

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

เปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ
Anyplex™ II MTB/MDR Detection กับ Genotype MTBDRplus Ver2.0 สำหรับ
ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน

Efficiency comparison of Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection and
Anyplex™ II MTB/MDR Detection with Genotype MTBDRplus Ver2.0
for detection *Mycobacterium tuberculosis* and MDR-TB

ไกรฤกษ์ สุธรรม วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

Krairerk Suthum B.Sc. (Medical Technology)

ณัฐกัญจน์ ทิพย์เครือ วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

Nattakan Tipkrua M.Sc. (Tropical Medicine)

ศุภฤกษ์ โกมลศิริ วท.ม. (จุลชีววิทยา)

Suparerk Komolsiri M.Sc. (Microbiology)

ผกาพร พุ่มพวง วท.บ. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

Pakaporn Phumpaung B.Sc. (Biological Science)

กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค

Disease Control Medical Laboratory,

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5

Office of Disease Prevention and Control Region 5,

จังหวัดราชบุรี

Ratchaburi

บทคัดย่อ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่มีประสิทธิภาพ ถือเป็นหัวใจสำคัญที่ทำให้การรักษาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาประสบความสำเร็จ ปัจจุบันหลักการทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัย โดยเป็นหลักการที่มีความไวและความจำเพาะสูง ง่าย สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้เป็นวิธีการตรวจเบื้องต้นได้ โดยหลักการทางอณูชีววิทยาที่องค์การอนามัยโลกรับรองให้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคคือ หลักการ Line Probe Assay (LPA) ซึ่งเป็นการใช้วิธี reverse hybridization แต่ในประเทศไทยมีการนำชุดตรวจหลักการ Real-time PCR มาใช้อย่างแพร่หลาย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ Anyplex™ II MTB/MDR Detection ซึ่งเป็นหลักการ Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค (MTB) วัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin (RIF-resistance TB) วัณโรคที่ดื้อต่อยา isoniazid (INH-resistance TB) และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) กับชุดตรวจ Genotype MTBDRplus Ver2.0 ซึ่งใช้หลักการ LPA โดยใช้ตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยที่ส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี จำนวน 147 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า ชุดตรวจหลักการ Real-time PCR นี้ให้ผลสอดคล้องกับหลักการ LPA โดยการตรวจหาเชื้อ MTB, RIF-resistance TB, INH-resistance TB และ MDR-TB มีค่าความไวร้อยละ 100, 88.89, 100 และ 100 มีค่าความจำเพาะ ร้อยละ 100, 99.06, 100 และ 100 มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100, 88.89, 100 และ 100 และมีค่าทำนายผลลบร้อยละ 100, 99.06, 100 และ 100 แสดงให้เห็นว่า การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยหลักการ Real-time PCR นี้มีประสิทธิภาพที่ดีเทียบเท่ากับหลักการ LPA จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคได้ และยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้งานง่าย ช่วยให้รักษาผู้ป่วยได้ทันเวลา เป็นการป้องกันควบคุมวัณโรคไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดสู่ชุมชน

Abstract

Laboratory diagnosis for MTB and drug resistance TB is the main factor for success in tuberculosis treatment. Currently, molecular biology techniques are used for several infectious- diseases diagnostics because of its high sensitivity, high specificity, and uncomplicated, time-consuming effectiveness and could be used for screening tests. Although molecular biology technique for TB diagnostic which is endorsed by the World Health Organization (WHO) is Line Probe Assay (LPA); the reverse hybridization method, but many laboratories in Thailand use Real-time PCR for TB diagnostic instead. This study was aimed to compare Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection and Anyplex™ II MTB/MDR Detection by Real-time PCR method with Genotype MTBDRplus by LPA method for TB diagnosis on rifampicin-resistant TB (RIF-resistant TB), isoniazid-resistant TB (INH-resistant TB) and multidrug-resistant TB (MDR-TB) detection. One hundred and forty seven patients' sputa which obtained from the laboratory of the Office of Disease Prevention and Control Region 5, Ratchaburi were parallelly tested by two methods. The results showed high efficacy of this Real-time PCR system by comparing with LPA. There are 100%, 88.89%, 100% and 100% of the sensitivities, 100%, 99.06%, 100% and 100% of the specificities, 100% 88.89%, 100% and 100% of the positive predictive values and 100%, 99.06%, 100% and 100% of the negative predictive values for TB, RIF-resistant TB, INH-resistant TB and MDR-TB detection, respectively. In conclusion, this Real-time PCR; its simple, convenient and rapid technique, could be the high performance method for TB diagnostic and its TB resistance detection. This method can assist the medical personnel for the proper TB treatments for controlling the spreading out of TB in the communities.

