

การศึกษานำร่องเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคปอด ด้วยชุดทดสอบ TB-LAMP และ GeneXpert MTB/RIF

สมพิศ ปิณะเก^{1*}

Received: November 12, 2019

Revised: December 16, 2019

Accepted: December 21, 2019

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจัดเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรค ใช้เวลานาน 3-8 สัปดาห์เนื่องจากเชื้อเจริญช้า การตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความไว ความจำเพาะสูงและให้ผลตรวจที่รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเชื้อ การศึกษานำร่องในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตรวจเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยตรวจเสมหะหา DNA ของเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค Isothermal Amplification (TB – LAMP) และการตรวจด้วยเครื่อง GeneXpert ในกลุ่มผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อวัณโรค โดยใช้ตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจ AFB จำนวน 74 ตัวอย่าง โดยแยกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือตัวอย่างเสมหะที่เหลือจากการตรวจด้วยวิธี AFB และมีผลเป็นบวก (Scanty, 1+, 2+ และ 3+) จำนวน 16 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 คือตัวอย่างเสมหะที่เหลือจากการตรวจด้วยวิธี AFB และมีผลเป็นลบจำนวน 53 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจด้วยเครื่อง GeneXpert และให้ผลเป็นบวก 5 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ 1 ให้ผลการตรวจด้วยเทคนิค TB-LAMP Test และวิธี Xpert MTB/RIF เป็นบวก 16 ตัวอย่างทั้ง 2 วิธี (ผลสอดคล้องร้อยละ 100) กลุ่มที่ 2 ให้ผลการตรวจด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และ TB-LAMP Test เป็นบวกจำนวน 27 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็นการตรวจพบผลบวกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50.9 และ 32.1 ตามลำดับและกลุ่มที่ 3 ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยวิธี TB-LAMP Test จำนวน 5 ตัวอย่าง (ผลสอดคล้องร้อยละ 100) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะทั้ง 74 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Xpert MTB/RIF ให้ผลบวกจำนวน 48 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี TB-LAMP Test พบผลบวกจำนวน 38 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกันคิดเป็นร้อยละ 79 จากข้อมูลเบื้องต้นอนุมานได้ว่าหากนำวิธี TB-LAMP Test ซึ่ง เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่า และมีราคาถูกกว่า วิธี Xpert MTB/RIF มากมาทดสอบกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี AFB ก็จะสามารถตรวจพบผู้ป่วยได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 32 และหากนำวิธี TB-LAMP Test ทดสอบในตัวอย่างที่ AFB ให้ผลการทดสอบทั้งลบและบวก จะสามารถลดปริมาณการทดสอบด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 79 ซึ่งจะนำไปสู่การสนับสนุนการควบคุมและป้องกันวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: วัณโรค, Xpert MTB/RIF, LAMP-TB

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาสารคาม

*ผู้รับผิดชอบบทความ



A preliminary study to compare TB-LAMP assay and geneXpert MTB/RIF for diagnosis of pulmonary tuberculosis

Somphit Pinake^{1*}

Abstract

Tuberculosis is a major public health problem. The gold standard technique for diagnosis of active tuberculosis is detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by culture, which takes 3-8 weeks due to a slow growth rate of the bacilli. Molecular method by nucleic acid amplification technique (NAAT) is an alternative method to detect MTB- specific nucleic acid which provide higher sensitivity, more specificity in a very short time compared to culture. This preliminary study was to compare the performance of molecular techniques for detection the MTB DNA in suspected patient's sputum by Isothermal amplification (TB - LAMP) and GeneXpert. Three categories of 74 tested samples from previous testing left over sputums were included in this study : Group 1 was 16 samples from AFB positive sputum with three positive grading results (Scanty, 1+, 2+ and 3+). Group 2 included 53 negative AFB sputums. Group 3 were 5 positive MTB sputums by GeneXpert MTB/RIF. The results revealed that group 1 sample showed positive results by both methods (100 % concordance). Among group 2 of 53 AFB negative, 27 sputums were found to be positive by Xpert MTB/RIF and 17 were positive by TB-LAMP, demonstrated 50.9 % and 32.1 % increment, respectively. Group 3 gave 5 positive results of TB-LAMP test methods (100 % concordance). In comparison, among 74 samples Xpert MTB/ RIF detected 48 positive while TB-LAMP found 38 positive MTB (79% concordance). The results demonstrated that TB-LAMP could detected MTB in 17 of 53 negative AFB samples with 32 % increment . Therefore, implementing of TB-LAMP which is much cheaper cost and less time consume compared to Xpert MTB/RIF for detecting MTB in AFB negative will be able to reduce using Xpert MTB/RIF testing by at least 79 %, leading to more effectiveness for TB control and prevention.

