

การศึกษาประสิทธิภาพการตรวจหาการดื้อยา rifampicin และยา isoniazid ของเชื้อวัณโรค ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0

ปริศนา บัวสกุล ทพ.ม.*

การณส์วีร์ หมั่นหนู วท.ม.

ศิริวรรณ เชียงหลิว วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)

ณัฐนันท์ ฟูเฟื่อง วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)

กลุ่มงานปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอวัยวะโรคติดเชื้อ สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค

บทคัดย่อ

วัณโรค เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข โดยเฉพาะปัญหาวัณโรคดื้อยา ซึ่งได้แก่ ยาไรแฟมพิซิน (RIF) และยาไอโซไนอะซิด (INH) ที่เป็นยาหลักในการรักษา สถาบันบำราศนราดูร ได้นำการตรวจทางอณูชีวโมเลกุล โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (Sanity 2.0) มาทำการทดลองเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยวิธีโลนโพรบแอสเสย์ (LPA) ซึ่งเป็นวิธีที่องค์การอนามัยโรคแนะนำ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา RIF และ INH ในผู้ป่วยวัณโรค จำนวน 50 ตัวอย่าง ผลการตรวจหาวัณโรค พบว่า ชุดตรวจ MTB/MDR (Sanity 2.0) และ LPA ให้ผลการทดสอบตรงกัน คือไม่พบเชื้อ 5 ตัวอย่าง และพบเชื้อ 45 ตัวอย่าง คิดเป็น ค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง ร้อยละ 100 ผลการตรวจค้นหาวัณโรคดื้อยาพบว่า เชื้อที่ไวต่อยาทั้ง 2 ชนิด ให้ผลตรงกัน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 55.6) เชื้อที่ดื้อยา RIF อย่างเดียว ให้ผลตรงกัน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) เชื้อที่ดื้อยา INH อย่างเดียว ให้ผลตรงกัน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.8) เชื้อที่ดื้อต่อทั้งยา RIF และ INH ให้ผลตรงกัน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ให้ผลไม่ตรงกัน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) โดยวิธี LPA ให้ผลดื้อยา INH อย่างเดียว ส่วนชุดตรวจ MTB/MDR (Sanity 2.0) ให้ผลดื้อยาทั้ง 2 ชนิด จากการวิเคราะห์ ด้วยค่า Kappa coefficient (K) ของผลการดื้อยา RIF และ INH ให้ค่า 0.94 และ 1.00 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า การทดสอบทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกัน เมื่อพิจารณาด้านระยะเวลาการรอคอย พบว่าการชุดตรวจ MTB/MDR (Sanity 2.0) ใช้ระยเวลาน้อยกว่า แต่มีราคาสูงกว่าตรวจด้วยวิธี LPA จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าการตรวจด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) สามารถนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีวโมเลกุลได้ ซึ่งจะทำให้ค้นหาผู้ป่วยรวดเร็วขึ้น ผู้ป่วยสามารถเข้ารับการรักษาได้ทันที

คำสำคัญ: วัณโรค, วัณโรคดื้อยา, โลนโพรบแอสเสย์

The Study on the Effectiveness of Detecting Drug Resistance to Rifampicin and Isoniazid in *M. tuberculosis* Using Real-time PCR with the SANITY 2.0 Machine

Prisana Buasakul M.MT*

Karnsuwee Muennoo M.Sc.

Siriwan Seingliw B.Sc. (Med. Tech.)

Nuttanon Fufuang B.Sc. (Med. Tech.)

*Medical Technology and Reference Laboratory for Infectious Diseases,
Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute, Department of Disease Control*

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease that poses a significant public health challenge, especially the problem of drug-resistant tuberculosis, particularly resistance to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH), which are the primary drugs for treatment. Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute has implemented molecular testing using an automated machine with the MTB/MDR test kit (Sanity 2.0) to compare with the Line Probe Assay (LPA) method, which is recommended by the World Health Organization, to evaluate the effectiveness of detecting tuberculosis and RIF and INH resistant tuberculosis in 50 tuberculosis patient samples. For tuberculosis detection results, the MTB/MDR test kit (Sanity 2.0) and LPA showed concordant results: 5 samples were negative and 45 samples were positive for TB, representing sensitivity, specificity, and accuracy of 100%. For drug resistance detection, the results showed that samples susceptible to both drugs matched in 25 samples (55.6%), samples resistant to only RIF matched in 1 sample (2.2%), samples resistant to only INH matched in 8 samples (17.8%), and samples resistant to both RIF and INH matched in 10 samples (22.2%). There was a discordant result in 1 sample (2.2%), where the LPA method showed resistance to INH only, while the MTB/MDR test kit (Sanity 2.0) showed resistance to both drugs. Analysis using the Kappa coefficient (K) for RIF and INH resistance results yielded values of 0.94 and 1.00 respectively, indicating excellent agreement between the two testing methods. When considering the waiting time aspect, it was found that the MTB/MDR test kit (Sanity 2.0) requires less time but costs more than testing with the LPA method. From this study, it can be concluded that testing with the MTB/MDR test kit (SANITY 2.0) can be used for molecular biological analysis, which will expedite patient identification, allowing patients to receive immediate treatment.