คำสำคัญ

เชื้อวัณโรค, วัณโรคดื้อยาหลายขนาน

Key words

Real-time PCR, Line Probe Assay, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Multidrug-resistance tuberculosis (MDR-TB)

บทนำ

องค์การอนามัยโลก จัดอันดับให้ประเทศไทย เป็น 1 ใน 14 ประเทศ ที่มีปัญหาวัณโรครุนแรง ระดับโลก ทั้งวัณโรคทั่วไป วัณโรคและเอชไอวี และวัณโรค ดื้อยาหลายขนาน โดย พ.ศ. 2559 องค์การอนามัยโลก ได้กำหนดยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (The End TB Strategy) มีเป้าหมายลดอุบัติการณ์วัณโรค ให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสน ประชากรโลก ภายใน พ.ศ. 2578 ซึ่งหนึ่งในยุทธศาสตร์ การยุติวัณโรคคือ การเร่งรัดค้นหาผู้ป่วยวัณโรคให้ ครบคลุมร้อยละ 100 โดยให้กลุ่มเสี่ยงได้รับการ

คัดกรองและวินิจฉัยด้วยวิธีการตรวจที่รวดเร็ว โดยการคัดกรองด้วยภาพถ่ายรังสีทรวงอก ร่วมกับเทคโนโลยี อนุชีววิทยา⁽¹⁾

แต่เดิมการตรวจวิเคราะห์สามารถตรวจได้ หลายวิธีร่วมกัน เพื่อให้การวินิจฉัยและรักษาเกิดขึ้น อย่างมีประสิทธิภาพ ผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อวัณโรค จะ ถูกส่งตรวจฉายรังสีปอด เก็บเสมหะมาทำเสมหะรับบนสไลด์ เพื่อตรวจหาเชื้อ acid fast bacilli (AFB) และทำการ เพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ⁽²⁾ ในการทำ AFB smear เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว ราคาถูก แต่มีความไวต่ำ⁽³⁾ สำหรับการ เพาะเชื้อ ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) มีทั้ง

แบบเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว⁽⁴⁾ ซึ่งวิธีการเพาะเชื้อใช้ระยะเวลาสูงสุดถึง 8 สัปดาห์ ทำให้การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยล่าช้า ส่งผลให้การรักษาและการควบคุมประชากรผู้ติดเชื้อเป็นไปได้ยาก และไม่มีประสิทธิภาพ

เกือบ 10 ปีที่ผ่านมา หลักการทางอณูชีววิทยาได้เข้ามามีบทบาทสำคัญเพื่อช่วยตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน โดยองค์การอนามัยโลก มีมาตรการและกลยุทธ์ต่างๆ เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาให้มีประสิทธิภาพ และได้ผลการตรวจที่รวดเร็ว ซึ่งมีการนำหลักการ Line Probe Assay (LPA) และวิธี Xpert MTB/RIF (หรือ GeneXpert) เข้ามาใช้และให้การรับรอง⁽⁵⁾ หลักการ LPA จะหมายถึง ชุดตรวจ Genotype MTBDRplus (Hain Life Science, Nehren, Germany) ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ส่วนวิธี Xpert MTB/RIF เป็นการนำหลักการ Real-time PCR เพื่อการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งชุดตรวจทั้งสองชนิดดังกล่าวมีการศึกษาว่ามีความไว 98% ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin เมื่อเทียบกับวิธีการทดสอบความไวต่อยาที่เป็นวิธีมาตรฐาน⁽⁶⁻⁷⁾

อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากชุดตรวจทั้งสองชนิดดังกล่าวที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก แล้วนั้นยังมีการศึกษาการใช้ชุดตรวจหลักการ Real-time PCR อื่นๆ⁽⁸⁾ ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เช่น การศึกษาของ Hance AJ และคณะ⁽⁹⁾ ในปี พ.ศ. 2532 เป็นการนำหลักการ PCR เป็นครั้งแรกในการตรวจหาเชื้อวัณโรค การศึกษาของ Patel RJ และคณะ⁽¹⁰⁾ ในปี พ.ศ. 2533 พบว่า หลักการ PCR มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคได้ถึงระดับ 1-100 เฟมโตกรัม (fg) การศึกษาของ Marin M และคณะ⁽¹¹⁾ ในปี พ.ศ. 2547 พบว่า Real-time PCR สามารถตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา rifampicin และ isoniazid จากตัวอย่างในระบบทางเดินหายใจได้โดยมีความไวอยู่ที่ 10³ CFU/mL การศึกษาของไกรฤกษ์ สุธรรม และคณะ⁽⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2556 เป็นการศึกษาชุดตรวจ Anyplex™ plus MDR-TB Detection ซึ่งใช้เทคโนโลยี