Keywords: TB, Xpert MTB/RIF, TB-LAMP

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis, TB) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่มีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชากรเป็นอย่างมาก ก่อให้เกิดการเจ็บป่วย เสียชีวิตและสูญเสียทางเศรษฐกิจจากค่าใช้จ่ายในการรักษา มีผลกระทบทั้งกับตัวผู้ป่วยและครอบครัว องค์การสหประชาชาติจึงได้กำหนดเป้าหมายในการยุติการแพร่ระบาดของวัณโรคในปี พ.ศ. 2573 จากรายงานวัณโรคของโลกปี พ.ศ. 2560 องค์การอนามัยโลกคาดประมาณอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรค (รายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ) ของโลกสูงถึง 10.4 ล้านคน (140 ต่อแสนประชากร) และเสียชีวิตสูงถึง 1.7 ล้านคน⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทย องค์การอนามัยโลกจัดให้เป็น 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่มีภาระวัณโรค วัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวีและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน องค์การอนามัยโลกคาดว่าปี พ.ศ.2559 ประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรค รายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ 119,000 ราย ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 10,000 คน และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา RR/MDR-TB 4,700 คน⁽¹⁾ กระทรวงสาธารณสุขได้จัดทำแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560 - 2564 โดยมีเป้าหมายเพื่อลดอัตราอุบัติการณ์ของวัณโรคลงให้เหลือ 88 รายต่อประชากรแสนคนภายในปี พ.ศ.2564 ซึ่งสอดคล้องกับเป้าหมายยุทธศาสตร์ยุติวัณโรคขององค์การอนามัยโลก การดำเนินงานตามแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติประกอบไปด้วย 5 ยุทธศาสตร์คือยุทธศาสตร์ที่ 1 เร่งรัดค้นหาผู้ติดเชื้อวัณโรคและผู้ป่วยวัณโรคให้ครอบคลุมโดยการคัดกรองในกลุ่มเสี่ยงเป้าหมาย ยุทธศาสตร์ที่ 2 ลดการเสียชีวิตในผู้ป่วยวัณโรค ยุทธศาสตร์ที่ 3 พัฒนาศักยภาพบุคลากรเพื่อการป้องกัน ดูแลรักษาและควบคุมวัณโรค ยุทธศาสตร์ที่ 4 สร้างกลไกการบริหารจัดการเชิงยุทธศาสตร์อย่างยั่งยืน และยุทธศาสตร์ที่ 5 ส่งเสริมการวิจัยและพัฒนานวัตกรรม การป้องกัน ดูแลรักษาและควบคุมวัณโรค⁽¹⁾ ปัจจัยที่สำคัญของจำนวนผู้ป่วยและการติดเชื้อวัณโรคคือยาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องคือ วิธีการวินิจฉัยโรคที่มีความไวและความจำเพาะไม่สูงพอ และวิธีตรวจสอบความไวของเชื้อต่อยาที่ให้ผลล่าช้ากว่าจะทราบผลว่ามีการติดเชื้อหรือดื้อยาเกิดขึ้น ผู้ป่วยก็มีโอกาสแพร่เชื้อไปมากแล้ว การพยายามค้นหา

วิธีการวินิจฉัย และการตรวจสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาต้านวัณโรคให้ได้ผลรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อความสำเร็จในการควบคุมและกำจัดโรคนี้