Key words: Tuberculosis, Drug-resistant Tuberculosis, Line probe assay (LPA)

*Corresponding Author: Prisana Buasakul

บทนำ

วัณโรค เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เป็นสาเหตุการป่วยและเสียชีวิตในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก สามารถติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศ (airborne transmission) องค์การอนามัยโลก ได้ประมาณการอุบัติการณ์ของวัณโรคทั่วโลกในปี ค.ศ.2023 ไว้ประมาณ 134 ต่อแสนประชากร ซึ่งสูงขึ้นจากปี ค.ศ. 2020 ร้อยละ 4.6 ซึ่งอุบัติการณ์อยู่ที่ประมาณ 129 ต่อแสนประชากร โดยเป็นวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) 436,805 ราย จำนวนผู้ป่วยที่คาดการณ์ว่าจะพัฒนาเป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) หรือวัณโรคดื้อยา rifampicin (RR-TB) คาดว่ามีผู้ป่วยประมาณ 400,000 ราย¹ และได้คาดการณ์อุบัติการณ์วัณโรคของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2566 จะเพิ่มสูงขึ้น อยู่ที่ประมาณ 157 ต่อแสนประชากร หรือประมาณ 113,000 ราย โดยเป็นวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) ประมาณ 9,400 ราย เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) หรือวัณโรคดื้อยา rifampicin (RR-TB) ประมาณ 2,900 รายซึ่งคาดว่าจะพบผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิต 2,000 ราย^{2,3}

องค์การอนามัยโลก ได้มีการกำหนดยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (The End TB strategy) เพื่อเป็นทิศทาง การดำเนินงานวัณโรคให้กับประเทศสมาชิก มีเป้าหมายของการยุติวัณโรค ภายในปี พ.ศ. 2578 (ค.ศ. 2035) โดยมุ่งเน้นลดอัตราการอุบัติการณ์วัณโรคลงร้อยละ 90 ลดจำนวนผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยวัณโรคลง ร้อยละ 95 สำหรับประเทศไทย ได้จัดทำแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560–2564 (เพิ่มเติม พ.ศ.2565) เพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค ขององค์การอนามัยโลก ใช้ในการดำเนินงาน ป้องกัน ดูแลรักษา และควบคุมวัณโรคของประเทศ (อุบัติการณ์ของวัณโรค น้อยกว่า 10 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2578) โดยมีมาตรการที่สำคัญ ได้แก่ เพิ่มการเข้าถึงการวินิจฉัยที่รวดเร็วโดยเทคโนโลยีอนุชีววิทยา โดยเฉพาะในกลุ่มเสี่ยงต่าง ๆ⁴

การวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยเทคโนโลยีอนุชีววิทยา มีหลักการในการเพิ่มปริมาณ

สารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค เพื่อทำให้ตรวจพบได้ง่ายขึ้น และได้เร็วขึ้น ที่องค์การอนามัยโลก แนะนำมีเทคนิค 2 วิธี คือ เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplification) มีทั้งแบบ Real-time PCR เช่น Anyplex™ II MTB/MDR/XDR kit และ Real-time PCR ที่เป็น cartridge-based เช่น Xpert MTB/RIF assay, Xpert MTB/RIF assay (ultra) และเทคนิค amplification and reverse hybridization เช่น Line probe assay (LPA)⁵

การตรวจโดยใช้ชุดน้ำยา Xpert®MTB/RIF Assay ด้วยเครื่อง GeneXpert สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา โดยเป็น fully automate Real-time PCR และจัดเป็นเครื่องมือที่สามารถตรวจให้บริการ ณ จุดที่ทำการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ (point of care testing: POCT)⁴ แต่มีข้อจำกัดคือสามารถตรวจหาการดื้อยาได้เพียง 1 ขนาน ได้แก่ ยา rifampicin

