# การตรวจวินิจฉัยและการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเชื้อ

# *Mycobacterium tuberculosis* detection and drug susceptibility testing using Anyplex™ Real-time PCR in comparison with standard culture


*สมศักดิ์ สินธุอุไร** *กัญณภัทร เกษรสุคนธ์* *ปัทมา กล่อมพร*
*Somsak Sintu-urai** *Kannaphat Kesornsukhon* *Patthama Klomporn*
*ธนกร โพธิ์วงศ์* *รัชณีพร คำมินทร์* *สุวรรณี กีรติวาสี*
*Thanakorn Phowong* *Ratchaneeporn Khummin* *Suwannee Keeratiwasee*

*กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 พิษณุโลก*
*Disease Control Laboratory Section, The Office of Disease Prevention and Control 2nd Phitsanulok*

* *ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: sintuurai@yahoo.com)*
* *Corresponding author (Email: sintuurai@yahoo.com)*



*Received January 2016*
*Accepted as revised March 2016*



## Abstract

**Introduction:** Bacterial cultivation is the gold standard method for diagnosis of tuberculosis (TB). However, technique is time consuming for 28-56 days of cultivation. Therefore, several rapid tests have been developed. Real-time PCR is one of the quick TB test currently used for identifying both drug-susceptible and multidrug resistant TB (MDR-TB). However, the efficiency of real-time PCR compared to conventional method has not been elucidated.

**Objective:** To compare the efficiency between real-time PCR and conventional methods including cultivation in solid media and mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT 960) system for detection of TB and MDR-TB.

**Materials and methods:** One hundred and forty-seven sputum specimens collected from hospital sectors of the Office of Disease Prevention and Control 2 in Phitsanulok were decontaminated and subjected to culture in LJ medium agar slant and MGIT 960 system. Bacterial DNA was extracted and real-time PCR was performed using the Anyplex™ MTB/N™ detection kit and Anyplex™ II MDR-TB detection kit.

**Results:** Samples (86.2%) were positive by real-time PCR and was 39.3% higher than conventional culture. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of real-time PCR for detection of multidrug-resistant tuberculosis were 96.82%, 28.05%, 49.17%, and 92.0%, respectively, as compared to MGIT 960 system. Time required for detection of TB between MGIT 960 system and real-time PCR is 13 and 2 days. However, total cost of MGIT 960 system is cheaper than that of real-time PCR (600 Baht vs 1,500 Baht, respectively).

**Conclusion:** Real-time PCR is the useful diagnostic test for rapid detection of MTB and MDR-TB. Real-time PCR provides higher sensitivity and specificity than convention culture methods. This method can be used as a screening test for TB infection where rapid treatment can be achieved. However, this method has to be further on evaluated for its cost effectiveness.



*Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2016; 49(2): 218-226. Doi: 10.14456/jams.2016.22*

**Keywords:** Multi drug resistance TB, tuberculosis, real-time PCR, MGIT 960

## บทคัดย่อ

**บทนำ:** การตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาได้รับการพัฒนาขึ้นหลายวิธี การเพาะเลี้ยงเชื้อกลุ่ม mycobacteria ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานยังคงเป็นปัญหาเนื่องจากเชื้อเจริญเติบโตช้า ปัจจุบันมีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้อย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิผลกับวิธีการตรวจมาตรฐาน

**วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิผลของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยเทคนิค real-time PCR กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง การเพาะเลี้ยงเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาด้วยเครื่อง MGIT 960

**วัสดุและวิธีการ:** เตรียมตัวอย่างเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหาร จำแนกชนิด และทดสอบการดื้อยาของเชื้อ สกัดและเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อจากตัวอย่างที่ส่งตรวจจากโรงพยาบาลในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 พิษณุโลก จำนวน 147 ราย ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและตรวจวัดโดยอาศัยหลักการ real-time PCR ด้วยชุดน้ำยา AnyplexTM MTB/N™ Detection และ Anyplex™ II MDR-TB Detection

**ผลการศึกษา:** วิธี real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อจากตัวอย่าง ร้อยละ 82.8 มากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร้อยละ 39.4 และเมื่อเทียบกับการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี MGIT 960 มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับร้อยละ 96.82, 28.05, 49.17 และ 92.0 ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบด้วยเครื่อง MGIT 960 และวิธี real-time PCR โดยเฉลี่ยคือ 13 วัน และ 2 วัน อย่างไรก็ตาม วิธี real-time PCR มีค่าใช้จ่ายสูงกว่า กล่าวคือ 1,500 บาทเมื่อเทียบกับการทดสอบด้วยเครื่อง MGIT 960 ซึ่งมีค่าใช้จ่าย 600 บาท