ประเทศไทยได้ใช้วิธี Automated Nucleic Amplification Test ซึ่งเป็นการตรวจหา DNA ของเชื้อวัณโรคด้วยเครื่องอัตโนมัติ GeneXpert MTB/RIF ตามที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรค *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) และการดื้อยา Rifampicin จากตัวอย่างเสมหะโดยตรง โดยกระทรวงสาธารณสุขได้สนับสนุนให้มีการใช้งานเครื่องมือและชุดทดสอบ Xpert MTB/RIF แก่โรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปประจำจังหวัด เพื่อดำเนินงานตามยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค อย่างไรก็ตามการเร่งรัดยุติวัณโรคและการเร่งค้นหาผู้ติดเชื้อวัณโรคในกลุ่มเสี่ยงต่างๆ ทำให้มีตัวอย่างส่งตรวจจำนวนมาก ซึ่งเครื่องตรวจได้ไม่เกิน 4 ตัวอย่างต่อรอบ ใช้เวลาตรวจรอบละ 2 ชั่วโมง จะตรวจได้ไม่เกิน 16 ตัวอย่างต่อวัน ประกอบกับการสนับสนุนน้ำยาตรวจ Xpert MTB/RIF จากกองทุนโลก (Global Fund) จะสิ้นสุดลงในปี 2563 จำนวนตัวอย่างที่มากอาจตรวจได้ไม่ทันเกินความสามารถของเครื่องในแต่ละวัน และโรงพยาบาลชุมชนไม่มีเครื่อง GeneXpert MTB/RIF ยังคงใช้วิธีการย้อมเชื้อ Acid Fast Stain (AFB) จากตัวอย่างเสมหะ ต้องมีเชื้อจำนวนมากจึงจะให้ผลเป็นบวก และการพบเชื้อ AFB ไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อวัณโรค การพัฒนาวิธีการทดสอบโดยเทคโนโลยีอื่นที่พัฒนาขึ้นที่สามารถยืนยันการพบเชื้อวัณโรคที่มีความไวและความจำเพาะสูง รวมทั้งสามารถใช้งานได้ในจุดบริการผู้ป่วย หรือที่เรียกว่า Point of Care Testing (POCT) จึงมีความจำเป็นที่จะช่วยสนับสนุนการดำเนินงานยุติวัณโรคให้ได้ผลตามเป้าหมาย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม DNA ที่ถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นในหลอดทดสอบที่อุณหภูมิคงที่ มีความไวสูงและมีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค วิธีการตรวจง่าย และใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป เช่น

อ่างน้ำร้อน ห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถทำการตรวจได้ และทำการตรวจได้พร้อมกันมากกว่า 10 ตัวอย่างต่อรอบ ให้ผลตรวจเร็วภายใน 30-60 นาที และตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่าจากการสังเกตการเปลี่ยนสี หรือสังเกตความขุ่นของสารที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ DNA ในหลอดทดสอบ ใช้ประโยชน์ในการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจโดยตรง หรือใช้เพื่อตรวจพิสูจน์เชื้อที่เพาะขึ้นชุดทดสอบ TB-LAMP สามารถเตรียมได้เองทำให้มีต้นทุนไม่สูง เมื่อใช้ร่วมกับวิธีการเตรียม DNA อย่างง่ายที่ได้รับ การพัฒนาควบคู่กัน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยวัณโรค โดยตรวจได้ผลถูกต้อง รวดเร็ว และประหยัด จึงได้ร่วมกับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไปในเขตสุขภาพที่ 7 จัดทำโครงการนำร่องเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ของการใช้วิธี TB-LAMP เพื่อการพัฒนางานตรวจวัณโรค ให้ได้ผลถูกต้อง รวดเร็วและประหยัด ซึ่งโรงพยาบาลมหาสารคามได้รับการสนับสนุนเครื่องมือและชุดทดสอบ Xpert MTB/RIF จากกรมควบคุมโรคเมื่อเดือนธันวาคม 2560 และเริ่มให้บริการตรวจวิเคราะห์ในประชากรกลุ่มเสี่ยงและผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะติดเชื้อวัณโรคเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2561 ซึ่งสามารถค้นพบผู้ติดเชื้อวัณโรคในอัตราที่สูงขึ้นกว่าการตรวจโดยการย้อมเชื้อ Acid Fast Stain (AFB)

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะหา DNA ของเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาวิธี TB – LAMP ซึ่งเป็นชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นโดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ กับวิธีตรวจด้วยเครื่อง GeneXpert เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนเพิ่มประสิทธิภาพการค้นหาผู้ติดเชื้อวัณโรคของเครือข่ายห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ จังหวัดมหาสารคามต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างทดสอบ

เสมหะของผู้ป่วยที่แพทย์สงสัยว่าจะติดเชื้อวัณโรค และส่งตรวจ AFB และการตรวจเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วย GeneXpert MTB/RIF แล้วเก็บเสมหะที่เหลือจากการ