สำหรับการตรวจด้วยวิธี LPA ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ถูกกำหนดในแนวทางการคัดกรองเพื่อค้นหาและวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในกลุ่มประชากรทั่วไปและกลุ่มประชากรหลักที่มีความเสี่ยงต่อวัณโรค (key populations) ข้อดีคือ สามารถตรวจหาการดื้อยาได้ 2 ขนาน ทั้งยา rifampicin และยา isoniazid แต่ใช้เวลาในการตรวจอย่างน้อย 5–7 วัน และมีขั้นตอนซับซ้อน รวมทั้งในการอ่านผลต้องใช้ความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกทำการเปรียบเทียบกับวิธี LPA ซึ่งเป็นการหาตรวจทางอนุชีววิทยา ที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาครอบคลุมยา 2 ขนาน ทั้งยา rifampicin และยา isoniazid กับชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) ที่สามารถรายงานผลได้รวดเร็ว รวมถึงเป็นเครื่องมือที่สามารถตรวจ ณ จุดที่ทำการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ (point of care testing: POCT) การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจหาการติดเชื้อและการดื้อยา rifampicin และยา isoniazid ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0 ในผู้ป่วยวัณโรคปอดที่มีผล sputum AFB smear เป็นผลบวก และเปรียบเทียบผลการตรวจหาการดื้อยา rifampicin

และยา isoniazid กับวิธี LPA ผลการศึกษาจะถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อพิจารณาในการนำมาให้บริการในงานประจำต่อไป หากมีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือดีกว่าการตรวจด้วยวิธี LPA เพื่อให้แพทย์ได้รับการรายงานผลตรวจที่รวดเร็วขึ้นและได้ใช้เป็นแนวทางในการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการตรวจหาการดื้อยา rifampicin และยา isoniazid ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0 ในผู้ป่วยวัณโรคปอดที่มีผล sputum AFB smear เป็นผลบวก
2. เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาการดื้อยา rifampicin และยา isoniazid ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0 กับวิธี Line probe assay

ขอบเขตการศึกษา

เป็นการศึกษาแบบ Experimental Research Design (Comparison of Method) โดยรวบรวมข้อมูลผลตรวจ AFB smear (TB ziehl neelsen set, บ. Biomedica, Thailand) และ Line probe assay โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (บ. Hain Lifescience GmbH, Germany) ที่ส่งตรวจที่งานวัณโรค สถาบันบำราศนราดูร ในช่วงเดือนตุลาคม 2566 – สิงหาคม 2567 จำนวน 50 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทำการทดสอบด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) (บ. Xiamen Zeesan Biotech, China) ที่ห้องปฏิบัติการ งานวัณโรค กลุ่มงานปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอ้าอิงโรคติดเชื้อ

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา ตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยที่ส่งตรวจ ด้วยวิธี Line probe assay และ AFB smear ที่งานวัณโรค สถาบันบำราศนราดูร ระหว่างตุลาคม 2566 – สิงหาคม 2567 เมื่อทราบผลการทดสอบแล้ว (leftover specimen) นำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อประเมินประสิทธิภาพด้วย ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)

จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยการคัดเลือกตัวอย่างที่มีผลการทดสอบ LPA ครอบคลุมค่าต่าง ๆ ของการทดสอบวัณโรคและวัณโรคดื้อยา¹⁴

การตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)^{6, 7}

น้ำยาที่ต้องเตรียมก่อนการทดสอบ (Reagent preparation) ได้แก่ 1.) Positive และ Negative Control ใส่ sterilized purified water ปริมาตร 600 µl เติมนลงใน Positive หรือ Negative Control lyophilized หลังจากผสมแล้วเก็บไว้ที่ -18°C 2.) Poly A Solution เติมน 500 µl purified water ละลายให้เข้ากันเก็บที่ -18°C ได้ 12 เดือน 3.) Buffer T เมื่อเปิดใช้ครั้งแรกให้เติมนสารละลาย 8% NaOH ปริมาตร 25 ml เพื่อให้เป็น working solution

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างก่อนการทดสอบ (Pre-Treat sample) โดยการเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้ 2 แบบ ตามปริมาณเสมหะ หรือภาชนะที่บรรจุ 1) วิธีการเตรียมใน Centrifuge tube ดูด Buffer T ปริมาตร 1 ml ใส่ใน Centrifuge tube จากนั้นดูดเสมหะ ปริมาตร 500 µl ใส่ใน Centrifuge tube Vortex mix นาน 30 วินาที แล้วทำการ Incubate ที่อุณหภูมิ 15 – 30 °C เป็นเวลา 15 นาที 2.) วิธีการเตรียมใน ภาชนะใส่เสมหะ ดูด Buffer T ใส่ใน ภาชนะใส่เสมหะ ในอัตรา Buffer T 2 ส่วน ต่อเสมหะ 1 ส่วน Vortex mix นาน 30 วินาที แล้วทำการ Incubate ที่อุณหภูมิ 15 – 30 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอน ที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 15 – 30 °C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออกแล้วเติมน Buffer F5 ปริมาตร 300 µl ลงใน Centrifuge tube ที่มีตะกอน นำไป Incubate ใน Thermo-mixer comfort ที่อุณหภูมิ 99 °C นาน 10 นาที

