17/2 10/46

การวินิจฉัยวัณโรคด้วยการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี Nested Polymerase Chain Reaction[1]

Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in the Clinical Specimens by Nested Polymerase Chain Reaction

โสภณ สิริสาลี[2] อดิศักดิ์ หนูหน่าย[2] นฤมล บุญญะการกุล[2] ชนานันท์ ขอประเสริฐ[2] ศรีจันทร์ บุญชัย[2]

บทคัดย่อ : โสภณ สิริสาลี อดิศักดิ์ หนูหน่าย นฤมล บุญญะการกุล ชนานันท์ ขอประเสริฐ และ ศรีจันทร์ บุญชัย. 2546. การวินิจฉัยวัณโรคด้วยการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี Nested Polymerase Chain Reaction. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 17 (1) : 37 – 44.

ตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยวัณโรค ด้วยวิธี Nested Polymerase chain reaction (PCR) เปรียบเทียบผลกับการตรวจด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และวิธีการย้อมสีทนกรด โดยนำสิ่งส่งตรวจที่ส่งมาเพื่อการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* มากำจัดเชื้อปนเปื้อนและย่อยลดความเหนียว ด้วยวิธี N-acetyl-L-cysteine-NaOH และแบ่งออกเพื่อตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยการเพาะแยกเชื้อ ย้อมสีทนกรด และวิธี PCR สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ของเชื้อด้วยการต้มใน Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ NaOH ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีใช้ไอโซโปรปานอล (Isopropanol) นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปขยายด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer 2 คู่ จากยีนของแอนติเจนชนิดผิวขนาด 65 กิโลดาลตัน หลังจากนั้นวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ถูกขยายด้วยวิธี agarose-gel electrophoresis ผลการวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจจำนวน 104 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 24.0 ของสิ่งส่งตรวจทั้งหมดสามารถเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* ได้ และให้ผลบวกด้วยวิธี PCR ร้อยละ 51.9 ให้ผลลบด้วยการตรวจทั้ง 2 วิธีนี้ ร้อยละ 16.4 ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR เท่านั้น และร้อยละ 7.6 ให้ผลบวกด้วยวิธีการเพาะเชื้อเท่านั้น เมื่อกำหนดให้วิธีการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคแล้ว พบว่าการตรวจด้วยวิธี PCR มีความไวของการวินิจฉัยโรคเป็นร้อยละ 75.8

คำสำคัญ : ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซีส การวินิจฉัย โพลีเมอเรสเชนรีแอคชัน การเพาะแยกเชื้อ การย้อมสีทนกรด

[1]ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภททั่วไป
Granted by National Research Council of Thailand

[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา กองการศึกษา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร
Department of Microbiology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok

นิพนธ์ต้นฉบับ

Abstract : Sophon Sirisali, Adisak Noonai, Narumol Boonyakarnkul, Chananan Khoprasert, Srichan Boonchai. 2003. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in the clinical specimens by nested polymerase chain reaction. Thai J Health Res 17 (1) : 37 – 44.

The detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by nested polymerase chain reaction (PCR) was compared with the conventional methods of detection (culture method and acid-fast staining). The collected specimens were decontaminated and digested by using N-acetyl-L-cysteine-NaOH. The treated specimens were divided for the detection of *M. tuberculosis* by culture, acid-fast staining, and PCR. After DNA extraction by boiling in sodium dodecyl sulfate (SDS) and NaOH and purification by isopropanol, PCR was preformed with 2 pairs of specific primers for gene encoding 65 kilodalton surface antigen. The product was analysed by agarose-gel electrophoresis. Of 104 obtained specimens, 24.0% were positive by both conventional techniques while 51.9% were negative in both techniques. Among them, there were 16.4% PCR positive only and 7.7% positive to culturing method only. Considering the culturing method as the gold standard for diagnosis of tuberculosis, the diagnostic sensitivity of PCR was 75.8%.

Key words : *Mycobacterium tuberculosis*, diagnosis, Polymerase chain reaction, culture, acid-fast staining

