



ประสิทธิภาพของ Anyplex™ II MTB/MDR detection สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานเปรียบเทียบกับวิธี drug proportional test

มนิธรา เงินประมวล^{1,2}, โชติชนะ วิไลลักษณ์^{2*}, นิชา เจริญศรี², อรุณนิ สังกา², อรุณวดี ชนงวงศ์²,
อรุณลักษณ์ ลูจิตานนท์², เสกสิทธิ์ สังคีรี², พิสมัย สายสุด²

Received: May 5, 2017

Revised: June 25, 2017

Accepted: July 19, 2017

บทคัดย่อ

เชื้อวัณโรคดื้อยา (Multidrug resistant TB: MDR-TB) เป็นเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ดื้อต่อยาอย่างน้อย 2 ขนาน คือ ยาไรแฟมปีซิน (rifampicin, RIF) และไอโซไนอาไซด์ (isoniazid, INH) เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย โดยทั่วไป การตรวจวินิจฉัย MDR-TB อาศัยการเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยอาหารแข็ง เช่น proportional method และอาหารเหลว เช่น Middlebrook 7H9 ซึ่งใช้เวลานาน สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี นำระบบ Anyplex™ II MTB/MDR detection ร่วมกับเรียลไทม์พีซีอาร์สำหรับตรวจวินิจฉัย MDR-TB เพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการรายงานผล โดยระบบดังกล่าวสามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมปีซิน (rifampicin, RIF) (*rpoB*) ได้ 18 แบบ และการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH (*katG* และ *inhA*) ได้ 7 แบบ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MDR-TB โดย Anyplex™ II MTB/MDR detection กับวิธีมาตรฐานทาง phenotypic คือ proportional method ในเชื้อ MDR-TB ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายกันในพื้นที่ 7 จังหวัด คือ จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ยโสธร อำนาจเจริญ นครพนม มุกดาหาร และสกลนคร ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2555 จำนวน 105 เชื้อ ผลการตรวจโดยวิธี proportional test พบว่า เป็นเชื้อ MDR-TB จำนวน 99 เชื้อ (ร้อยละ 94.3) เชื้อที่ดื้อต่อ INH ชนิดเดียว 3 เชื้อ (ร้อยละ 2.9) และไวต่อยา 2 ชนิด 3 เชื้อ (ร้อยละ 2.9) ระบบ Anyplex II system สามารถวินิจฉัย MDR-TB ได้ 88 เชื้อ (ร้อยละ 88.9) จากการวิเคราะห์ความสอดคล้องผลการวิเคราะห์โดยทั้งสองวิธีตามคุณสมบัติการดื้อยาแต่ละชนิด โดย Cohen's Kappa (K) analysis พบว่า Anyplex II system ให้ค่า K เท่ากับ 0.402 และ 0.73 เมื่อเปรียบเทียบกับ proportional test สำหรับวินิจฉัยการดื้อยา INH และ RIF ตามลำดับ เป็นไปได้ว่า ร้อยละ 11.1 ของ MDR-TB ซึ่งไม่สามารถตรวจวินิจฉัยด้วย Anyplex II system อาจจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการตรวจวินิจฉัยการดื้อยา INH โดยสรุป Anyplex II MTB/MDR detection system สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัย MDR-TB จากผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้อย่างมีประสิทธิภาพตามลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยาจำเป็นต้องศึกษาต่อไปเพื่อประเมินผลความไม่สอดคล้องในการวินิจฉัยการดื้อยาของทั้งสองเทคนิคนี้

คำสำคัญ: วัณโรคดื้อยาหลายขนาน, Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Anyplex, Real-time PCR

¹บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 อุบลราชธานี

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Efficiency of AnyplexTM II MTB/MDR detection for identification of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* compared with drug proportional method

Montira Ngoenpramual^{1,2}, Chotechana Wilailuckana^{2*}, Nicha Charoensri², Arunnee Sangka², Aroonwadee Chanawong², Aroonlux Lulitanond², Seksit Sungkiri², Pitsamai Saysud²