ขั้นตอนการทดสอบ (Procedures) ด้วยเครื่อง Sanity 2.0 นำ MTB/MDR test kit วางบนตำแหน่ง Test kit carrier นำตัวอย่างที่ทำการ Pre-treat เรียบร้อยแล้วมาเตรียมไว้ บันทึกข้อมูลลงใน Sample info เติมนตัวอย่างที่ pre-treated specimen ปริมาตร 300 µl หรือ Positive control และ Negative control ปริมาตร 120 µl ลงในช่อง A2 (Extraction loading well) จากนั้นวางชุดน้ำยา

สกัดบน Extraction kit carrier จากนั้นเริ่มการทดสอบ โดยจะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 3 ชั่วโมง 19 นาที

การรายงานผล กรณีไม่พบเชื้อ ผลจะออกเป็น MTB Not-detect และไม่ทำการทดสอบการดื้อยา (Rifampicin; N/A Isoniazid; N/A) กรณีพบเชื้อจะออกผลเป็น MTB Positive และทำการทดสอบการดื้อยา Rifampicin และ Isoniazid ต่อไป ยกเว้นเชื้อมีปริมาณน้อย ($<1,000$ bacilli /ml) ไม่สามารถทำทดสอบได้ ผลจะมาเป็น Unconfirmed drug-resistance กรณีที่มีเชื้อเพียงพอในการตรวจการดื้อยาผลการตรวจที่สามารถเป็นได้ คือ มีความไวต่อยา (susceptible) ถ้าพบการดื้อยาจะรายงานขึ้นที่มีการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาให้ด้วย ได้แก่ พบการดื้อยา Rifampicin (resistant) ยีนดื้อยา rpoB gene ที่ codons 507~533 พบการดื้อยา Isoniazid (Resistant) ยีนดื้อยา InhA promoter region ที่ positions -17~-8 หรือยีนดื้อยา katG ที่ codon 315 หรือ ยีนดื้อยา ahpC promoter region ที่ positions -44 ~-30 และ -15~4

การวิเคราะห์ข้อมูล ทำการบันทึกข้อมูลในโปรแกรม Excel แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาการดื้อยา rifampicin และยา isoniazid ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) เทียบกับวิธี LPA โดยวิเคราะห์ค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive values; PPV) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive values; NPV) และค่าความถูกต้อง (Accuracy) และใช้ค่า Kappa coefficient (K)⁸ เพื่อประเมินค่าการยอมรับและความสอดคล้องกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี กรณีที่ค่า K = 0.00-0.40 คือ ค่าการไม่ยอมรับในความสอดคล้องกันของทั้ง 2 วิธี ค่า K = 0.41-0.60 คือ ค่าการยอมรับได้ในระดับปานกลาง ค่า K = 0.61-0.80 คือ ค่าการยอมรับได้ในระดับดี และค่า K = 0.81-1.00 คือ ค่าการยอมรับในความสอดคล้องกันเป็นอย่างดีของทั้ง 2 วิธี

การพิจารณาของคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการวิจัยนี้ ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาโครงการวิจัย สถาบันบำราศนราดูร รหัสโครงการ S020b/67_ExpD ลงวันที่ 19 ตุลาคม 2567