**สรุปผลการศึกษา:** เทคนิค real-time PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิดแบบเดิม และให้ค่าความจำเพาะสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือตรวจคัดกรองผู้ป่วยได้ ลดระยะเวลาการปฏิบัติงานและการรอผล ช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เร็วขึ้น ลดการแพร่กระจายเชื้อในชุมชนได้ แต่ควรมีการพัฒนาเพื่อลดต้นทุนลง เพิ่มประสิทธิภาพให้มากขึ้น สำหรับรองรับการตรวจในปริมาณที่มาก และทดแทนการตรวจแบบเดิม



*วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(2): 218-226. Doi: 10.14456/jams.2016.22*

**คำรหัส:** วัณโรค วัณโรคดื้อยาหลายขนาน real-time PCR, MGIT 960


## บทนำ

วัณโรค ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของประเทศไทย เนื่องจากเป็น 1 ใน 22 ประเทศที่อยู่ในกลุ่มพบผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis complex* มากที่สุด องค์การอนามัยโลกได้ประเมินสถานการณ์ประเทศไทย ว่าในปี 2558 มีอัตราความชุกของวัณโรคประมาณ 160 ต่อแสนประชากร หรือประมาณ 110,000 ราย[1] และจากรายงานขององค์การอนามัยโลกในปี พ.ศ. 2558 คาดว่าจะตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ในผู้ป่วยมากกว่า 50 ประเทศ หรือประมาณ 480,000 รายทั่วโลก ประมาณการณ์ว่าจะพบ MDR-TB ในผู้ป่วยรายใหม่ร้อยละ 3.3 และในผู้ป่วยรายเก่าร้อยละ 20 โดยมีผู้ป่วยร้อยละ 50 ของทั้งหมดอยู่ในประเทศจีนและอินเดีย[2] ในประเทศไทย มีรายงานสถานการณ์วัณโรคดื้อยาหลายขนานของผู้ป่วยระหว่างปี พ.ศ. 2550-2552 จำนวน 1,000 รายจากโรงพยาบาลจำนวน 126 แห่ง ทั่วประเทศ พบว่าร้อยละ 53 ของผู้ป่วยรายใหม่ได้รับการรักษาครบ และประสบความสำเร็จในการรักษาหายขาด แต่พบการขาดการรักษาของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานรายใหม่ และผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาแล้วสูงถึงร้อยละ 21.7 และ 20.2 ตามลำดับ[3]

การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีบทบาทสำคัญในการช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยวัณโรคของแพทย์ผู้รักษา โดยการตรวจหาเชื้อติดสีทนกรด (acid fast bacilli) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรค แต่ละกระบวนการตรวจต้องปฏิบัติตามมาตรฐาน มีระบบการควบคุมคุณภาพที่ได้

มาตรฐาน วิธีที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน คือการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง ซึ่งใช้ระยะเวลา 28-56 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว เช่น BACTEC™ MGIT™ 960 system ที่ใช้ระยะเวลา 7-42 วัน[4] ดังนั้น การนำเทคนิควิธีการตรวจใหม่ๆ เช่น PCR, real-time PCR หรือ nucleic acid sequence based amplification (NASBA) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัย จะช่วยให้ผู้ป่วยได้รับผลการตรวจที่รวดเร็วยิ่งขึ้น[5] ลดการแพร่กระจายเชื้อไปสู่ชุมชนโดยเฉพาะเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน และทำให้การรักษาด้วยยามีประสิทธิภาพสูงสุด[6]

การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิค real-time PCR เป็นการเพิ่มจำนวนและตรวจวัดปริมาณของสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ หลักการนี้คือการติดฉลากสารเรืองแสงเข้ากับสารพันธุกรรมตั้งต้น เพื่อเป็นตัวแสดงปริมาณในขณะตรวจ ปัจจุบันห้องปฏิบัติการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 ได้นำเทคนิค real-time PCR มาใช้เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยผู้ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อและผู้ป่วยวัณโรค โดยใช้ชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Detection และ Anyplex™ II MDR-TB Detection ซึ่งใช้ Dual Priming Oligonucletide (DPO) จับกับสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค DPO primer จะมีการออกแบบลำดับเบสให้มี inosine เพิ่มเข้าไปตรงกลางค่อนไปทางด้านปลาย 3' ของ primer ทำให้มีลักษณะ bubble-liked structure การจับกันของโครงสร้างเบสคู่สมจาก polyinositide linkage จะเพิ่มความไวและความจำเพาะในการทำปฏิกิริยา[7,8]

ชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรค (Anyplex™ MTB/NTM Detection) และวัณโรคดื้อยา (Anyplex™ II MDR-TB Detection) เป็นชุดตรวจที่สามารถตรวจวิเคราะห์ DNA ของเชื้อวัณโรค โดยอาศัยยีน IS6110 และ MPB64 ซึ่งเป็นยีนที่มีความคงตัวและมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ (conserved gene)[9] และยีน 16S rRNA ในการจำแนกเชื้อ non tuberculous mycobacteria (NTM)[10] ส่วน DNA ของเชื้อวัณโรคดื้อยาที่ใช้ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ Multi-drug resistance tuberculosis (MDR-TB) ได้แก่ ยีน *rpoB* สำหรับตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อต่อยา rifampicin และยีน *katG* ร่วมกับยีน *inhA* สำหรับเชื้อดื้อต่อยา Isoniazid ตามลำดับ[11,12] วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลของการตรวจวินิจฉัยและการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งและ BACTEC™ MGIT™ 960 system (MGIT 960) และทดสอบความไวต่อยา ด้วยเครื่อง MGIT 960 งานวิจัยนี้ใช้ BACTEC™ MGIT™960 SIRE Kit ในชุดประกอบด้วยน้ำยา modified Middlebrook 7H9 broth ซึ่งมีสารฟลูออเรสเซนต์อยู่ก้นหลอดสำหรับตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ และขวดบรรจุผงยา streptomycin 332 ไมโครกรัม isoniazid ขนาด 33.2 ไมโครกรัม rifampicin ขนาด 332 ไมโครกรัม และ ethambutol ขนาด 1,660 ไมโครกรัม เมื่อละลายน้ำและผสมในหลอด MGIT แล้วได้ความเข้มข้น 1.0, 0.1, 1.0 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ผลของค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าความถูกต้อง ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

## วัสดุและวิธีการ

**1. ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ**

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลัง การเก็บข้อมูลของตัวอย่างที่ส่งตรวจวัณโรคทั้งหมดจากโรงพยาบาลในจังหวัดพื้นที่รับผิดชอบและจังหวัดใกล้เคียงในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 พิษณุโลก ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 จำนวน 147 ตัวอย่าง แบ่งเป็นเสมหะจำนวน 122 ตัวอย่าง (83%) น้ำล้างช่องปอด 2 ตัวอย่าง (1.4%) หนอง 6 ตัวอย่าง (4.1%) ชิ้นเนื้อ 2 ตัวอย่าง (1.4%) น้ำไขสันหลัง 11 ตัวอย่าง (7.5%) และตัวอย่างอื่นๆ 3 ตัวอย่าง (2.7%) นำตัวอย่างของผู้ป่วยมาทำการตรวจวิเคราะห์ ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งชนิด LJ medium การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่อง MGIT 960 การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยเครื่อง MGIT 960 และการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรค และวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี real-time PCR ตามลำดับ

**2. การจัดการและเตรียมสิ่งส่งตรวจ**

ทำการ pre-treatment สิ่งส่งตรวจเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ด้วย 2% NALC-NaOH ในอัตราส่วนสารเคมีต่อตัวอย่างเท่ากับ 1:1 จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer ทันที นาน 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สารเคมีทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นแยกที่ 3,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนบนทิ้ง เติมน้ำยา phosphate bufferred saline (PBS) pH 6.8 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างไปใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

**3. การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค**

เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค โดยใช้ 2 วิธีการคือ การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งชนิด LJ Medium และ เครื่อง MGIT 960 โดยวิธีแรก นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนในขั้นตอนการทำ pre-treatment แล้วมาหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LJ medium 2 ขวดๆละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านและบันทึกผลทุกสัปดาห์หาก