Abstract

Multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) causes the life-threatening pulmonary disease worldwide including Thailand. It resists at least 2 drugs including rifampicin and isoniazid, which are the first-line anti-tuberculous drug of choice. Diagnosis of MDR-TB has generally based on cultivation and anti-tuberculous agent by proportional method and liquid medium that takes at least 2 months to report. Recently, Anyplex^T II MTB/MDR detection system cooperated with real-time PCR were launched for molecular diagnosis of MDR-TB at 10th Office of Disease Prevention and Control, Ubon Ratchathani. The system is able to identify 18 and 7 mutations associated rifampicin (RIF) and isoniazid resistance, respectively. In order to evaluate efficiency of the Anyplex II system, 105 clinical MDR-TB of unrepeated patients from Ubon Ratchathani, Si Sa Ket, Sakon Nakhon, Nakhon Phanom, Amnat Charoen, Mukdahan and Yasothorn isolated were collected during October 2009-September 2012 and stored in at -20°C skimmed milk were enrolled to conducted against the proportional test and Anyplex II system. Ninety-nine isolates (94.3%) were verified as MDR-TB isolates, but the others were identified as INH-resistant (3, 2.9%) and susceptible (3, 2.9%) isolates, respectively. Of 99 MDR-TB, Anyplex II system could identify 88 isolates (88.9%). Inter-rater agreement analysis between the proportional test and Anyplex II system for detection of INH and RIF resistance revealed moderate agreements for detection of INH (Cohen's kappa = 0.402) and good agreement for RIF resistance (Cohen's kappa=0.731), respectively. It implied that the 11.1% of undetectable MDR-TB by Anyplex II system may be associated with the efficiency of INH detection for the MDR-TB strains. In conclusion, Anyplex II MTB/MDR detection system may be an available molecular tool for detection of MDR-TB in Northeastern of Thailand. However, the sequencing of hotspot regions associated with INH and RIF should be further studied in order to evaluate discordant results of these two techniques.

Keywords: Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Anyplex, Real-time PCR

¹Graduate school Khon Kaen University, The Office of Disease Prevention and Control 10, Ubon Ratchathani

²Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

*Corresponding author: (e-mail:wchote@kku.ac.th)

บทนำ

วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามชีวิตของมนุษยชาติมานานหลายร้อยปี ในปี พ.ศ. 2558 มีผู้ป่วยรายใหม่เกิดขึ้นทั่วโลก 10.4 ล้านคน ร้อยละ 60 ของผู้ป่วยรายใหม่เป็นรายงานจากประเทศอินเดีย อินโดนีเซีย จีน ไนจีเรีย ปากีสถานและแอฟริกาใต้ และพบผู้ป่วยรายใหม่ที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, MDR-TB) ประมาณ 480,000 ราย องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่า ประเทศไทยอยู่ในกลุ่มประเทศ 20 อันดับแรกที่มีอุบัติการณ์ติดเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ในช่วง พ.ศ. 2559-2563 ในปี พ.ศ. 2558 ประมาณการผู้ติดเชื้อรายใหม่ 117,000 ราย เป็นผู้ป่วยโรคเอดส์ร่วม 15,000 ราย และมีแนวโน้มพบผู้ป่วยติดเชื้อ MDR-TB เพิ่มขึ้น ประมาณ 4,500 ราย⁽¹⁾ การวินิจฉัย MDR-TB อาศัยการย้อมสีทึบกรด การเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยการทดสอบการดื้อต่อไรแฟมพิซิน (rifampicin, RIF) และไอโซไนอาไซด์ (isoniazid, INH) เป็นอย่างน้อย แม้ว่าจะถือเป็นวิธีมาตรฐานแต่ใช้เวลานาน^(2,3) ในทศวรรษที่ผ่านมา เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมีบทบาทสำคัญสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค และ MDR-TB^(4,5) ในปี พ.ศ. 2555 ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี นำระบบ Anyplex™ II MTB/MDR detection kit (Seegene Technologies, Seoul, Republic of Korea) สำหรับการพิสูจน์ชนิด MDR-TB ระบบดังกล่าวสามารถตรวจพิสูจน์ชนิด MTB complex และคุณสมบัติการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการดื้อยา RIF และ INH โดยใช้เทคโนโลยี dual priming oligonucleotide และ tagging oligonucleotide cleavage-extension ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์^(6,7) สามารถตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในยีน *rpoB* 18 ตำแหน่ง promoter ของยีน *inhA* 3 ตำแหน่ง และยีน *katG* 4 ตำแหน่ง รวม 25 ตำแหน่ง⁽⁸⁾ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการตรวจกับตัวอย่างเชื้อ MDR-TB ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับวิธี drug proportional test

