูการตอบสนองต่อการอักเสบของเนื้อเยื่อไม่ได้เป็นการตรวจหาเชื้อโดยตรง (Kinoshita et al., 1994) แม้ว่าการย้อม AFB ทำง่ายแต่โอกาสพบเชื่อน้อย และเมื่อใช้ตรวจหาเชื้อ mycobacteria นอกปอดในเนื้อเยื่อจะมีความไวต่ำ ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจ ได้แก่ polymerase chain reaction (PCR) (Lee et al., 1994; Shah et al., 2006; Akcan et al., 1997; Butt et al., 2003; Torrea et al., 2005; Petitjean et al., 2004) แบบดั้งเดิมแต่มีขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน, การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น immuno - chromatography techniques (ICT) (Ongut et al., 2006), multiplex serological assay (Tong et al., 2005) แต่การตรวจดังกล่าวยังมีปัญหาในแง่ความจำเพาะและความไว และเป็น การตรวจหาแอนติบอดี ไม่ได้เป็นการตรวจเชื้อโดยตรง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยเชื้อ mycobacteria ยังคงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีที่เหมาะสม มีความไวและความจำเพาะที่สูง โดยเฉพาะวัณโรคนอกปอด อย่างไรก็ตามวิธี PCR มีขั้นตอนที่ยุ่งยากดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็วขึ้น ซึ่งวิธีที่น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งได้แก่ Real-time PCR (Hillemann et al., 2006) ซึ่งเป็นวิธีผสมผสานระหว่าง PCR ดั้งเดิมกับเครื่องอัตโนมัติซึ่งใช้ในการอ่านผล ซึ่งช่วยลดขั้นตอนการทดสอบ รวมทั้งสามารถอ่านผลในเชิงปริมาณได้ ประกอบกับกระทรวงสาธารณสุข ได้จัดวางเครื่องสำหรับทำ Real-time PCR ไว้ในโรงพยาบาลศูนย์หลายแห่ง

ในการศึกษาของ Shrestha และคณะ (2003) ได้ทำการประเมินคุณภาพของโพรบ (probe) และไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *M. tuberculosis* และกลุ่ม NTM ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ melting curve analysis ในเชิงมาตรฐาน พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อได้ทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ (Shrestha et al., 2003) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้โพรบและไพรเมอร์คู่ดังกล่าว มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ

mycobacteria ในสิ่งส่งตรวจเสมหะ (sputum) ของผู้ป่วยโดยตรง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

แบคทีเรีย

เชื้อ *Mycobacterium* ที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. neoactis*, *M. flavescens*, *M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmetis* และ *M. terrae* เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณเสกสิทธิ์ ตั้งศิริ ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย เป็นส่วนที่เหลือ หลังจากการแบ่งไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างเดือนกรกฎาคม – เดือนธันวาคม 2551 จำนวน 96 ราย (เพศชาย 49 ราย และเพศหญิง 47 ราย)

การย้อมสี Kinyoun's acid fast stain (cold)

นำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะมาทำการป้ายลงบนแผ่นสไลด์ และทำ fixation ด้วยความร้อน ย้อมด้วย Kinyoun's carbol fuchsin เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างด้วยน้ำ และ decolorized ด้วย acid alcohol 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที หรือจนกระทั่งไม่มีสีตกค้างและทำการย้อมด้วยสี methylene blue เป็นเวลา 3 นาทีและล้างออกด้วยน้ำ วางทิ้งไว้ให้แผ่นสไลด์แห้งและตรวจดูการติดสีของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X objective lens

หลักการให้คะแนน AFB positive ใช้ตามหลักของ International Union Against Tuberculosis (IUAT) คะแนน 1+ (พบเชื้อแบคทีเรีย <1/field),

คะแนน 2+ (พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1-10 AFB/field) และคะแนน 3+ (พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน >10 AFB/field)