ตรวจข้างต้น แยกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ตัวอย่างเสมหะที่มีผล AFB เป็นบวก (Scanty, 1+, 2+ และ 3+) จำนวน 16 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างเสมหะที่มีผล AFB เป็นลบจำนวน 53 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจ GeneXpert MTB/RIF และมีผลเป็นบวก 5 ตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มมาทดสอบด้วย GeneXpert MTB/RIF และชุดทดสอบ TB-LAMP การทดสอบทั้ง 3 วิธี มีรายละเอียด ดังนี้

1. การตรวจ AFB นำเสมหะมาย้อมสีโดยวิธีมาตรฐาน (Ziehl-Neelsen Method) เพื่อหาเชื้อวัณโรค โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งวิธีนี้มีการควบคุมคุณภาพทั้งภายในหน่วยงานและองค์กรภายนอกโดยสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 ขอนแก่นและสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁽²⁾

2. การตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยเครื่องตรวจ GeneXpert MTB/RIF ตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยใช้หลักการตรวจทางอณูชีววิทยาหา DNA ของเชื้อวัณโรค รวมทั้งตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่ดื้อต่อยา Rifampicin ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาวัณโรค วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อได้โดยตรงจากเสมหะ โดยมีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมก่อนการตรวจวัดแบบอัตโนมัติดังนี้ คือ สกัด DNA โดยเติมน้ำยา Sample Reagent (SR) 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีเสมหะ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เขย่าผสมอีกครั้งและตั้งทิ้งไว้ต่ออีก 5 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบน (Supernatant) 2 มิลลิลิตร ใส่ในตลับ (Cartridge) 1 ตลับต่อ 1 ตัวอย่างเสมหะ โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ ปิดฝาตลับก่อนนำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ GeneXpert โดยเครื่องสามารถตรวจได้สูงสุดพร้อมกันครั้งละ 4 ตัวอย่าง เสมหะใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2 ชั่วโมง เครื่องจะแสดงผลผ่านโปรแกรม GeneXpert DX ซึ่งแสดงเป็นผลการตรวจสอบสองส่วนคือ ผลการตรวจพบเชื้อหรือไม่พบเชื้อวัณโรค และผลการตรวจผลการดื้อยา Rifampicin ของเชื้อวัณโรคที่ตรวจพบ เครื่อง GeneXpert มีการควบคุมคุณภาพภายในของผลการตรวจวิเคราะห์ทุกตัวอย่างตามมาตรฐานของเครื่องคือ 1) Sample Processing Control (SPC) เพื่อให้มั่นใจว่ากระบวนการสกัดสารพันธุกรรม (DNA

Extraction) และกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เป้าหมาย (PCR Amplification) มีความสมบูรณ์และไม่มี การยับยั้งกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 2) มีการ ตรวจสอบความสมบูรณ์ของสารละลายที่บรรจุในหลอดว่า มีการละลายที่สมบูรณ์พร้อมใช้งาน และมีการตรวจสอบ ความสมบูรณ์ของ Probe ก่อนทำการเพิ่มปริมาณของ สารพันธุกรรม โดยเครื่องจะแสดงค่าการตรวจสอบทั้งหมด ทุกครั้งที่มีการใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ ⁽²⁾

3. การตรวจทางอณูชีววิทยาด้วยชุดตรวจ TB – LAMP ⁽³⁾ ใช้ชุดทดสอบ TB-LAMP ที่สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาขึ้นโดยเป็นวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ซึ่งมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ เป้าหมายให้มากขึ้นเหมือนกับวิธี PCR แต่มีการทำปฏิกิริยา ที่ง่ายกว่าโดยใช้การทดสอบที่อุณหภูมิเดียว ระยะเวลาสั้น ที่ 1 ชั่วโมงและอ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่า โดยสังเกต จากการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยา โดยขั้นตอนการสกัดสาร พันธุกรรมมีหลายวิธี อาจใช้เสมหะโดยตรงหรือตัวอย่าง เสมหะที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเพื่อตรวจ GeneXpert MTB/RIF และเหลื่อ หรือตัวอย่างเสมหะที่ผ่านขั้นตอน การเตรียมเพื่อตรวจเพาะเชื้อและเหลื่อ