ผลการศึกษา

จากตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยที่มีผลการทดสอบ Line probe assay และ AFB smear จากงานวัณโรคสถาบันบำราศนราดูร ระหว่างตุลาคม 2566 - สิงหาคม 2567 จำนวน 50 ตัวอย่าง ให้ผล AFB smear เป็นบวกทุกตัวอย่าง ผลการตรวจ LPA แบ่งเป็น ที่มีผล LPA เป็นลบ (LPA Not detected) จำนวน 5 ตัวอย่าง ผล LPA เป็นบวก ให้ผลไวต่อยา RIF และยา INH (LPA Detected + RIF and INH susceptible) จำนวน 25 ตัวอย่าง ผล LPA เป็นบวก ให้ผลไวต่อยา RIF ให้ผลดื้อต่อยา INH (LPA Detected + RIF susceptible and INH resistance) จำนวน 9 ตัวอย่าง ผล LPA เป็นบวก ให้ดื้อต่อยา RIF ให้ผลไวต่อยา INH (LPA Detected + RIF resistance and INH susceptible) จำนวน 1 ตัวอย่าง และผล LPA เป็นบวก ให้ผลดื้อต่อยา RIF และยา INH (LPA Detected + RIF and INH resistance) จำนวน 10 ตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างมาทำการทดสอบด้วย ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) ให้ผลการทดสอบหาการติดเชื้อวัณโรค ดังนี้ ผลบวก (Detected) จำนวน 45 ตัวอย่าง ผลลบ (Not Detected) จำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่อนำค่าวิเคราะห์ทางสถิติมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วย LPA พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกและผลลบ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีค่า Kappa coefficient (K) เท่ากับ 1.00 ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบหาความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา RIF และ INH ด้วยวิธี LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR พบว่าเป็นเชื้อที่ไวต่อยา RIF และ INH จำนวน 25 ตัวอย่าง เชื้อที่ให้ผลดื้อต่อยา RIF อย่างเดียว จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อที่ให้ผลดื้อต่อยา INH อย่างเดียว จำนวน 8 ตัวอย่าง และเชื้อที่ดื้อต่อยา RIF และยา INH

จำนวน 11 ตัวอย่าง ดังนั้นจึงมี 1 ตัวอย่างที่ LPA ให้ (SANITY 2.0) ให้ผลดี้อย่างทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงใน
ผลดี้อย่า INH อย่างเดียว แต่ชุดตรวจ MTB/MDR ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบผลการทดสอบหาการติดเชื้อวัณโรค (MTB) ด้วยวิธี LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)

MTB	LPA							
	Not detected	Detected	Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV*	NPV*	Kappa
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(K)
SANITY 2.0			100	100	100	100	100	1.00
– Not detected	5	0						
– Detected	0	45						

* PPV = Positive predictive values, NPV = Negative predictive values

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการทดสอบหาการติดเชื้อวัณโรคดื้อยา (MDR) ด้วยวิธี LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)

MDR	LPA				
	RIF+INH Susceptible	RIF Resistance	INH Resistance	RIF+INH Resistance	Total
SANITY 2.0					
- RIF+INH Susceptible	25	0	0	0	25
- RIF Resistance	0	1	0	0	1
- INH Resistance	0	0	8	0	8
- RIF+INH Resistance	0	0	1	10	11
Total	25	1	9	10	45

เมื่อพิจารณาในรายละเอียดของยีนแสดงออก
ว่าที่มีการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการดื้อยา RIF พบว่า
ด้วยวิธี LPA ที่ตำแหน่ง rpoB MUT1 (D516V) ให้ผลตรง
กับชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) ที่ rpoB gene
(codons 513~519) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ตำแหน่ง rpoB
MUT2A (H526Y) และ MUT2B (H526D) ให้ผล
ตรงกับชุดตรวจ MTB/MDR ที่ rpoB gene (codons
519~528) จำนวน 3 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ
ที่ตำแหน่ง rpoB MUT3 (S531L) ให้ผลตรงกับชุดตรวจ
MTB/MDR ที่ rpoB gene (codons 529~533) จำนวน
6 ตัวอย่าง และมีจำนวน 1 ตัวอย่างที่ให้ผลไวต่อยา RIF
แต่ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) พบการดื้อยา
ที่ตำแหน่ง rpoB gene (codons 519~528) ดังแสดงใน
ตารางที่ 3

สำหรับการดื้อยา INH การแสดงออกของ
ยีน inhA ที่มีการกลายพันธุ์ ผลการตรวจด้วยวิธี LPA
ที่ตำแหน่ง inhA MUT1 (C-15T) ให้ผลตรงกับชุดตรวจ
MTB/MDR ที่ inhA gene (promoter region positions
-17 ~ -8) จำนวน 7 ตัวอย่าง และการแสดงออกของยีน
katG ที่มีการกลายพันธุ์ ผลการตรวจด้วยวิธี LPA
ที่ตำแหน่ง katG MUT1 (S315T1) และตำแหน่ง katG
MUT2 (S315T2) ให้ผลตรงกับชุดตรวจ MTB/MDR
ที่ katG gene (codon 315) จำนวน 10 ตัวอย่าง จำนวน
2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในส่วนของยีน ahpC ไม่มีตัวอย่าง
ที่พบการดื้อยาในตำแหน่งนี้ ดังแสดงตารางที่ 4

ในตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหาวัณโรคดื้อยา
RIF ไม่สอดคล้องกันด้วยวิธี LPA และชุดตรวจ MTB/
MDR (SANITY 2.0) นั้น ได้นำไปทำการทดสอบซ้ำ

ด้วยชุดตรวจ Xpert MTB/RIF Ultra ด้วยเครื่อง ซึ่งตรงกับผลการตรวจด้วยชุดตรวจ MTB/MDR GeneXpert ซึ่งเป็นชุดตรวจที่สามารถตรวจหาวัณโรค (SANITY 2.0) ดังแสดงในตารางที่ 5
ดื้อยา RIF ได้ ผลการทดสอบพบว่า เป็นดื้อต่อยา RIF

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบหาความไวของเชื้อวัณโรคดื้อยา Rifampicin ด้วย LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) จำแนกตามยีนที่พบการกลายพันธุ์

Rifampicin	LPA				
	Resistance (rpoB gene) ⁹				
	Susceptible	MUT1 (D516V)	MUT2A (H526Y)	MUT2B (H526D)	MUT3 (S531L)
SANITY 2.0					
Resistance (rpoB gene)					
- codons 513~519	0	1	0	0	0
- codons 519~528	1	0	3	1	0
- codons 529~533	0	0	0	0	6

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการทดสอบหาความไวของเชื้อวัณโรคดื้อยา Isoniazid ด้วย LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) จำแนกตามยีนที่พบการกลายพันธุ์

Isoniazid	LPA		
	Resistance (inhA gene) ⁹	Resistance (katG gene) ⁹	
	MUT1 (C-15T)	MUT1 (S315T1)	MUT2 (S315T2)
SANITY 2.0			
Resistance (inhA gene)			
- promoter region (positions -17 ~ -8)	7	0	0
Resistance (katG gene)			
- codon 315	0	10	2
Resistance (ahpC gene)	0	0	0

ตารางที่ 5 ผลที่ไม่สอดคล้องกันในการตรวจหาวัณโรคดื้อยา Rifampicin ด้วยวิธี LPA และชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) และผลการตรวจยืนยันด้วยชุดตรวจ Xpert MTB/RIF Ultra (GeneXpert)

LPA	ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)	Xpert MTB/RIF Ultra (GeneXpert)
Susceptible	Resistance rpoB gene (codons 519~528)	RIF resistance detected

อภิปรายผล

จากผลการศึกษา การตรวจหาการติดเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) เปรียบเทียบกับวิธี LPA พบว่าในการตรวจหาการติดเชื้อวัณโรค นั้น ทั้ง 2 วิธี ให้ผลตรงกัน มีค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง คิดเป็นร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวกและผลลบ คิดเป็นร้อยละ 100 และมีค่า Kappa coefficient (K) เท่ากับ 1 ในการตรวจหาการติดเชื้อวัณโรคดื้อยา ให้ผลตรงกัน 44 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97.8) ให้ผลไม่ตรงกัน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.2) ด้วยวิธี LPA ให้ผลดื้อยาเพียง INH เพียงชนิดเดียว แต่ผลการตรวจด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) ให้ผลการดื้อยาทั้ง RIF และ INH เมื่อนำผลการตรวจวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธีมาทำการคำนวณหาค่า Kappa coefficient (K) ของการทดสอบหาการดื้อยา RIF ได้ผลเท่ากับ 0.94 และ ของการทดสอบหาการดื้อยา INH ได้ผลเท่ากับ 1.00 ซึ่งค่าที่ได้จากการทดสอบหาวัณโรคดื้อยา ทั้ง 2 ชนิด มีค่า K อยู่ระหว่าง 0.81 – 1.00 หมายความว่า การด้วยวิธี LPA และด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) นั้น มีความสอดคล้องกันในระดับ ดีมาก (Almost perfect agreement)

ในรายละเอียดของยีนดื้อยา ตามตารางที่ 3 และ 4 พบว่า ยีนที่แสดงออกของการดื้อยาที่ตรวจพบด้วยวิธี LPA สอดคล้องกับยีนที่ตรวจพบด้วยชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) ทุกตัวอย่าง ในส่วนของยีน *ahpC* ไม่มีตัวอย่างที่ตรวจพบ ซึ่งตรวจพบกลายพันธุ์ของยีน *ahpC* ที่ทำให้เกิดการดื้อยาได้น้อยมาก¹⁰

นอกจากผลการวิเคราะห์ ในตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 และการแสดงออกของยีนดื้อยาในตารางที่ 3 และตารางที่ 4 นั้น ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยานั้น แสดงให้เห็นว่า ทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกันมา จึงต้องพิจารณาปัจจัยด้านอื่น ๆ ร่วมด้วย ดังแสดงในตารางที่ 6