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของ mycobacteria ในเสมหะ ทำตามวิธีของ Amita และคณะ (2002) (Amita *et al.*, 2002) นำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะมาแบ่งใส่หลอดแล้วเติม TE buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม lysis buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร 0.5 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100 (pH 8.0) และ proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กำจัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกโดยเติมสารที่มีส่วนผสมของ Phenol, chloroform และ isoamyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเก็บสารละลายชั้นบนใส่หลอดไมโคร เซนติฟิวจ์ เติม chloroform ในปริมาณที่เท่ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารละลายชั้นบนใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate ปริมาณ 0.1 เท่า และ isopropanol ปริมาณที่เท่ากับสารละลายในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งให้หมดจนเหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้งให้หมดจนเหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ทำให้แห้งโดยการเปิดฝา แล้วคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

แบ่งดีเอ็นเอที่สกัดได้ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ไปตรวจวัดความเข้มข้นและคุณภาพด้วยเครื่อง NanoVue™ spectrophotometer (Fisher Scientific, UK)

การตรวจสอบเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค รีลไทม์ พีซีอาร์ (Real-time PCR)

การศึกษานี้ใช้ LightCycler 480 system (Roach, Germany) ในตรวจสอบเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค รีลไทม์ พีซีอาร์ โดยจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ (PCR) มีองค์ประกอบของพีซีอาร์ (20 µl) ดังนี้ DNA template (100 นาโนกรัม), 1x PCR buffer, dNTP mixture 0.1 มิลลิโมลาร์, MgCl₂ 4 มิลลิโมลาร์, 1.5U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA), *Mycobacterium* genus-specific primers (Shrestha et al., 2003) สายละ 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *M. tuberculosis* specific probes (Shrestha et al., 2003) สายละ 0.2 ไมโครโมลาร์ ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอประกอบด้วย Initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, และตามด้วย 40 รอบของ denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที, annealing 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และสุดท้ายด้วย Final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10

ในช่วงการวิเคราะห์ melting phase จะทำการตรวจวัดในช่วงแสงที่มีความยาวคลื่นแสง 640 นาโนเมตร และตรวจวัดตั้งแต่อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ซึ่งในการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในช่วงนี้ จะเพิ่มขึ้นในอัตรา 0.11 องศาเซลเซียส / นาที

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การย้อมสี AFB

จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะทั้งหมด 96 ราย ให้ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็น culture negative ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมาทำการย้อม AFB พบว่ามีผู้ป่วย

10 ราย ที่ให้ผลเป็น AFB positive คิดเป็น 10.42 เปอร์เซ็นต์ และผู้ป่วยอีก 86 ราย เป็น AFB negative คิดเป็น 89.58 เปอร์เซ็นต์

การจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วย melting curve analysis

ในการจัดจำแนกเชื้อ *Mycobacterium* จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยใช้การวิเคราะห์ melting curve analysis ผลการศึกษาพบว่า *M. tuberculosis* มีค่า melting temperature อยู่ในช่วง 64.28 – 65.12 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่สูงที่สุด และทำให้เชื้อ *M. tuberculosis* แยกออกจากแบคทีเรียในกลุ่มของ NTM ได้ อย่างชัดเจน (รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ยังไม่สามารถจัดจำแนกเชื้อสายของเชื้อในกลุ่ม NTM ได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม NTM นี้มีค่า melting temperature ที่ซ้อนทับหรือเหลื่อมล้ำกัน ทำให้ยากต่อการระบุเชื้อสายของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวได้ (ตารางที่ 1)

การตรวจหาเชื้อ mycobacteria ด้วย melting curve analysis ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วย