Dual Priming Oligonucleotide (DPO) ที่เป็นหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยระบบ BACTEC™ MGIT™ 960 System พบว่า การตรวจหาการดื้อยา INH, RMP และ MDR-TB มีความไวร้อยละ 95.20, 100 และ 94.00 มีความจำเพาะร้อยละ 98.70, 97.60 และ 98.90 มีค่าความถูกต้องร้อยละ 97.10, 98.60 และ 97.10 มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 98.40, 96.40 และ 97.90 มีค่าทำนายผลลบร้อยละ 96.10, 100 และ 96.70 การศึกษาของ Perry MD และคณะ⁽¹²⁾ ในปี พ.ศ. 2557 เปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection กับวิธีการเพาะเชื้อมาตรฐานพบว่า ชุดตรวจมีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เทียบกับวิธี gold standard อยู่ที่ร้อยละ 100, 96.00, 93.00 และ 100 และการศึกษาของ Molina-Moya B และคณะ⁽¹³⁾ ในปี พ.ศ. 2558 พบว่า ชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR/XDR โดยเทคโนโลยี Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension (TOCE) บนพื้นฐานหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคดื้อยา กับการทดสอบความไวต่อยาด้วยระบบ BACTEC พบว่า มีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อที่ดื้อต่อยา isoniazid ที่ร้อยละ 93.30 และ 100 และมีค่าความไว และความจำเพาะในการตรวจเชื้อที่ดื้อต่อยา rifampicin ที่ร้อยละ 100 และ 100 ตามลำดับ

เนื่องจากประเทศไทยได้มีการนำชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ Anyplex™ II MTB/MDR Detection ด้วยหลักการ Real-time PCR มาใช้อย่างแพร่หลาย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ Anyplex™ II MTB/MDR Detection กับชุดตรวจ Genotype MTBDRplus Ver2.0 ที่ใช้หลักการ LPA โดยการเปรียบเทียบจะใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรง ได้แก่ การหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ ในการตรวจ

วิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคเชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา rifampicin เชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา isoniazid และเชื้อวัณโรคติดต่อยา หลายขนานในตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย และหากได้ผล ไม่สอดคล้องกันระหว่าง 2 วิธี จะทำการตรวจวิเคราะห์ ลำดับเบส เพื่อยืนยันผล

วัสดุและวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยที่ส่งตรวจ หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคติดต่อยาหลายขนาน ที่ห้องปฏิบัติการ ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี โดยเป็นกลุ่มตัวอย่างทางคลินิกชนิดเสมหะ จำนวน 147 ตัวอย่าง เก็บจากผู้ป่วยตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงกรกฎาคม 2559

ขั้นตอนการศึกษา นำเสมหะของผู้ป่วย จำนวน 147 ตัวอย่าง ไปตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค และ วัณโรคติดต่อยาหลายขนาน ด้วยชุดตรวจ Genotype MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life-Science, Nehren, Germany) ชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ Anyplex™ II MTB/MDR Detection หากได้ผลไม่สอดคล้องกัน จะทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับ เบสต่อไป

1. การ pre-treatment ตัวอย่างเสมหะเพื่อ ป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ

เทเสมหะลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 mL จำนวน 1 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง หากเสมหะมีปริมาณ มากกว่า 10 mL และหนืดมาก ให้แบ่งตัวอย่างเป็น 2 หลอด เพื่อให้การย่อยเสมหะเป็นไปอย่างทั่วถึง เติมน้ำยา 2%NALC/4%NaOH ประมาณ 1-2 เท่าของปริมาณ เสมหะ ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 15 นาที โดย vortex ทุก 5 นาที เพื่อช่วย ในการย่อยเสมหะ เมื่อครบเวลา 15 นาที เติม PBS pH 6.8 (0.067M) ถึงขีดบอกระดับ 45 mL ผสมให้เข้า กันดี โดยการคว่ำหลอดไปมา 4-5 ครั้ง แล้วนำไปปั่น ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 3,000 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลาให้เทน้ำส่วน บนทิ้งซ้ำ ๆ เพื่อไม่ให้ส่วนของตะกอนที่ก้นหลอดหลุดไป

เติม PBS pH 6.8 (0.067M) ปริมาตร 1.5 mL ลงใน หลอดผสมให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่อง vortex mixer

2. การตรวจหาเชื้อวัณโรค วัณโรคที่ติดต่อยา rifampicin และ isoniazid ด้วยชุดตรวจ Genotype MTBDRplus Ver 2.0 (Hain Life-Science, Nehren, Germany)

2.1 ขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม ด้วยชุด น้ำยา Genolyse®

ใช้ตัวอย่าง pre-treatment 500 uL ผสมกับ 100 uL ของ Lysis Buffer (A-LYS) บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95°C เติม 100 uL ของ Neutralization Buffer (A-NB) vortex แล้ว centrifuge full speed 15 นาที จะได้ DNA Solution แล้วถ่าย supernatant ลง tube ใหม่

2.2 ขั้นตอนการ Amplification

PCR Amplification

เติม 10 uL Amplification Mixes A (AM-A) และ 35 uL Amplification Mixes B (AM-B) ลงใน PCR tube ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 5 uL DNA solution ทำการ Amplification ด้วยเครื่อง GTQ-Cycler 24 ตามลำดับดังนี้ 15 min 95°C 1 cycle, 30 sec 95°C 20 cycle, 2 min 65°C 20 cycle, 25 sec 95°C 30 cycle, 40 sec 53°C 30 cycle, 40 sec 70°C 30 cycle, 8 min 70°C 1 cycle