ในส่วนของหลักการของการทดสอบแตกต่าง การตรวจด้วยวิธี LPA เป็นหลักการของ PCR และ Reverse Hybridization และชุดตรวจ MTB/MDR

(SANITY 2.0) เป็นหลักการ Real-time PCR ซึ่งไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ ในหัวข้อการตรวจหาเชื้อดื้อยา Rifampicin สามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้ 1 ยีนเท่านั้น ในหัวข้อ การตรวจหาเชื้อดื้อยา Isoniazid การตรวจด้วยชุดตรวจ MTB/MDR สามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้มากกว่าคือ 3 ยีน (*inhA katG* และ *ahpC*) หัวข้อขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) ซึ่งสามารถตรวจหาการติดเชื้อได้แม้มีปริมาณเชื้อน้อย (MTBC: 10 bacilli /ml และ MDR: 1,000 bacilli /ml) และระยะเวลารอคอยในการทดสอบ (TAT) ที่ใช้เวลา ประมาณ 4 ชั่วโมง ต่อการทดสอบ 4 ตัวอย่าง เนื่องจาก ในปัจจุบัน ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) 1 ชุดสามารถตรวจได้ 4 ตัวอย่าง ในกรณีที่ตัวอย่างน้อย อาจต้องรวม ตัวอย่างให้ครบ 4 ตัวอย่าง ก่อนเริ่มการทดสอบ สำหรับระยะเวลารอคอยในการทดสอบ (TAT) ของการตรวจด้วยวิธี LPA ใช้เวลา ประมาณ 3 วัน เนื่องจาก LPA มีขั้นตอนการทดสอบหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยหลักการ Polymerase chain reaction (PCR) การย้อมแถบสี Membrane strip ด้วยหลักการ Reverse Hybridization การวิเคราะห์ผลเทียบกับแถบมาตรฐาน แต่ในหัวข้อของราคาต้นทุนการทดสอบจะเห็นว่า ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0) มีราคาสูงกว่าการทดสอบด้วยวิธี LPA

จากการศึกษานี้ เมื่อพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น จึงสามารถสรุปได้ว่า การตรวจด้วย MTB/MDR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0 สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา แทนการตรวจด้วยวิธี LPA ได้ ซึ่งอาจจะทำให้ค้นหาผู้ป่วยรวดเร็วขึ้น ผู้ป่วยสามารถเข้ารับการรักษาได้ทันที ซึ่งจะช่วยลดการแพร่กระจายเชื้อได้เพิ่มขึ้น

เนื่องจากการตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา วิธีมาตรฐาน (gold standard) เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบความไวต่อเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้เวลานานในการที่จะทราบผลการทดสอบ การตรวจด้วยชุดตรวจ MTB/MDR โดยใช้เครื่อง SANITY 2.0 นี้ ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาซึ่งสามารถทราบผลการตรวจ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ด้วยวิธี LPA และ ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)^{7, 11, 12, 13}

หัวข้อ	LPA	ชุดตรวจ MTB/MDR (SANITY 2.0)
หลักการทดสอบ	PCR และ Reverse Hybridization	Real-time PCR
การตรวจหาเชื้อวัณโรค	16S rRNA	IS6110 gene
การตรวจหาอินดื้อยา Rifampicin	1 ยีน (rpoB)	1 ยีน (rpoB)
การตรวจหาอินดื้อยา Isoniazid	2 ยีน (inhA และ katG)	3 ยีน (inhA katG และ ahpC)
ชนิดของตัวอย่าง	- Decontaminated specimen (sputum, bronchial material) - Solid/Liquid medium	- Culture specimens - Sputum samples
ปริมาณตัวอย่าง	- Decont. specimen 500 µl - Liquid medium 1 ml - Solid medium 100 µl of A-LYS	1 µl ~2,000 µl
ขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of Detection; LOD)	160 bacteria/ml	MTBC: 10 bacilli /ml MDR: 1,000 bacilli /ml
ต้นทุนการทดสอบ*	2,046.43 บาท	2,567.76 บาท
- 4 ตัวอย่าง	3,910.81 บาท	4,953.48 บาท
- 8 ตัวอย่าง		
ระยะเวลาการรอคอยในการทดสอบ (TAT)	3 วัน	4 ชั่วโมง

* การวิเคราะห์ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LPA และชุดตรวจ MTB/MDR ด้วยเครื่อง SANITY 2.0 ของกลุ่มงานปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ฯ สถาบันบำราศนราดูร