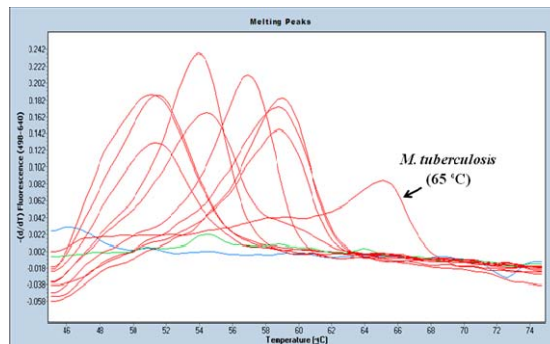
ในการตรวจหาเชื้อ mycobacteria ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยทั้งหมด 96 ราย ซึ่งมีผลเพาะเลี้ยงเชื้อเป็น negative ทั้งหมด และมีผู้ป่วย 10 ราย ที่มีผลการย้อมเป็น AFB positive เมื่อมาทำการตรวจหาเชื้อ mycobacteria ด้วยเทคนิค real time PCR ผลพบว่าผู้ป่วยที่มีผล AFB positive ทั้ง 10 ราย สามารถตรวจพบ melting curve ของเชื้อ mycobacteria ได้ โดยผู้ป่วย 8 ราย ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* และอีก 2 ราย ตรวจพบเชื้อกลุ่ม NTM (รูปที่ 2) นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยที่มีผลการย้อมเป็น AFB negative อีก 5 ราย ก็สามารถตรวจพบเชื้อ mycobacteria ในกลุ่ม NTM ได้เช่นกัน (รูปที่ 3) แต่ไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเป็นเชื้อสายใด (ตารางที่ 2)

โดยทั่วไปการย้อมสี AFB จะมีความไวและความจำเพาะ (sensitivity และ specificity) ที่ต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Hobby et al., 1973; Yeager et al., 1967)

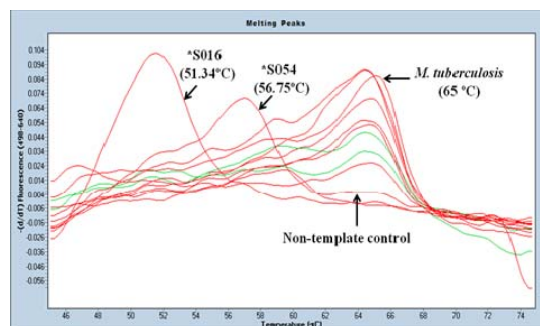
ซึ่งการเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีความจำเพาะสูง แต่ใช้ระยะเวลาที่นานถึง 4-8 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตได้ช้ามาก แต่ในการศึกษาครั้งนี้การเพาะเลี้ยงเชื้อมีข้อจำกัดมากกว่าการย้อม AFB staining โดยพบว่าตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยทั้ง 96 ราย ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงในขณะที่สามารถตรวจพบเชื้อได้ด้วยการย้อม AFB จำนวน 10 ราย สาเหตุอาจเนื่องมาจากผู้ป่วยอาจได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพมาก่อนที่จะได้รับการตรวจเสมหะ ซึ่งยาต้านจุลชีพอาจจะมีผลต่อการเจริญเติบโต

ของเชื้อได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เป็นโรคเกี่ยวกับ cavitory disease ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับยาจำพวก rifampin ซึ่งเคยมีรายงานว่าอาจจะให้ผล culture negative แต่พบ smear positive (Kim et al., 1984) แต่อย่างไรก็ตามอาจเกิดจากในสิ่งส่งตรวจเสมหะที่แบ่งไปเพาะเลี้ยงนั้น มีปริมาณเชื้อที่น้อยมากจึงมีผลต่อการเติบโตของเชื้อ

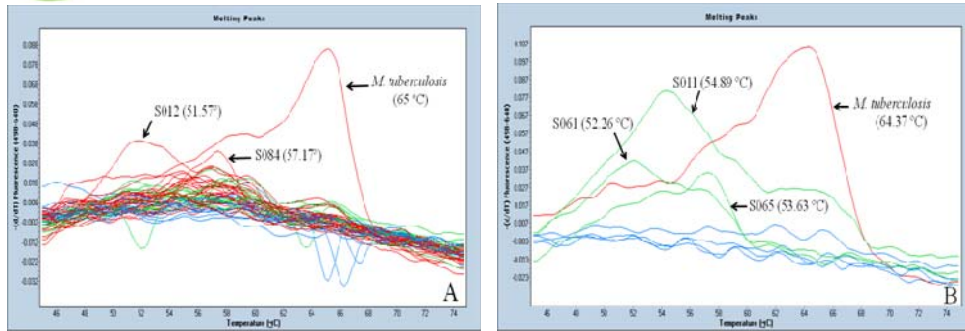
นอกจากนั้นแล้วในการศึกษานี้ ยังพบว่า การตรวจหาเชื้อ mycobacteria ด้วยวิธีการวิเคราะห์ melting temperature มี sensitivity ที่สูงกว่าการย้อม AFB และการเพาะเชื้อ