Hybridization

ทำการ Hybridization ด้วยเครื่อง GT-Blot 48 (Automate Hybridization Machine) Prewarm HYB และ STR ที่อุณหภูมิ 45°C เตรียม Dilute CON-C และ Sum-C 1:100 ใน Dilution Buffer เติม 20 uL ของ Denaturation Solution ลงใน plastic tray และ เติม 20 uL PCR product แล้ว mix บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม 1 mL ของ Hybridization Buffer วางแผ่น DNA strip ลงใน well ของ plastic tray เขย่า tray บ่มที่ 45°C 30 นาที แล้วดูดทิ้ง เติม 1 mL ของ Stringen Wash Solution บ่มที่ 45°C 15 นาที แล้วดูดทิ้ง c ด้วย 1 mL ของ Rinse Solution 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดทิ้ง เติม 1 mL ของ Diluted Conjugate (10 uL CON-C +

990 uL CON-D) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วดูดทิ้ง ล้าง Strip ด้วย 1 mL ของ Rinse Solution 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดทิ้ง แล้วล้าง strip อีกครั้งด้วย 1 mL ของน้ำกลั่น 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดทิ้ง เติม 1 mL ของ Diluted substrate (10 uL SUB-C + 990 uL SUB-D) บ่ม 6 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดทิ้ง หยุดการทำปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วดูดทิ้ง วางแผ่น strip ไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปติดบนแผ่น MTBDRplus Ver 2.0 worksheet เพื่อแปลผล

3. การตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection วัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin และ isoniazid ด้วยชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR Detection

3.1 การสกัดสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ MagLEAD 12gC

นำตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการ pre-treatment ปริมาตร 200 uL มาสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ MagLEAD 12gC (Precision System Science Co., Ltd., Japan) ใช้หลักการ magnetic bead-based extraction โดยเทคโนโลยี Magtration ด้วยน้ำยา MagDEA® Dx SV ใช้เวลาการสกัดในเครื่อง 25 นาที โดยรูปแบบน้ำยาเป็นลักษณะ cartridge ที่บรรจุ น้ำยา Lysis Solution, PK Solution, Carrier Solution, Magnetic beads, Binding Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2 และ Distilled water ซึ่ง eluted nucleic acid ที่ได้จะมีปริมาตร 50 uL

3.2 การตรวจวิเคราะห์และการแปลผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection

นำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค ตามขั้นตอนในคู่มือชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection โดยแต่ละตัวอย่างใช้สารพันธุกรรมที่สกัดได้ 5 uL รวมกับ Master mix 15 uL ประกอบด้วย 2X Anyplex PCR Master Mix (with UDG) 10 uL, 10X MTB/NTM OM 2 uL และ RNase-free water 3 uL ต่อจากนั้นนำเข้าเครื่อง Real-time PCR รุ่น

CFX96 Real-time PCR System (Bio-Rad, USA) ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ initial denaturation 95°C 15 นาที, ทำ PCR 45 รอบ โดย denaturation 95°C 30 วินาที, annealing และ extension 60°C 1 นาที (ตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ขั้นตอนนี้) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลา 2 ชั่วโมง แปลผลการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรมการแปลผลอัตโนมัติ Seegene viewer ซึ่งตัวอย่างที่ถูกแปลผล MTB positive จะมีกราฟ amplification curve เหนือเส้น baseline threshold value ของสี FAM ที่ 1200 โดยมี Ct cutoff value ที่ 40 สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรค ชุดตรวจมี DPO Primer ที่ตรวจจับยีน IS6110 และ MPB64 และในการตรวจวิเคราะห์ที่ครอบคลุมจะมีการควบคุมคุณภาพชุดน้ำยา โดย Positive และ Negative Amplification Controls และใน Master mix มี Internal Control เพื่อช่วยควบคุมการยับยั้งปฏิกิริยาการทำ PCR

3.3 การตรวจวิเคราะห์และการแปลผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin และ isoniazid ด้วย Anyplex™ II MTB/MDR Detection

นำสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ให้ผล MTB positive จากชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin และ isoniazid ตามขั้นตอนในคู่มือชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR Detection โดยแต่ละตัวอย่างใช้สารพันธุกรรม MTB positive ที่สกัดไว้ 5 uL รวมกับ Master mix 15 uL ประกอบด้วย 4X Anyplex PCR Master Mix (with UDG) 5 uL, 4X MTB/MDR TOM 5 uL และ RNase-free water 5 uL ต่อจากนั้น นำเข้าเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Real-time PCR System (Bio-Rad, USA) ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ initial denaturation 95°C 15 นาที, ทำ PCR 50 รอบ โดย denaturation 95°C 30 วินาที, annealing 60°C 1 นาที และ extension 72°C 30 วินาที, ทำ melting analysis โดย pre-melting 55°C 30 วินาที, melting analysis 55°C - 85°C (5 sec/0.5°C) (ตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ขั้นตอนนี้) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลา

2 ชั่วโมง 40 นาที สามารถแปลผลการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรมการแปลผลอัตโนมัติ Seegene viewer สามารถตรวจวิเคราะห์วัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้งหมด 25 ตำแหน่ง สามารถตรวจวัดสัญญาณเป็น melting curve โดยเชื้อ RIF- resistance TB จะถูกวัดที่ช่องสัญญาณ HEX, เชื้อ INH-resistance TB จะถูกวัดที่ช่องสัญญาณ CalRed610 และในการตรวจวิเคราะห์ทุกรอบจะมีการควบคุมคุณภาพชุดตรวจโดย Positive และ Negative Amplification Controls ที่ให้กับชุดน้ำยา และยังมี Wild Type Control เป็นตัวควบคุมคุณภาพที่ใช้ในการเปรียบเทียบ melting curve กับผลของตัวอย่างในการทำงานรอบนั้นๆ และใน Master mix มี Internal Control ที่ช่วยควบคุมการยับยั้งปฏิกิริยาการทำ PCR

4. การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) หากมีตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างการตรวจทั้งสองวิธีนี้ จะทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อยืนยันผล โดยการส่งสารพันธุกรรมที่สกัดโดยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ MagLEAD 12gC ประมาณ 20 uL ไปตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อวัณโรค โดยวิธี Sanger sequencing ที่หน่วยงานภายนอก และวิเคราะห์ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของเชื้อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อดื้อยาในฐานข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรง ได้แก่ การหาความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value: NPV)

ผลการศึกษา

ตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วย จำนวน 147 ตัวอย่าง ได้นำไปศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค วัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin วัณโรคที่ดื้อต่อยา isoniazid และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ได้ผลดังนี้

ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค

จากการตรวจหาเชื้อวัณโรค ในตัวอย่างเสมหะจำนวน 147 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผล MTB positive ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection สอดคล้องกับหลักการ LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 มีจำนวน 115 ราย และตัวอย่างที่ให้ผลเป็น MTB negative สอดคล้องกันจำนวน 32 ราย (ตารางที่ 1) ซึ่ง Real-time PCR มีค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับ LPA

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ MTB ด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

Real-time PCR	Line Probe Assay		
	MTB positive	MTB negative	total
MTB positive	115	-	115
MTB negative	-	32	32
total	115	32	147

ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin และ isoniazid

ตัวอย่างเสมหะที่ให้ผล MTB positive สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี จำนวน 115 ราย ได้ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์การดื้อต่อยา rifampicin และยา isoniazid ด้วย 298

หลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับหลักการ LPA

ผลการทดสอบตรวจวิเคราะห์การดื้อต่อยา rifampicin พบว่า ตัวอย่างที่ให้ผลดื้อต่อยา (resistance) สอดคล้องกัน มีจำนวน 8 ราย ตัวอย่างที่ให้ผลไวต่อยา (susceptible) สอดคล้องกัน มีจำนวน 105 ราย และ

ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน จำนวน 2 ราย โดยมี 1 ตัวอย่าง ให้ผลติดต่อยาด้วยหลักการ Real-time PCR แต่ไวต่อยาด้วยหลักการ LPA และมี 1 ตัวอย่าง ให้ผลไวต่อยาด้วยหลักการ Real-time PCR แต่ติดต่อยา

ด้วยหลักการ LPA ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้ ถูกนำไปตรวจยืนยันผลด้วยการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา Rifampicin (RIF) ด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

Real-time PCR	Line Probe Assay		
	RIF-resistance	RIF-susceptible	total
RIF-resistance	8	1	9
RIF-susceptible	1	105	106
total	9	106	115

จากผลการทดสอบพบว่า Real-time PCR มีค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา RIF ร้อยละ 88.89 ค่าความจำเพาะร้อยละ 99.06 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 88.89 และค่าทำนายผลลบ = 99.06 เมื่อเปรียบเทียบกับ LPA

ผลการทดสอบตรวจวิเคราะห์การติดต่อยา isoniazid พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกัน โดยตัวอย่างที่ให้ผลติดต่อยา มีจำนวน 17 ราย ให้ผลไวต่อยา มีจำนวน 98 ราย (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา Isoniazid (INH) ด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

Real-time PCR	Line Probe Assay		
	INH-resistance	INH-susceptible	total
INH-resistance	17	0	17
INH-susceptible	0	98	98
total	17	98	115

จากผลการทดสอบพบว่า Real-time PCR มีค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ติดต่อยา INH ร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับ LPA

หลายขนาน (MDR-TB) พบว่า ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลสอดคล้องกัน โดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นวัณโรคติดต่อยาหลายขนาน มีจำนวน 6 ราย ส่วนอีก 109 ราย เป็นตัวอย่างที่ไม่ใช่วัณโรคติดต่อยาหลายขนาน ซึ่งอาจจะติดเพียงยาใดยาหนึ่งระหว่าง rifampicin หรือ isoniazid หรือไม่ติดต่อยาทั้งสอง (ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคติดต่อยาหลายขนาน ด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