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าดื้อต่อยา RIF และ INH จำนวน 105 เชื้อ ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยไม่ซ้าราย ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2552-กันยายน พ.ศ. 2555 และเก็บรักษาไว้ใน 10% skimmed milk (Oxoid, Hampshire, England) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานีนำเชื้อตัวอย่างดังกล่าว subculture ลงบน Lowenstein-Jensen (LJ) medium หลังจากอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ และตรวจยืนยันสปีชีส์อีกครั้งด้วย SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid test (Standard Diagnostic, Gyeonggi-do, Republic of Korea) ตามวิธีที่บริษัทกำหนด ก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำการทดสอบต่อไป

2. การทดสอบคุณสมบัติดื้อยา RIF และ INH ด้วยวิธี proportional method

เชื้อโคลนของ *M. tuberculosis* 2-3 loop ลงในหลอดบรรจุลูกแก้วขนาด 3 มิลลิเมตร 10 ลูกและน้ำกลั่นไร้เชื้อ 4-5 หยด เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixer 3-4 วินาที เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อเพิ่มเติมอีก 2-4 มิลลิลิตรผสมด้วย vortex อีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ตะกอนเชื้อขนาดใหญ่ตกตะกอน ถ่าย cell suspension ลงในหลอดทดลองแล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ 1 McFarland Standard จากนั้นเจือจางเชื้อลง 10 เท่าเป็นลำดับ (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} dilution) ถ่ายเชื้อในหลอดที่เจือจาง 10^{-4} ปริมาตร 0.1 mL ลงบน LJ-medium ที่มี INH เข้มข้น 0.2 µg/mL, 1 µg/mL และ RIF เข้มข้น 40 µg/mL และ LJ medium ไม่ผสมยาอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ อ่านผลการทดสอบ เชื้อดื้อยาชนิดใดชนิดหนึ่ง เมื่อมีโคลนปรากฏบน LJ medium ที่ผสมยา ในสัดส่วนของจำนวนโคลนมากกว่าหรือเท่ากับ 1% เมื่อเทียบจำนวนบน LJ medium ที่ไม่ผสมยา โดยใช้ *M. tuberculosis* H37Rv ซึ่งไวต่อยา INH และ RIF กับเชื้อวัณโรคดื้อยา INH และ RIF ที่ได้รับจากสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข เป็นเชื้อควบคุม^(2,9)

3. การสกัดดีเอ็นเอของ MDR-TB

ดีเอ็นเอของ MDR-TB ทำการสกัดโดยน้ำยา ExiPrep™ DX Mycobacteria Genomic DNA kits และใช้เครื่อง 16DX automated extraction system (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea) ตามวิธีการที่บริษัทกำหนด ดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ใน elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบ real-time PCR

4. การตรวจวิเคราะห์การดื้อยา RIF และ INH ด้วย Anyplex™ II MTB/MDR detection assay

ถ่ายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรลงใน Anyplex II PCR master mix ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 4XMTB/MDR TOM 5 ไมโครลิตร, 4X Anyplex PCR Master Mix (with UDG) 5 ไมโครลิตรและ RNase-free water 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง CFX96™ real-time PCR system (BioRad Laboratories, Seoul, Republic of Korea) โดยเริ่มจากขั้นตอน Denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 นาที ต่อด้วยปฏิกิริยาฟิซาร์ 50 รอบ (Denaturation 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, Annealing 60 องศาเซลเซียส 60 วินาทีและ Extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที) ต่อด้วยปฏิกิริยาในขั้นตอนของการตรวจจับสัญญาณของสารเรืองแสง อุณหภูมิของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจาก 55 องศาเซลเซียส ไปจนถึง 85 องศาเซลเซียส โดยจะวัดสัญญาณของสารเรืองแสงที่เกิดขึ้นทุก 5 วินาที และจะแสดงค่าออกมาเป็น Melting curve สารเรืองแสง FAM, HEX, Cal Red 610 และ Quasar 670 ใช้สำหรับตรวจจับปฏิกิริยาการมีอินเป้าหมาย MTB, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา RIF, ยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH และ internal control ตามลำดับ ค่า melting Tm ของสารเรืองแสง HEX มีค่าระหว่าง 62.0-70.0 องศาเซลเซียส ส่วนค่า melting Tm ของสารเรืองแสง Cal Red 610 มีค่าระหว่าง 62.0-64.5 องศาเซลเซียส (*katG*) และ 69.5-72.0 องศาเซลเซียส (*inhA*) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบจากโปรแกรมอัตโนมัติ Seegene Viewer 2.0 (Seegene Technologies) ควบคุมกระบวนการทดสอบโดย positive และ negative control ที่มาพร้อมกับชุดทดสอบรวมถึง