ภาพที่ 1 กราฟแสดง melting curves ของเชื้อ *Mycobacterium* species ทั้ง 11 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium neoactis*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium smegmetis* และ *Mycobacterium terrae*



ภาพที่ 2 กราฟแสดง melting curves ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะที่มีผลการย้อมเป็น AFB positive



ภาพที่ 3 กราฟแสดง melting curves ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะที่มีผลการเชื่อมเป็น AFB negative

ตารางที่ 1 แสดงอุณหภูมิ melting ของเชื้อ *M. tuberculosis* and Non-tuberculous mycobacteria (NTM)

Mycobacterium species	melting temperature (องศาเซลเซียส)
Tuberculosis	
<i>M. tuberculosis</i>	64.28 – 65.12
Non-tuberculous mycobacteria (NTM)	
<i>M. flavescens</i>	ไม่สามารถตรวจพบ
<i>M. fortuitum</i>	49.03 – 60.71
<i>M. neoactis</i>	50.44 – 51.06
<i>M. nonchromogenicum</i>	50.91 – 51.19
<i>M. intracellulare</i>	53.21 – 53.87
<i>M. terrae</i>	53.68 – 54.36
<i>M. avium</i>	56.46 – 57.22
<i>M. smegmatis</i>	57.72 – 59.40
<i>M. kansasii</i>	58.01 – 58.83
<i>M. scrofulaceum</i>	58.16 – 59.56

ตารางที่ 2 แสดงผลการเชื่อม AFB และผล real-time PCR ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะ

AFB results (No. of patients)	No. of patients with Real-time PCR result		
	Positive		Negative
	<i>M. tuberculosis</i>	Non-tuberculous mycobacteria	
AFB positive (10)	8	2	0
AFB negative (86)	0	5	81
Total	8	7	81

สรุปผลการวิจัย

การตรวจหาเชื้อ mycobacteria ด้วยเทคนิค real-time PCR (LightCycler480 system) โดยใช้ melting curve analysis สามารถจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม NTM ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเสมหะของผู้ป่วยได้ และจากผลการศึกษานี้พบว่าวิธี melting curve analysis มี sensitivity ที่สูงกว่าการย้อม AFB และ sputum culture ซึ่งการจัดจำแนกเชื้อทั้งสองกลุ่มด้วย melting curve analysis สามารถนำไปพัฒนาในการตรวจหาเชื้อวัณโรคขั้นต้นในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปีภาคต้น ปีการศึกษา 2552 และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีวะวิทยาคลินิก โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บสิ่งส่งตรวจและเครื่องมือที่ใช้ในการปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, M., and Aziz, S. 1998. Pattern of tuberculosis in general practice. *J Pak Med Assoc.* 48(6):183-4.

Akcan, Y., Tuncer, S., Hayran, M., Sungur, A., and Unal, S. 1997. PCR on disseminated tuberculosis in bone marrow and liver biopsy specimens: correlation to histopathological and clinical diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 29(3):271-4.

Akpek, G., Lee, SM., Gagnon, DR., Cooley, TP., and Wright, DG. 2001. Bone marrow aspiration, biopsy, and culture in the evaluation of HIV-infected patients for invasive mycobacteria

and histoplasma infections. *Am J Hematol.* 67(2):100-6.

Amita, J., Vandana, T., Guleria, R.S., and Verma, R.K. 2002. Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. *Mol Biol Today.* 3: 43-50.

Butt, T., Ahmad, RN., Kazmi, SY., Afzal, RK., and Mahmood, A. 2003. An update on the diagnosis of tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak.* 13(12):728-34.

Carrol, ED., Clark, JE., and Cant, AJ. 2001. Non-pulmonary tuberculosis. *Paediatr Respir Rev.* 2(2):113-9.