Real-time PCR	Line Probe Assay		
	MDR-TB	not MDR-TB	total
MDR-TB	6	0	6
not MDR-TB	0	109	109
total	6	109	115

จากผลการทดสอบพบว่า Real-time PCR มีค่าความไวของการตรวจวิเคราะห์วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ร้อยละ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับ LPA

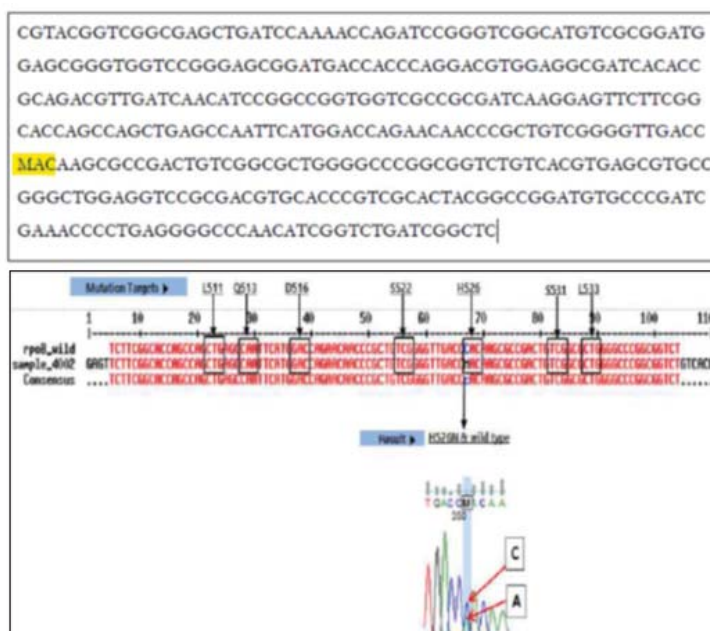
จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่า ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย จำนวน 147 ตัวอย่างที่นำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรค วัณโรคดื้อยา rifampicin วัณโรคดื้อยา isoniazid และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ด้วยหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับหลักการ LPA ได้ค่าสถิติของการตรวจวิเคราะห์เพื่อการประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจ Real-time PCR ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการตรวจวิเคราะห์ด้วยหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับ LPA

testing	sensitivity (%)	specificity (%)	positive predictive value (%)	negative predictive value (%)
MTB	100	100	100	100
RIF	88.89	99.06	88.89	99.06
INH	100	100	100	100
MDR-TB	100	100	100	100

การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะจำนวน 2 ราย ที่ให้ผลการตรวจวิเคราะห์การดื้อต่อยา rifampicin ไม่สอดคล้องกัน พบว่า รายที่ 1 ให้ผลดื้อต่อยา rifampicin ด้วยหลักการ Real-time PCR แต่ไวต่อยา rifampicin ด้วยหลักการ

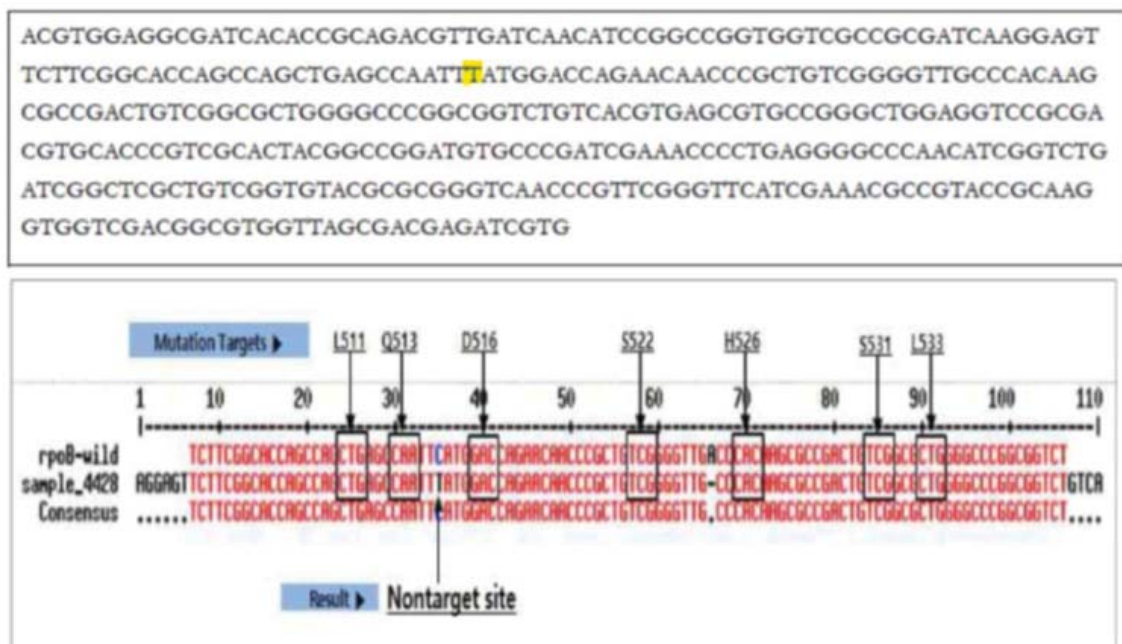
LPA ได้ผลการหาลำดับเบสของยีน *rpoB* เป็นแบบ mix population โดยเป็นทั้ง wild type และ mutant type ที่ตำแหน่ง H526 พบมี peak ของลำดับเบส C (wild type) และ A (mutant type) ซึ่งแสดงผลเป็นตัวอักษร “M” ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลำดับเบสของยีน *rpoB* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา rifampicin ของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างรายที่ 1 ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน ระหว่างการตรวจด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

การตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันในรายที่ 2 ที่ให้ผลไวต่อยา rifampicin ด้วยหลักการ Real-time PCR แต่ไวต่อยา rifampicin ด้วยหลักการ LPA พบว่า ลำดับเบสของยีน *rpoB* มีลำดับเบสที่เป็น mutant type ทำให้

เชื้อไวต่อยา rifampicin แต่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบ ไม่อยู่ในตำแหน่งที่ครอบคลุม โดยการตรวจด้วยหลักการ Real-time PCR ตามที่ระบุในชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR Detection ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลำดับเบสของยีน *rpoB* ที่เกี่ยวข้องกับการไวต่อยา rifampicin ของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างรายที่ 2 ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างการตรวจด้วยหลักการ Real-time PCR และหลักการ LPA

วิจารณ์และสรุป

ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการศึกษาพบว่า การตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา โดยหลักการ Real-time PCR ด้วยชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay ให้ผลสอดคล้องกับหลักการ LPA ด้วยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 เกือบทั้งหมด โดยได้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคเป็นร้อยละ 100 ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา isoniazid และการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคดื้อยา

หลายขนาน (MDR-TB) ด้วยหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับหลักการ LPA ร้อยละ 100 ทั้งหมด การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา rifampicin มีความไวร้อยละ 88.89 ค่าความจำเพาะร้อยละ 99.06 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 88.89 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 99.06 แสดงให้เห็นว่าชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา โดยหลักการ Real-time PCR มีประสิทธิภาพที่ดี เทียบเท่าได้กับระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 หลักการ LPA

ซึ่งเป็นหลักการที่ได้รับการยอมรับโดยองค์การอนามัยโลก ให้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยได้ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่าหลักการ Real-time PCR มีค่าประเมินทางสถิติที่ดีเทียบเท่าได้กับวิธีมาตรฐาน เช่น การวิจัยของไกรฤกษ์ สุธรรม และคณะ⁽⁴⁾ เป็นการศึกษาชุดตรวจ Anyplex™ Assay ที่เป็นหลักการ Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานด้วย BACTEC™ MGIT™ 960 System พบว่า น้ำยา Real-time PCR มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ สำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา rifampicin ร้อยละ 100, 97.60, 96.40 และ 100 และสำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา isoniazid ร้อยละ 95.20, 98.70, 98.40 และ 96.10 และสำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ร้อยละ 94.00, 98.90, 97.90 และ 96.70 ซึ่งเป็นค่าทางสถิติที่ดี และแสดงถึงควมมีประสิทธิภาพของชุดตรวจ รวมทั้งการศึกษาของ Vanessa Deggim-Messmer และคณะ⁽¹⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2559 ได้ศึกษาเปรียบเทียบหลักการ Real-time PCR กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าหลักการ Real-time PCR มีค่าความไวร้อยละ 84.70 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 98.70 เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน

จากกรณีที่พบตัวอย่างให้ผลไม่สอดคล้องกันในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคดื้อยา rifampicin จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้ได้นำไปตรวจยืนยันด้วยการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยวิธี Sanger sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการตรวจทางสารพันธุกรรม เพื่อให้ได้ผลยืนยันในงานทางอณูชีววิทยาที่ถูกต้องที่สุด⁽¹⁵⁾ ผลการตรวจหาลำดับเบสแสดงให้เห็นว่าการตรวจวิเคราะห์ทั้ง 2 หลักการ ไม่มีความผิดพลาดเนื่องจากตัวอย่างรายที่ 1 มีเชื้อแบบผสม (mix population) จึงอาจตรวจพบได้ทั้ง 2 แบบ ส่วนตัวอย่างรายที่ 2 พบมีตำแหน่ง mutation ของเชื้อ แต่ไม่ครอบคลุมการตรวจด้วยชุดตรวจ Real-time PCR ที่ได้มีการระบุไว้ในคู่มือแล้ว ซึ่งในแต่ละชุดตรวจจะมีความครอบคลุมใน