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างที่เหลื่อจาก เสมหะที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเพื่อตรวจวิธี GeneXpert MTB/RIF ปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร ใส่ Screw-cap Centrifuge Tube ขนาด 2.0 มิลลิลิตร เติมน้ำยา Sample Solution A ปริมาณ 200 ไมโครลิตรจากนั้นปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน เสีทิ้ง แล้วเติมน้ำยา Sample Solution B ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนเสีทิ้ง แล้วเติมน้ำยา Sample Solution C ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วปั่นตกหลังจากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิอย่างน้อย 95 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 20 นาที ปั่นตกและวาง หลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสักครู่ หลังจากนั้นดำเนินการ ตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1. การเตรียม Premix Solution

Reagent	ปริมาตร ต่อหน่วย (ul)	จำนวน ตัวอย่าง (x test)	ปริมาตร ที่ต้องใช้ = (ul)
1. 1.6 x LAMP Buffer with Primer Mix	12	12	144
2. BstDNA poly- merase	1	12	12
3. Fluorescent Reagent (FD)	1	12	12
Total	14	14	168

2. ทดสอบปฏิกิริยา : 1) Negative control 2) Sample 3) Positive control

Reagent	Tube: Negative control (ul) (1)	Tube: Sample (ul) (2)	Tube: Positive control (ul) (3)
1.Premix Solution	14	14	14
2.DNA Extract	-	6	6
3.DDW	6	-	-
Total	20	20	20

3. การบ่มปฏิกิริยาการทดสอบ 65 องศา เซลเซียส 60 นาที

4. อ่านผลปฏิกิริยาการทดสอบภายในเวลา 60 นาที โดยสังเกตผลจากการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาด้วยตาเปล่า

- 1) ผล Positive มีการเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็น สีเขียว
- 2) ผล Negative ไม่มีการเปลี่ยนสี (มีสีส้ม คงเดิม)

5. การแปลผล

- 1) ปฏิกิริยาเป็น Positive ตัวอย่างมีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis complex*
- 2) ปฏิกิริยาเป็น Negative ตัวอย่างไม่มีเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis complex*

ผลการศึกษา

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะหา DNA ของเชื้อวัณโรคเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วย GeneXpert MTB/RIF และ Isothermal amplification (TB – LAMP) พบว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ที่มีผลบวกด้วยวิธี AFB ให้ผลการตรวจด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และ TB-LAMP Test เป็นบวก 16 ตัวอย่างทั้ง 2 วิธี ผลสอดคล้องร้อยละ 100 ตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีผลลบด้วยวิธี AFB 53 ตัวอย่างให้ผลการตรวจด้วยวิธี Xpert MTB/

RIF และ TB-LAMP Test เป็นบวกจำนวน 27 และ 17 ตามลำดับ พบผลบวกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 50.9 และ 32.1 ตามลำดับและกลุ่มที่ 3 ตัวอย่างที่มีผลบวกด้วยวิธี Xpert MTB/RIF จำนวน 5 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยวิธี TB-LAMP Test ทั้ง 5 ตัวอย่าง ผลสอดคล้องร้อยละ 100 เมื่อนำข้อมูลตัวอย่างที่มีผลบวกด้วยวิธี Xpert MTB/RIF จากกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 48 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธี TB-LAMP Test พบผลบวกตรงกันจำนวน 38 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 79 (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะด้วยเครื่องตรวจ GeneXpertMTB/RIF และ TB – LAMP

กลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (N)	Xpert MTB/RIF		TB-LAMP	
		Positive (%)	Negative(%)	Positive (%)	Negative(%)
Group 1 AFB positive (Scanty, 1+, 2+ และ 3+)	16	16 (100)	0	16 (100)	0
Group 2 AFB negative	53	27 (50.9)	26 (49.1)	17 (32.1)	36 (67.9)
Group 3 XpertMTB/RIF positive (Trace, Low, Very Low, Medium, High)	5	5 (100)	0	5 (100)	0
Total	74	48 (64.9)	26 (35.1)	38 (51.4)	36 (48.6)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจพบ MTB ด้วย TB LAMP ในตัวอย่างที่ให้ผลลบ AFB อ้างอิงกับ Xpert MTB/RIF