เร็วกว่าวิธีมาตรฐาน และจัดเป็นเครื่องมือที่ใช้การทดสอบเพื่อให้วินิจฉัย ณ จุดที่ทำการดูแลรักษาผู้ป่วยได้ (point of care testing: POCT) ซึ่งสามารถให้ผลทั้งการตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา 2 ชนิดได้แก่ยา isoniazid และยา rifampicin ในขณะที่ถ้าใช้ชุดตรวจ MTB/RIF โดยใช้เครื่อง Gene Xpert จะให้ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin ขนาดเดียวกันนั้น แต่อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยานั้น มีข้อจำกัด คือไม่สามารถทราบว่าเป็นเชื้อวัณโรคเป็นเชื้อที่มีชีวิตหรือไม่ เนื่องจากเป็นการตรวจหา DNA

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาต่อไป

อาจทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น และการคัดเข้าของตัวอย่างที่ให้ผล AFB เป็นลบ หรือ ให้ผลน้อยกว่า 1+ (scanty) เพื่อเพิ่มโอกาสให้พบผลการศึกษาที่กว้างมากขึ้น เนื่องจากในการศึกษานี้ คัดเลือกตัวอย่างที่มีผลการทดสอบ LPA ซึ่งต้องมีผล AFB ตั้งแต่ 1+ ขึ้นไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานวัณโรค และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง กลุ่มงานปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอ้างอิงด้านโรคติดต่อ สถาบันบำราศนราดูร ที่ช่วยให้การทดสอบเป็นไปอย่างราบรื่น และขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงานปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์และอ้างอิงด้านโรคติดต่อ

ที่ให้คำปรึกษา ในการดำเนินงานและทางวิชาการ และ
การสนับสนุนทรัพยากรต่าง ๆ ทำให้ในวิจัยในครั้งนี้
ประสบความสำเร็จตามที่ตั้งวัตถุประสงค์ไว้

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Global tuberculosis report 2024. [internet]. 2024 [Cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-programme-on-tuberculosis-and-lung-health/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
2. WHO. Tuberculosis Country Profile 2021 Thailand. [internet]. 2021 [Cited 2024 Oct 29]. Available from: <https://www.tbthailand.org/download/form/รายงานสถานการณ์และการเฝ้าระวังวัณโรคในปี.pdf>
3. Tuberculosis Division, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. Guidelines for Tuberculosis Investigation and Control (Revised Edition, 2023). 1st ed. Bangkok: Aksorn Graphic and Design Publishing; 2023. (in Thai)
4. Division of Tuberculosis. National Tuberculosis Control Programme Guideline, Thailand 2021. Bangkok: Division of Tuberculosis; 2021. (in Thai)
5. Division of Tuberculosis. Management and practice guideline for tuberculosis laboratory, Thailand 2019. Bangkok: Division of Tuberculosis; 2019.
6. Xiamen Zeesan Biotech. MTB DNA Extraction Kit (Sanity 2.0). [internet]. 2023 [Cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://www.zeesandx.com/mtb-test-kit-sanity-2-0-product/>.
7. Xiamen Zeesan Biotech. MTB/MDR Test Kit (Sanity 2.0). [internet]. 2023 [Cited 2023 Oct 26]. Available from: <https://www.zeesandx.com/mtbmdr-test-kit-sanity-2-0-product/>.
8. Issarasongkhram M. Evaluation of the efficacy between three Covid-19 test kits which manufacturers imported in Thailand. JODPC10 [Internet]. 2022 Jun. 29 [cited 2024 Nov. 15]; 20(1): 36–48. Available from: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/odpc10ubon/article/view/255703> (in Thai)
9. WHO. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis: interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians. Geneva: WHO; 2022.
10. Chornchomrat N. Development of multiplex allele specific-polymerase chain reaction combined with dipstick chromatography strip for diagnosis of katG and inhA mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Bangkok: Chulalongkorn University; 2020. (in Thai)
11. Barnard M, Parsons L, Miotto P, Cirillo D, Feldmann K, Gutierrez C, et al. Molecular detection of drug-resistant tuberculosis by line probe assay: Laboratory manual for resource-limited settings. FIND; 2020.
12. GenoType MTBDRplus VER 2.0 [Medication information leaflet]. Nehren, Germany: Hain/Lifescience GmbH; 2019.
13. Ninan MM, Gowri M, Christopher DJ, Rupali P, Michael JS. The diagnostic utility of line probe assays for multidrug-resistant tuberculosis. Pathog Glob Health. 2016; 110(4–5): 194–199. doi:10.1080/20477724.2016.1214350.
14. Charurak N. Method Validation. Thai Association of Clinical Pathology. Bangkok: Than Printing; 2009. (in Thai)