การตรวจตำแหน่งกลายพันธุ์ของเชื้อที่แตกต่างกันไป โดยชุดตรวจทั้งคู่ ยังไม่สามารถตรวจได้ครอบคลุมตำแหน่งกลายพันธุ์ทั้งหมดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการประเมินประสิทธิภาพชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ด้วยหลักการ Real-time PCR พบว่า มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 ด้วยหลักการ LPA ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก อีกทั้งในหลาย ๆ งานวิจัยที่กล่าวถึงยังพบว่า หลักการ Real-time PCR ซึ่งเป็นหลักการทางอณูชีววิทยา สามารถใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยวัณโรคเบื้องต้นได้ มีประสิทธิภาพเทียบได้กับวิธีมาตรฐานเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ Real-time PCR ยังเป็นวิธีที่สะดวก ใช้งานง่าย ทำให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ถูกต้อง และได้รับการรักษาที่มีประสิทธิภาพอย่างทันท่วงที เป็นการป้องกันควบคุมวัณโรคไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดสู่ชุมชน

ข้อเสนอแนะ

ในการเลือกใช้ชุดตรวจ อาจพิจารณาตามความเหมาะสมเนื่องจากมีราคาและปัจจัยอื่นๆ ที่แตกต่างกัน เช่น ราคาต่อรายของชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay ประมาณ 700-1,000 บาท ส่วนราคาต่อรายของชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 เท่ากับ 367 บาท ชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ NTM ได้พร้อมกับการตรวจหา MTB และกรณีที่มีสิ่งส่งตรวจเป็นจำนวนมาก ชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM และ Anyplex™ II MTB/MDR Assay จะมีความเหมาะสมมากกว่า

ข้อจำกัดในการศึกษาวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี เท่านั้น ซึ่งเป็น

ตัวแทนกลุ่มตัวอย่างของเขตสุขภาพที่ 5 เพียงส่วนเดียว ถ้าหากทำการศึกษาวิจัยได้ครอบคลุมจากกลุ่มตัวอย่างทุกภูมิภาคในประเทศไทย อาจจะทำให้ข้อมูลที่ได้มีความเหมาะสมและครบถ้วนมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แผนปฏิบัติการระดับชาติ ด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560-2564. กรุงเทพมหานคร: อักษรกราฟฟิค แอนด์ ดีไซน์; 2560.
2. Kim MJ, Nam YS, Cho SY, Park TS, Lee HJ. Comparison of the Xpert MTB/RIF Assay and Real-time PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Ann Clin Lab Sci 2015;45: 327-32.
3. Zhang ZX, Sng LH, Yong Y, Lin LM, Cheng TW, Seong NH, et al. Delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in AFB smear-negative patients with pneumonia. Int J Tuberc Lung Dis 2017;21:544-9.
4. Suthum K, Tipkrua N. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance testing between Real-time PCR using a Dual Priming Oligonucleotide Method and drug susceptibility testing by The BACTECTM MGITM 960 System. J Med Tech Assoc Thailand 2013;41: 4654-66.
5. Lawn SD, Mwaba P, Bates M, Piatek A, Alexander H, Marais BJ, et al. Advances in tuberculosis diagnostics: the Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point of care test. Lancet Infect Dis 2013;13:349-61.
6. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W. Performance of the genotype MTBDR Line Probe Assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low-and high-level resistance. J Clin Microbiol 2006;44: 3659-64.
7. Rufai SB, Kumar P, Singh A, Prajapati S, Balooni V, Singh S. Comparison of Xpert MTB/RIF with Line Probe Assay for Detection of Rifampin-Monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2014;52:1846-52.
8. Lv Z, Zhang M, Zhang H, Lu X. Utility of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction in Detecting *Mycobacterium tuberculosis*. Biomed Res Int 2017;2017:1-5.
9. Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frébault V, Lecossier D, Rauzier J, Bocart D, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. Mol Microbiol 1989;3:843-9.
10. Patel RJ, Fries JW, Piessens WF, Wirth DF. Sequence analysis and amplification by polymerase chain reaction of a cloned DNA fragment for identification of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1990;28:513-8.
11. Marin M, Viedma DG, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples by real-time PCR. Antimicrob Agents and Chemother 2004; 48:4293-300.
12. Perry MD, White PL, Ruddy M. Potential for use of the Seegene Anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory. J Clin Microbiol 2014;52:1708-10.
13. Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, Pimkina E, Diaz J, García-Sierra N, et al. Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. J Infect 2015; 71:220-30.

14. Deggim-Messmer V, Bloemberg GV, Ritter C, Voit A, Hömke R, Keller PM, et al. Diagnostic molecular mycobacteriology in regions with low tuberculosis endemicity: combining Real-time PCR Assays for detection of multiple mycobacterial pathogens with Line Probe Assays for identification of resistance mutations. *EBioMedicine* 2016;9:228-37.
15. Bakker E. Is the DNA sequence the gold standard in genetic testing? Quality of molecular genetic tests assessed. *Clin Chem* 2006;52:557-8.