ชุดข้อมูล	AFB Smear		Xpert MTB/RIF (+) (n=48)	หมายเหตุ
	Smear-positive (n=16)	Smear-negative (n=53)		
TB-LAMP	16/16	17/53	38/48	อ้างอิงกับวิธี
(โรงพยาบาล มหาสารคาม)	(100% concordance)	(32 % increment)	(79% concordance)	Xpert MTB/ RIF

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานำร่องในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตรวจเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยตรวจเสมหะ หา DNA ของเชื้อวัณโรคด้วยชุดทดสอบ TB-LAMP Test และ GeneXpert MTB/RIF ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ AFB เป็นบวก ให้ผลการตรวจด้วยวิธี TB-LAMP Test และ Xpert MTB/RIF เป็นบวก 16 ตัวอย่าง ทั้ง 2 วิธี (ผลสอดคล้องร้อยละ 100) กลุ่มตัวอย่างที่ AFB เป็นลบ ให้ผลการตรวจด้วยวิธี TB-LAMP Test และ Xpert MTB/RIF เป็นบวกจำนวน 17 และ 27 ตามลำดับ คิดเป็นการตรวจพบผลบวกเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 32.1 และ 50.9 ตามลำดับ และกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วย Xpert MTB/RIF ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยวิธี TB-LAMP Test จำนวน 5 ตัวอย่าง (ผลสอดคล้องร้อยละ 100) เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะทั้ง 74 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Xpert MTB/RIF ให้ผลบวกจำนวน 48 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี TB-LAMP Test พบผลบวกจำนวน 38 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกันคิดเป็นร้อยละ 79

ผลการศึกษาของจณิสรา ฤทธิเนกสินและคณะ พบว่าเสมหะ AFB บวก ที่ตรวจด้วยวิธี TB-LAMP เมื่อเทียบกับผลเพาะเชื้อมีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 99.04 (PPV ร้อยละ 83.22) เสมหะ AFB ลบ มีความไว (Sensitivity) ร้อยละ 72.73 (NPV ร้อยละ 88.33)⁽³⁾ และจากการเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะวิธี TB-LAMP กับ Xpert MTB/RIF ครั้งนี้พบว่าผลการตรวจเสมหะ AFB ลบให้ผลบวกเพิ่มขึ้นด้วยวิธี TB-LAMP ร้อยละ 32.1 (17/53) วิธี Xpert MTB/RIF ร้อยละ 50.9 (27/53) ซึ่งสูงกว่าการศึกษาของนันทิญา ศรีสุราช และคณะ ที่พบเชื้อเพียงร้อยละ 24.6 (41/167)⁽⁴⁾ ผลการตรวจเสมหะ AFB บวกมีอัตราการพบเชื้อโดยวิธี TB-LAMP และ Xpert MTB/RIF คิดเป็นร้อยละ 100 (16/16) ทั้ง 2 วิธี สอดคล้องกับผลการศึกษาของนันทิญา ศรีสุราชและคณะ ที่พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อโดยวิธี Xpert MTB/RIF คิดเป็นร้อยละ 100 (12/12) ใน AFB บวก⁽⁴⁾ ซึ่งการตรวจด้วยวิธี TB-LAMP มีข้อดีคือ ขั้นตอนการตรวจไม่ยุ่งยากซับซ้อน เครื่องมือราคาไม่แพง น้ำยามีราคาถูก ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำยาได้เอง และแต่ละครั้งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้

จำนวนมากกว่าเครื่อง GeneXpert ที่แม้ว่าขั้นตอนการตรวจง่าย ไม่ยุ่งยากซับซ้อน มีความไวและความจำเพาะสูง^(2, 5) แต่น้ำยามีราคาแพง ใช้เวลาวิเคราะห์นาน 2 ชั่วโมง และตรวจได้เพียงครั้งละ 4 ตัวอย่างและมีเฉพาะในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป จึงทำให้นโยบายคัดกรองกลุ่มเสี่ยงโรควัณโรคดำเนินไปอย่างล่าช้า น้ำยา TB-LAMP ราคาประมาณ 60 บาท/Test ซึ่งน้อยกว่า Xpert MTB/RIF (700 บาท/test) หากนำมาทดสอบในกลุ่มตัวอย่างที่ AFB เป็นบวกและลบ ก่อนการตรวจด้วย Xpert MTB/RIF จะช่วยลดค่าน้ำยาได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 79 และถ้านำวิธี TB-LAMP มาใช้ตรวจแทนวิธี AFB จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเดินทางและลดระยะเวลาการคอยของผู้ป่วยลงประมาณ 2-3 เท่า เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี AFB จะต้องรับการตรวจอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ครั้ง และโรงพยาบาลชุมชนสามารถตรวจวิเคราะห์เทคนิค TB-LAMP ได้ จะช่วยทำให้การควบคุมและป้องกันวัณโรคมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการขยายการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อวัณโรคด้วย GeneXpert MTB/RIF และชุดทดสอบ TB-LAMP โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างและพื้นที่ให้ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย และมีข้อสังเกตเกี่ยวกับการตรวจด้วยชุดทดสอบ TB-LAMP ดังนี้