นิพนธ์ต้นฉบับ

บทนำ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ทั่วไปเพื่อการวินิจฉัยวัณโรค ได้แก่ การตรวจหาเชื้อด้วยการย้อมสีทนกรด (acid-fast staining) และการเพาะแยกเชื้อไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) หรือเรียกว่า Acid Fast Bacilli (AFB) จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย วิธีการเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีการที่ให้การวินิจฉัยที่จำเพาะเจาะจงและถูกต้องที่สุด แต่การเพาะแยกเชื้อนี้ต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 3-4 สัปดาห์เพื่อการเพาะแยกเชื้อ และอีกประมาณ 2-3 สัปดาห์เพื่อการพิสูจน์ชนิด (identify) ของเชื้อ ในขณะที่การย้อมสีสิ่งส่งตรวจเพื่อตรวจหา AFB นั้นสามารถทำได้ภายในเวลาไม่เกิน 20 นาที แต่ความไวของการตรวจวินิจฉัยวิธีนี้ต่ำมากทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัยโรคได้อย่างมาก วิธีการย้อมสีจึงเป็นวิธีที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นเท่านั้น ดังนั้นการวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการทั้งด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อและการย้อมสีเพื่อตรวจหา AFB นี้ มีทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งใช้หลักการของการขยายและตรวจหาดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อ วิธีนี้เป็นวิธีที่ทั้งมีความไวและรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* (Eisenach *et al.*, 1991; Shankar *et al.*, 1991; Yuen *et al.*, 1993) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อไมโคแบคทีเรียมในสิ่งส่งตรวจด้วยวิธี nested PCR และเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อไมโคแบคทีเรียมด้วยวิธี nested PCR กับผลการตรวจหาด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อ และผลการย้อมสีสิ่งส่งตรวจ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

ตัวอย่าง

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ใช้เป็นเสมหะของผู้ป่วยที่ไอออกมาเก็บลงในขวดปากกว้างที่ปราศจากเชื้อ และเก็บรักษาไว้ที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาทดสอบภายใน 1 วัน นำสิ่งส่งตรวจมาย้อมสีทนกรดด้วยวิธีของ Zeihl-Neelsen (Forbes, 1998) และนำส่วนที่เหลือทั้งหมดไปเพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนและลดความข้นเหนียวลงด้วยสารละลายต่อไป

การกำจัดเชื้อปนเปื้อน

เสมหะที่เหลือจากการย้อมสีทนกรดนำมาผสมกับสารละลาย N-acetyl-L-cysteine (NALC) และ NaOH (0.5% NALC, 0.5 N NaOH และ 50 mM Sodium citrate, NALC-NaOH) 5 มล. ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มล. ตั้งไว้ 15 นาที เติม 0.67 M phosphate buffer จนปริมาตรครบ 45 มล. ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ทิ้งส่วนน้ำใส นำตะกอนไปล้างด้วย tris-EDTA-Triton X buffer (TEX) 45 มล. 2 ครั้ง ละลายตะกอนใน TEX 1 มล. แล้วแบ่งสารละลายของตะกอนที่ได้เก็บเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 0.5 มล. นำส่วนหนึ่งไปเพื่อเพาะแยกเชื้อ และอีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจหาดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

การเพาะแยกเชื้อ Mycobacterium

ส่วนหนึ่งของตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนแล้วทั้งหมดนำไปใส่บนผิวหน้าของ Lowenstein-Jensen medium นำไปบ่ม (incubate) ที่ 35°ซ ตรวจดูการเจริญของเชื้อไมโคแบคทีเรียมทุกวัน เมื่อพบการเจริญเป็น

โคโลนีของเชื้อ นำเชื้อไปพิสูจน์ชนิดเชื้อว่าเป็น *M. tuberculosis* ซึ่งจะให้ผลบวกกับการย้อมสีทนกรด และ การทดสอบไนอาซิน (niacin test) ในกรณีที่การเพาะแยกเชื้อไม่มีการเจริญของเชื้อจะตรวจดูทุกวันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ก่อนรายงานเป็นผลลบ

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis*

อีกส่วนหนึ่งของตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนแล้วทั้งหมดนำไปปั่นที่ 13,000 G นาน 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ผสมตะกอนที่เหลือด้วย lysis solution (0.2N NaOH และ 1% Sodium dodecyl sulfate ใน TEX) ที่เตรียมใหม่ทุกวัน 500 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที แล้วแช่ลงในอ่างน้ำแข็งทันที นำไปตกตะกอนโปรตีนออกด้วยการเติม 5 M potassium acetate 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในอ่างน้ำแข็ง นำไปปั่นที่ 13,000 G นาน 1 นาที แยกส่วนน้ำ 750 ไมโครลิตรออกเก็บในหลอดพลาสติคใหม่ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol 750 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่นที่ 13,000 G นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำไป ตะกอนดีเอ็นเอที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผสมกับ tris-EDTA buffer (TE) 300 ไมโครลิตร 3M sodium acetate 30 ไมโครลิตร และ isopropanol 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 G นาน 1 นาที และทิ้งส่วนน้ำไป ผึ่งตะกอนของดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำตะกอนไปละลายด้วย TEX 60 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่ -20 °ซ