Hillemann, D., Galle, J., Vollmer, E., and Richter, E. 2006. Real-time PCR assay for improved detection of Mycobacterium tuberculosis complex in paraffin-embedded tissues. *Int J Tuberc Lung Dis.* 10(3):340-2.

Hobby, GL., Holman, AP., Iseman, MD., and Jones, JM. 1973. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agent Chemother.* 4(2):94-104.

Hodes, RM., and Seyoum, B. 1989. The pattern of tuberculosis in Addis Ababa, Ethiopia. *East Afr Med J.* 66(12):812-8.

Katz, I., Rosenthal, T., and Michaeli, D. 1985. Undiagnosed tuberculosis in hospitalized patients. *Chest.* 87(6):770-4.

Kim, TC., Blackman, RS., Heatwole, KM., Kim, T., and Rochester, DF. 1984. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 129:264-68.

- Kinoshita, M., Ichikawa, Y., Koga, H., Sumita, S., and Oizumi, K. 1994. Re-evaluation of bone marrow aspiration in the diagnosis of miliary tuberculosis. *Chest*.106(3):690-2.
- Leahy, JF., Millar, J., and Fitzgerald, R. 1994. Mediastinal computed tomography in a British Asian population. *Br J Radiol*. 67(798):535-9.
- Lee, BW., Tan, JA., Wong, SC., Tan, CB., Yap, HK., Low, PS., et al. 1994. The diagnosis of tuberculous meningitis using the polymerase chain reaction. *Singapore Med J*. 35(4):360-3.
- Lundstedt, C., Nyman, R., Brismar, J., Hugosson, C., and Kagevi, I. 1996. Imaging of tuberculosis. II. Abdominal manifestations in 112 patients. *Acta Radiol*. 37(4):489-95.
- Ongut, G., Ogunc, D., Gunseren, F., Ogus, C., Donmez, L., Colak, D., et al. 2006. Evaluation of the ICT Tuberculosis test for the routine diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 6:37.
- Pedro-Botet, J., Gutierrez, J., Miralles, R., Coll, J., and Rubies-Prat, J. 1992. Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients with normal chest radiographs. *Aids*. 6(1):91-3.
- Petitjean, G., Fluckiger, U., Scharen, S., and Laifer, G. 2004. Vertebral osteomyelitis caused by non-tuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Infect*. 10(11):951-3.
- Schaaf, HS., Beyers, N., Gie, RP., Nel, ED., Smuts, NA., Scott, FE., et al. 1995. Respiratory tuberculosis in childhood: the diagnostic value of clinical features and special investigations. *Pediatr Infect Dis J*. 14(3):189-94.
- Shafer, RW., Kim, DS., Weiss, JP., and Quale, JM. 1991. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine (Baltimore)*. 70(6):384-97.
- Shah, SS., McGowan, JP., Klein, RS., Converse, PJ., Blum, S., and Gourevitch, MN. 2006. Agreement between Mantoux skin testing and QuantiFERON-TB assay using dual mycobacterial antigens in current and former injection drug users. *Med Sci Monit*. 12(4):MT11-6.
- Shrestha, NK., Tuohy, MJ., Hall, GS., Reischl, U., Gordon, SM., and Procop, GW. 2003. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 41:5121-5126.
- Small, PM., and Fujiwara, PI. 2001. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*. 345(3):189-200.
- Tong, M., Jacobi, CE., van de Rijke, FM., Kuijper, S., van de Werken, S., Lowary, TL., et al. 2005. A multiplexed and miniaturized serological tuberculosis assay identifies antigens that discriminate maximally between TB and non-TB sera. *J Immunol Methods*. 301(1-2):154-63.
- Torrea, G., Van de Perre, P., Ouedraogo, M., Zougba, A., Sawadogo, A., Dingtounda, B., et al. 2005. PCR-based detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol*. 54(Pt 1):39-44.

Yeager, HJ., Lacy, J., Smith, LR., and LeMaistre,
CA. 1967. Quantitative studies of
mycobacterial populations in sputum and
saliva. *Am Rev Respir Dis.* 95(6):998-1004.