1. การตรวจด้วยวิธี TB-LAMP Test ของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งนั้น ลำดับขั้นตอนการตรวจต้องปรับ เปลี่ยนไปตามบริบทของแต่ละแห่ง ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบระบบการตรวจเบื้องต้นก่อนการปฏิบัติจริง เนื่องจากผู้ปฏิบัติต้องมีการฝึกทักษะที่มีผลกระทบต่อผลทดสอบก่อนปฏิบัติจริง เช่น การเตรียมตัวอย่างและเตรียมน้ำยาร้อยละจำนวนมากกว่า 20 ตัวอย่างขึ้นไป อาจทำให้ผลคลาดเคลื่อน

2. การอ่านผลการตรวจวิธี TB-LAMP Test ด้วยตาเปล่า เป็นการตัดสินใจของเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงาน ในกรณีตัวอย่างที่เขื่อน้อยมากอาจจะอ่านผลยาก หากมีตู้ UV หรือเครื่องวัดความขุ่น จะช่วยให้การอ่านผลง่ายขึ้น

3. การเตรียมตัวอย่าง DNA เป็นขั้นตอนสำคัญสำหรับการทดสอบ ได้มีการพัฒนาวิธีการเตรียม DNA ขึ้นหลายวิธี เพื่อให้เหมาะสม ประหยัด และห้องปฏิบัติการปฏิบัติได้ การใช้ centrifuge ที่มีความเร็วรอบสูงจะช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพของ DNA ส่งผลต่อความไวของการตรวจด้วย

4. ในการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป ควรมีการเพิ่มการเพาะเชื้อวัณโรค ซึ่งเป็น Gold standard ด้วยทุกตัวอย่าง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร.เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ และคณะที่ให้การฝึกอบรมการตรวจวิเคราะห์และสนับสนุนชุดทดสอบ TB-LAMP ในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่นและคณะที่ได้ประสานงานในการจัดทำโครงการศึกษาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคได้ผลเร็วด้วย TB-LAMP ในโรงพยาบาลมหาสารคาม ตลอดจน ทนพ.รัก พลจำ ห้วนนางาน จุลชีวิทยาคลินิกและบุคลากรของงานจุลชีวิทยาคลินิก โรงพยาบาลมหาสารคามที่ได้สละเวลาช่วยเก็บข้อมูลตรวจวิเคราะห์ และอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. National tuberculosis control programme guidelines. 1st ed. Bangkok: Graphic and Design Letter Publisher; 2018.
2. Sujitra Manakul. The Active Pulmonary Tuberculosis Detection in High-Risk Groups; A Comparison between Acid Fast Bacilli Staining and Gene Xpert Assay. J Med Tech Assoc of Thailand 2016; 44: 5717-24.
3. Rudeeaneksin J., Tanchai H., Kamolwat A., Tan-sripakdeekul P., Phetsuksiri B., Bunchoo S., et al. Rapid Detection of Mycobacterium Tuberculosis Complex in Sputum and in Culture Growth by LAMP Test. JHS 2010; 19: 300-10.
4. Srisurat N., Glasuek V., Mungketklang V., Thanas-rirungkool S., Tuberculosis care development committee. Results of Xpert MTB/RIF method for finding tuberculosis in risk groups patients in Khon Kaen Province. Medical technology department, Khon khaen hospital: 2016. Available from: <http://www.cqihiv.com/QI-Contest2016/>.
5. Ngamlert K. Efficiency of drug resistant Mycobacterium tuberculosis detection between Xpert MTB/RIF and Line Probe Assay using REBA MTB-MDR. J Med Tech Assoc of Thailand 2016; 44: 5535-52.