DNA Primer

DNA primer ที่เลือกใช้ในขบวนการ nested PCR เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* เป็น oligonucleotide primer 2 คู่ที่เลือกจากยีน (gene) ของแอนติเจนชนิดผิว (surface antigen) ขนาด 65 กิโลดาลตัน ของเชื้อนี้ (Shinnick, 1987) คือ TB12 - TB13 และ TB14 - TB15 ซึ่งมีลำดับของเบสดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Primer และลำดับเบสที่ใช้ในขบวนการ nested PCR สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis*

Primer	Sequence	Length of amplified product (bp)
TB12	5'--CTTGT,CGAAC,CGCAT,ACCCT--3'	298
TB13	5'--AGGCG,TTGGT,TCGCG,AGGGC--3'	
TB14	5'--TGATG,ACGCC,CTCGT,TGCCC--3'	191
TB15	5'--CCAAC,CCGCT,CGGTC,TCAAA--3'	

Nested PCR

ขบวนการ nested PCR เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* มี 2 ขั้นตอน คือ Primary DNA amplification และ Secondary DNA amplification ใน Primary DNA amplification ทำโดยเตรียมสารละลายของดีเอ็นเอที่สกัดได้ 20 ไมโครลิตร กับ TB12, TB13 primers อย่างละ 50 pMole นำไปอุ่นที่ 95°ซ เติมสารละลาย polymerase working solution ที่เตรียมทันทีก่อนใช้ (Taq polymerase 2.5 U, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTP 0.2 mM and glycerol 20% ใน reaction buffer) 75 ไมโครลิตร นำไปขยายดีเอ็นเอในเครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer)

35 รอบ (denaturation 96 °ซ 1 นาที / annealing 60 °ซ 1 นาที / extending 72 °ซ 1 นาที) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ขยายแล้วไปทำ Secondary DNA amplification โดยผสม primary nucleotide product ที่ทำให้เจือจางลง 1:4 เท่า 20 ไมโครลิตร กับ TB14, TB15 primers อย่างละ 50 pMole นำไปขยายดีเอ็นเอเช่นเดียวกับวิธีที่ทำใน Primary DNA amplification

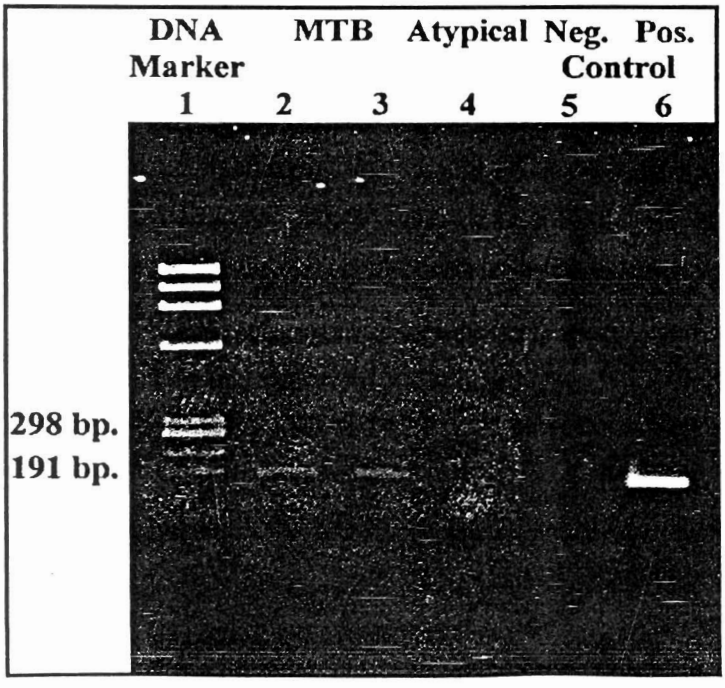
การตรวจสอบดีเอ็นเอที่ขยายแล้ว

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการขยายในขบวนการ nested PCR แล้วไปตรวจสอบ โดยนำดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) บน 2% Nu-Seive agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ผล

ระยะแรกของการศึกษาได้ทดลองวิธีการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (purification) ด้วยวิธีใช้ไอโซโปรปานอล (isopropanol) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Lee (1992) เปรียบเทียบกับวิธีฟีนอล - คลอโรฟอร์ม (phenol-chloroform) (Pierre *et al.*, 1993) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีไอโซโปรปานอลให้ผลการตรวจหาดีเอ็นเอที่ดีกว่าวิธีฟีนอล - คลอโรฟอร์ม

ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ให้ผลบวกหลังจากทำ Nested PCR แล้วนำไปตรวจดูด้วย Nu-Seive agarose gel electrophoresis จะพบแถบของดีเอ็นเอที่ 191 คู่เบส และอาจพบแถบดีเอ็นเอจางๆ ที่ 298 คู่เบส ร่วมอยู่ด้วย ในขณะที่เชื้อไมโคแบคทีเรียมชนิดอื่นที่ก่อโรคคล้ายวัณโรค (atypical Mycobacterium) อาจจะพบแถบดีเอ็นเอจางๆ ได้เฉพาะที่ 298 เท่านั้น (รูปที่ 1) นอกจากนี้ยังได้ทดลองหาจำนวนเชื้อที่น้อยที่สุดที่จะสามารถตรวจพบได้ในสิ่งส่งตรวจ พบว่าสามารถตรวจหาจำนวนเชื้อได้น้อยที่สุด 200 เซลล์ต่อการทดสอบ



รูปที่ 1

Agarose gel electrophoresis ของ amplified products จากการทำ nested PCR ของเชื้อ *M. tubercuolsis* (แถบที่ 2,3) แสดงแถบดีเอ็นเอเข้มที่ 191 คู่เบส และอาจพบแถบจางที่ 298 คู่เบส ร่วมด้วย (แถบที่ 2) ส่วนของ atypical mycobacterium (แถบที่ 4) อาจพบเฉพาะแถบจางที่ 298 คู่เบส เท่านั้น

จากการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ในเสมหะ 104 ตัวอย่าง ด้วยวิธี nested PCR เปรียบเทียบกับการวิธีการเพาะแยกเชื้อ พบว่า ร้อยละ 24.0 ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจให้ผลบวกกับทั้งวิธี PCR และวิธีการเพาะแยกเชื้อ และร้อยละ 51.9 ให้ผลการตรวจเป็นลบด้วยทั้ง 2 วิธีนี้ ร้อยละ 16.4 ให้ผลบวกกับการตรวจด้วยวิธี PCR แต่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* ได้จากในสิ่งส่งตรวจ และร้อยละ 7.7 ให้ผลบวกเฉพาะจากการเพาะแยกเชื้อเท่านั้น (ตารางที่ 2)

เมื่อนำผลการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธี PCR นี้มาเปรียบเทียบกับการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ โดยกำหนดให้วิธีการเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard method) สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคแล้ว พบว่าวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี PCR มีความไวของการวินิจฉัยโรค (diagnostic sensitivity) ร้อยละ 75.8 ในขณะที่วิธีการตรวจด้วยการย้อมสีทนกรดมีความไวของการวินิจฉัยโรคร้อยละ 57.6

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจ 104 ตัวอย่าง ด้วยวิธี Nested PCR และการย้อมสีทนกรด (Acid-Fast Bacilli staining) เปรียบเทียบกับการเพาะแยกเชื้อ (culture)

		การเพาะแยกเชื้อ			ความไว ของการวินิจฉัย	ความจำเพาะ ของการวินิจฉัย
		ผลบวก	ผลลบ	รวม		
วิธี PCR	ผลบวก	25 (24.0%)	17 (16.4%)	42	75.8 %	76.1%
	ผลลบ	8 (7.7%)	54 (51.9%)	62		
	รวม	33	71	104		
การย้อมสี	ผลบวก	19 (18.3%)	3 (2.9%)	22	57.6%	95.8%
	ผลลบ	14 (13.4%)	68 (65.4%)	82		
	รวม	33	71	104		

วิจารณ์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้ไอโซโปรปานอลให้ผลที่ดีกว่าวิธีฟีนอล - คลอโรฟอร์ม อีกทั้งสารที่ใช้ในวิธีนี้เป็นสารที่อันตรายน้อยกว่า แต่การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีไอโซโปรปานอลนี้ใช้เวลาที่นานกว่า

จากผลการเพาะแยกเชื้อพบว่ามีสิ่งส่งตรวจ 1 ตัวอย่าง ที่เพาะแยกได้เชื้อ atypical Mycobacterium และสิ่งส่งตรวจนี้ให้ผลบวกกับการย้อมสี AFB ด้วย แต่ให้ผลการตรวจด้วยวิธี PCR เป็นลบ ผลเช่นนี้เป็นไปได้ที่วิธี PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* หรืออาจเป็นได้ที่ในสิ่งส่งตรวจมี Taq polymerase inhibitor หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างดีเอ็นเอซึ่ง Taq inhibitor จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Taq polymerase เนื่องจากจำนวนสิ่งส่งตรวจที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เพาะแยกเชื้อ atypical Mycobacterium ได้เพียง 1 ตัวอย่าง จึงยังไม่อาจสรุปถึงสาเหตุได้ Clarridge และคณะ (1993) พบว่า การนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจไปตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์ก่อนจะพบ Taq inhibitor ได้ร้อยละ 7.3 ของสิ่งส่งตรวจที่ศึกษา Nolte และคณะ (1993) พบ Taq inhibitor ได้สูงถึงร้อยละ 17 ของสิ่งส่งตรวจ แต่ถ้านำสิ่งส่งตรวจเหล่านี้ไปทำให้บริสุทธิ์แล้วจะพบว่า Taq inhibitor ถูกกำจัดออกได้หมดจากสิ่งสิ่งตรวจทุกตัวอย่าง

การตรวจหาเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธี Nested PCR นี้ พบว่ามีความไวของการวินิจฉัยโรค (diagnostic sensitivity) ร้อยละ 75.8 เมื่อกำหนดให้การเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นวิธีมาตรฐานของการวินิจฉัยวัณโรค นั่นคือ การวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี Nested PCR นี้ให้ผลถูกต้องจริงร้อยละ 75.8 ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค จากการศึกษาของ Shawar และคณะ (1993) พบว่าการวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี PCR มีความไวของการวินิจฉัยโรคเพียงร้อยละ 55 เมื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่ขยายแล้วด้วยวิธี agarose-gel electrophoresis แต่ความไวจะเพิ่มเป็นร้อยละ 74 เมื่อตรวจหาดีเอ็นเอที่ขยายแล้วด้วยวิธี probe hybridization

ความจำเพาะของการวินิจฉัยโรค (diagnostic specificity) ของการตรวจด้วยวิธี Nested PCR ร้อยละ 76.1 นั่นคือ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ ให้ผลการตรวจด้วยวิธี Nested PCR เป็นผลลบ ร้อยละ 76.1 แต่การตรวจด้วยการย้อมสีทนกรดให้ผลลบถึงร้อยละ 95.8 ทั้งนี้เป็นไปได้ที่การตรวจด้วยวิธี Nested PCR มีความไวของการวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ที่สูงกว่า ทำให้สามารถตรวจเชื้อได้ในจำนวนของผู้ป่วยที่สูงกว่า

การวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี PCR นี้ถึงแม้จะให้ผลการตรวจที่รวดเร็วกว่าการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* จากสิ่งส่งตรวจ และถูกต้องกว่าการตรวจด้วยการย้อมสีทนกรด แต่ค่าใช้จ่ายของการตรวจด้วยวิธี PCR นี้ค่อนข้างสูงมาก สำหรับในประเทศไทยการนำวิธี PCR นี้ไปใช้ควรพิจารณาตามความจำเป็นต่อการรักษาและเศรษฐฐานะของผู้ป่วย สภาวะความเจ็บป่วย การดำเนินของโรค และความรุนแรงอาการของโรคประกอบกันไปด้วย ควรใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงต้องการการวินิจฉัยที่เร่งด่วนจริงๆ การตรวจด้วยวิธี PCR นี้จึงยังไม่สามารถนำมาใช้แทนที่การเพาะแยกเชื้อและการย้อมสี AFB ได้ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

Clarride JE III., Shawar RM., Shinnick TM. and Plikaytis BB. 1993. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteiology laboratory. J Clin Microbiol 31: 2049-56.

Eisenach KD., Sifford MD., Cave MD., Bates JH. and Crawford JT. 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 144: 1160-63.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 1998. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 10th ed. Mosby Inc., St. Louis : 745.

Lee FS. 1992. Modified protocol for yeast DNA mini-preparation. Biotech 12 : 677.

Nolte FS., Metchock B., McGowan JE., Edwards A., Okwumabua O., Thurmund C., *et al.* 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. J Clin Microbiol 31 :1777-82.

Pierre C., Olivier C., Lecossier D., Boussougant Y., Yeni P. and Hance AJ. 1993. Diagnosis of primary tuberculosis in children by amplification and detection of Mycobacterial DNA. Am Rev Respir Dis 147: 420-4.

Shankar P., Manjunath N., Mohan KK., Prasad K., Behari M., Shriniwas, *et al.* 1991. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 337: 5-7.

Shawar RM., El-zaatari FAK., Nataraj A. and Clarridge JE. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization method. J Clin Microbiol 31: 61-5.

Shinnick TM. 1987. The 65 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculolsis*. J Bacteriol 169: 1080-8.

Yuen KY., Chan KS., Chan CM., Ho BSW., Dai LK., Chau PY., *et al.* 1993. Use of PCR in routine diagnosis of treated and untreated pulmonary tuberculosis. J Clin Pathol 46: 318-22.