การใช้เชื้อ positive (เชื้อวัณโรคดื้อยา INH และ RIF ที่ได้รับจากสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข) และ negative control (*M. tuberculosis* H37Rv)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณความสอดคล้องของการทดสอบโดยใช้ Cohen's Kappa⁽¹⁰⁾ (<https://www.easycalculation.com/statistics/cohens-kappa-index.php>)

ผลการศึกษา

จากตัวอย่าง MDR-TB ที่แยกได้จากผู้ป่วย ระหว่างปี พ.ศ. 2552-2555 จำนวน 105 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค RIF และ INH โดยวิธี proportional test พบว่า เป็นเชื้อดื้อยาทั้งสองชนิด วินิจฉัยเป็น MDR-TB จำนวน 99 เชื้อ (ร้อยละ 94.3) เชื้อดื้อต่อยา INH ชนิดเดียว วินิจฉัยเป็น non-MDR-TB จำนวน 3 เชื้อ (ร้อยละ 2.9) และเชื้อที่ไม่ดื้อยาทั้งสองชนิด วินิจฉัยเป็น susceptible-TB จำนวน 3 เชื้อ (ร้อยละ 2.9) ดังแสดงในตารางที่ 1

การตรวจหาเชื้อดื้อยาโดยใช้ Anyplex II system พบว่าในกลุ่ม MDR-TB จำนวน 99 เชื้อ (ตารางที่ 1) Anyplex II system ให้ผลตรงกับ proportional test คือเป็นเชื้อที่ดื้อยา 2 ชนิด หรือเป็น MDR-TB 88 เชื้อ (ร้อยละ 88.9) แต่ให้ผลการวินิจฉัยต่างจากวิธี proportional test⁽¹¹⁾ เชื้อคือวินิจฉัยผิดพลาดเป็น non-MDR-TB 10 เชื้อ (ร้อยละ 10.1) โดยแบ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา INH ชนิดเดียว จำนวน 3 เชื้อ (ร้อยละ 3) และเชื้อที่ดื้อต่อยา RIF ชนิดเดียว จำนวน 7 เชื้อ (ร้อยละ 7.1) และวินิจฉัยผิดพลาดเป็นเชื้อ susceptible-TB (เชื้อที่ไม่ดื้อยาทั้งสองชนิด) จำนวน 1 เชื้อ (ร้อยละ 1) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า Anyplex II system มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยเชื้อ MDR-TB ได้ถูกต้อง ร้อยละ 88.9

การตรวจหาเชื้อดื้อยาโดยใช้ Anyplex II system ในกลุ่ม non-MDR-TB และ susceptible-TB จำนวน 3 เชื้อ และ 3 เชื้อ ตามลำดับ พบว่า Anyplex II system ให้ผลตรงกับ proportional test ทุกเชื้อ คือตรวจพบเป็นเชื้อที่ดื้อยา INH ชนิดเดียว 3 เชื้อ (ร้อยละ 100) เชื้อที่ไม่ดื้อยา INH และ RIF 3 เชื้อ (ร้อยละ 100) ผล

ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า Anyplex II system มีประสิทธิภาพในการวินิจฉัยเชื้อ non-MDR-TB ได้ถูกต้อง ร้อยละ 100 ในทำนองเดียวกัน หากวิเคราะห์ผลการตรวจของ Anyplex II system ในแง่ของความถูกต้องทางเทคนิคการตรวจการดื้อยาแต่ละชนิด คือ INH หรือ RIF เพียง marker เดียวโดยไม่คำนึงถึง drug resistant marker ของเชื้อในภาพรวม ทำให้จัดจำแนกเชื้อตามการดื้อยา INH หรือ RIF จากผลการตรวจด้วยวิธี proportional test ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อที่ดื้อ INH 102 เชื้อ (เชื้อที่ดื้อยา 2 ชนิด 99 เชื้อ + เชื้อที่ดื้อ INH ชนิดเดียว 3 เชื้อ) และกลุ่มที่ดื้อ RIF 99 เชื้อ (ได้แก่เชื้อที่ดื้อยา 2 ชนิด 99 เชื้อ) เมื่อวิเคราะห์

พบว่า Anyplex II system ตรวจพบการดื้อยา RIF 95/99 เชื้อ (ร้อยละ 96) ในขณะที่ตรวจพบการดื้อยา INH 94/102 เชื้อ (ร้อยละ 92.2) โดยพบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH ที่ตำแหน่ง *katG*82 ตัวอย่าง (ร้อยละ 87.2) ตำแหน่ง promoter หน้า *inhA* 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.6) และพบการกลายพันธุ์ร่วมกันทั้งสองตำแหน่ง 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.1) ผลดังกล่าวเมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อดูค่าความสอดคล้องของวิธี Anyplex II system กับวิธี proportional พบว่ามีค่า Cohen's Kappa เท่ากับ 0.402 สำหรับการตรวจการดื้อต่อยา INH (ตารางที่ 2) และ Cohen's Kappa เท่ากับ 0.731 สำหรับการตรวจการดื้อต่อยา RIF (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยการดื้อยาไอโซไนอาซิดโดยวิธี drug proportional test กับวิธี Anyplex II real-time PCR

Anyplex II System	Drug proportional test		Total
	INH-resistant	INH-susceptible	
INH-resistant	94	0	94
INH-susceptible	8	3	11
Total	102	3	105

INH, isoniazid; Cohen's Kappa, 0.402

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัยการดื้อยาไรแฟมปีซินโดยวิธี drug proportional test กับวิธี Anyplex II real-time PCR

Anyplex II System	Drug proportional test		Total
	RIF-resistant	RIF-susceptible	
RIF-resistant	95	0	95
RIF-susceptible	4	6	10
Total	99	6	105

RIF, rifampicin; Cohen's Kappa, 0.731

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของการวินิจฉัย MDR-TB โดยวิธี drug proportional test กับวิธี Anyplex II real-time PCR

Anyplex II System	Drug proportional test		Total
	MDR-TB	Non-MDR-TB	
MDR-TB	88	0	88
Non-MDR-TB	11	6	10
Total	99	6	105

MDR-TB, RIF and INH resistant MTB isolates; Cohen's Kappa, 0.478

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

MDR-TB ก่อปัญหาสาธารณสุขกับประเทศไทยมากยิ่งขึ้น การวินิจฉัย MDR-TB ได้อย่างรวดเร็ว จึงมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจาย การวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาโดยวิธีอณูชีวโมเลกุลได้รับการพัฒนาในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา เทคนิคสำคัญอาศัยพื้นฐานการตรวจสอบการกลายพันธุ์บนยีนที่กำกับการสร้างเอนไซม์หรือโมเลกุลเป้าหมาย รวมถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบน promoter ของยีน⁽¹¹⁾ การดื้อยา RIF มักมีสาเหตุจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง 81-base pairs hot spot region หรือที่เรียกว่า Rifampicin-resistant determining region (RRDR) ในยีน *rpoB* ส่วนการดื้อยา INH สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ใน *katG*, promoter ของยีน *inhA* และยีนอื่น ๆ เช่น *ndh*, *aphC* และ *furA* เป็นต้น^(12,13)

มีการศึกษาการทดสอบเชื้อดื้อยาด้วย Anyplex ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น การศึกษาของ Sali และคณะ⁽¹⁴⁾ รายงานค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและผลลบ เท่ากับ ร้อยละ 86.4, 99, 98.8 และ 88.4 ตามลำดับสำหรับตัวอย่างส่งตรวจระบบทางเดินหายใจ สำหรับการศึกษาในประเทศไทย ไกรฤกษ์ สุธรรม และคณะ⁽¹⁵⁾ รายงานค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและผลลบต่อการตรวจการดื้อยา INH, RIF และ MDR-TB เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง MGIT 960 มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 95.2, 100 และ 94 ตามลำดับ ความจำเพาะร้อยละ 98.7, 97.6 และ 98.9 ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งสองนี้เป็นตัวอย่างส่งตรวจทางคลินิก แตกต่างจากการศึกษาที่ใช้เชื้อจากโคลนที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ

แต่ผลลัพธ์อัตราการตรวจตรวจวิเคราะห์ MDR-TB ได้ร้อยละ 88.9 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Molina-Moya B และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่า Anyplex II system สามารถวินิจฉัย MDR-TB ได้ร้อยละ 83.3 (30/36)

ผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า AnyplexTM II MTB/MDR system ซึ่งเป็นระบบการตรวจวินิจฉัย MDR-TB เชื่อมโยงกับเรียลไทม์พีซีอาร์ จะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาในกรณีที่ให้ผลดื้อยาทั้งสองชนิด เนื่องจากให้ผลการวินิจฉัยแบบรวดเร็ว เชื่อถือได้ แต่ในกรณีที่ให้ผลดื้อยาตัวใดตัวหนึ่ง หรือไม่ดื้อยา มีข้อควรระวังที่จะเกิดผล false negative result ทำให้แปลผลผิดเป็น non-MDR ประมาณ ร้อยละ 11.9 (การศึกษานี้) ถึงร้อยละ 16.7⁽¹¹⁾

การตรวจวินิจฉัยผิดพลาด (false negative result) นี้ ส่วนใหญ่เกิดจากความผิดพลาดในการตรวจยีนดื้อยา INH (Cohen's Kappa เท่ากับ 0.402) ส่วนน้อยถึงปานกลางเกิดจากความผิดพลาดในการตรวจยีนดื้อยา RIF (Cohen's Kappa เท่ากับ 0.731) และสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า มีปัญหาในการวินิจฉัยการดื้อยา INH ได้ต่ำกว่า RIF (Sali และคณะ)⁽¹⁴⁾ การที่ AnyplexTM II MTB/MDR detection system ไม่สามารถตรวจยีนดื้อยาในสัดส่วนดังกล่าวนี้อาจเกิดจาก primer ใน real time PCR ไม่ครอบคลุมตำแหน่งที่มี mutation ของเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้ การศึกษาหาข้อมูลลำดับเบสการกลายพันธุ์ในยีนดังกล่าวควรมีการทำการการศึกษาต่อไป เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่เชื่อถือได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนนักวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี พ.ศ. 2553 และได้รับการรับรองการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE572168 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคเขต 10 จังหวัดอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บเชื้อตัวอย่างในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva Switzerland: World Health Organization; 2016.
2. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: guides for level III laboratory. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC; 1985.
3. Chang CL, Park TS, Kim MN, Lee NY, Lee HJ, Suh JT. Survey on changes in mycobacterial testing practices in Korean Laboratories. Korean J Clin. Microbiol 2001; 4: 108-14.
4. Gilpin C, Korobitsyn A, Weyer K. Current tools available for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. Ther Adv Infect Dis 2016; 3: 145-51.
5. Leylabadlo HE, Kafil HS, Yousefi M, Aghazadeh M, Asgharzadeh M. Pulmonary tuberculosis diagnosis: Where we are?. Tuberc Respir Dis (Seoul) 2016; 79: 134-42.
6. Chun J Y, Kim K J, Hwang I T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. Nucleic Acids Res 2007; 35: e40.14
7. Lee Y J, Kim D, Lee K, Chun J Y. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. Sci Rep 2014; 4: 7439.
8. Causse M, Ruiz P, Gutierrez JB, Vaquero M, Casal M. New Anyplex II MTB/MDR/XDR kit for detection Of resistance mutations in *M.tuberculosis* cultures. Int J Tuberc Lung Dis 2015; 19: 1542-46.
9. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull World Health Organ 1969; 41: 21-43.
10. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the Kappa statistic Fam Med 2005; 37: 360-3.
11. Molina-Moya B, Lacombe A, Prat C, Pimkina E, Diaz J, Garcia-Sierra N, et al. Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. J Infect 2015; 71: 220-30.
12. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. Annu Rev Microbiol 2007; 61: 35-50.
13. Hazbon MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, Cavatore M, Guerrero MI, Varma-Basil M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2640-9.
14. Sali M, De Maio F, Caccuri F, Campilongo F, Sanguinetti M, Fiorentini S, et al. Multi-center evaluation of Anyplex Plus MTB/NTM MDR-TB Assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and multidrug-resistant isolates in pulmonary and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 2016; 54: 59-63.
15. Suthum K, Nattakan 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 BACTEC™ MGIT™ 960 System. J Med Tech Assoc Thai 2013; 41: 4654-66.