พบมีการเจริญของเชื้อจะสามารถมองเห็นโคโลนีได้ด้วยตาเปล่า หากครบ 8 สัปดาห์แล้วไม่พบโคโลนีของเชื้อให้รายงานผลเป็น “No growth” ส่วนวิธีการเพาะเชื้อด้วยเครื่อง MGIT 960 ของบริษัท (Becton, Dickinson, USA) ให้นำ BBL MGIT PANTA (Becton, Dickinson, USA) ผสม กับ growth supplement จำนวน 14 มิลลิลิตร ก่อน และเติมลงในหลอด MGIT (ปริมาตร 7 มิลลิลิตร) จำนวน 800 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่ผ่านการ pre-treatment แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด MGIT ปิดฝานำเข้าเครื่อง MGIT 960 เครื่องจะอ่านการเรืองแสงที่หลอดทุก 60 นาที หากครบ 42 วัน ไม่มีการเจริญของเชื้อ ให้รายงานเป็นผลลบ เมื่อพบมีเชื้อในทั้งสองวิธีแล้ว นำเชื้อไปทดสอบหาโปรตีน MPT64 ด้วยวิธี rapid test (SD Bioline) (Standard Diagnostics, Korea) เพื่อแยกเชื้อชนิด *Mycobacterium tuberculosis* complex ออกจาเชื้อกลุ่ม Non tuberculous mycobacteria (NTM)

**4. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อด้วยเครื่อง MGIT 960**

ละลายยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบด้วยน้ำกลั่นจำนวน 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติมลงในหลอด MGIT ที่ใส่ growth supplement ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้ว จำนวน 100 ไมโครลิตร โดยไม่ต้องเติมยาปฏิชีวนะในหลอดควบคุม หลังจากนั้นเติมเชื้อที่ผ่านการปรับความขุ่นด้วย McFarland standard No.05 และเจือจางเป็น 1:100 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด MGIT ที่มียาแต่ละชนิด นำไปบ่มในเครื่อง MGIT 960 รอเครื่องรายงานผล แปลผลการทดสอบได้ดังนี้คือ เมื่อเครื่องรายงานว่ามีการเจริญของเชื้อที่ผสมในยาปฏิชีวนะชนิดใดรายงานว่าเชื้อดื้อต่อยาชนิดนั้น เมื่อพบเชื้อที่ดื้อต่อยาทั้ง rifampicin และ isoniazid รายงานผลเป็นเชื้อ MDR-TB

**5. การตรวจเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR**

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการ treat แล้วไปแยกสกัดด้วยชุดน้ำยา ExiPrep™DX Bacteria Genomic DNA Kit (Bioneer, Korea) ด้วยเครื่อง ExiPrep™ 16 DX ของบริษัท (Bioneer, Korea) เริ่มจากการแตกเซลล์แบคทีเรียด้วย lysis buffer จากนั้นแยก DNA ออกจากเศษเซลล์ด้วยการจับกับ silica magnetic bead ล้างเศษเซลล์ออกด้วย washing buffer และชะล้างเอา DNA ออกจาก silica magnetic bead ด้วย elution buffer นำ DNA ที่ได้มาตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยชุดตรวจ Anyplex™ MTB/NTM Detection โดยเตรียม master mix ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 10X MTB/NTM OM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจาก RNase ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ 2X Anyplex PCR Master Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่าง DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่อง CFX96™ Real-time PCR system (Bio-Rad, USA) โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 45 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing และ extension ที่ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที เครื่องจะตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละรอบการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับเวลา แปลผลการตรวจด้วยโปรแกรม Seegene Viewer ตัวอย่างที่มีค่าการเรืองแสงมากกว่าค่า baseline แปลผลเป็นบวก (MTB- positive)

ส่วนการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา (MDR-TB) ใช้หลักการ real-time PCR เช่นเดียวกัน ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 4X Anyplex™ PCR Master Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 4X MTB/MDR TOM ปริมาตร 5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นปราศจาก RNase ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และตัวอย่าง DNA ที่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง CFX96™ Real-time PCR system (Bio-Rad, USA) ซึ่งมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จำนวน 50 รอบ โดย denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เครื่องจะตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละรอบการเกิดปฏิกิริยาเทียบกับเวลา แปลผลการตรวจด้วยโปรแกรม Seegene Viewer ตัวอย่างที่มีค่าการเรืองแสง ของสี Cal Red ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร มากกว่าค่า baseline แปลผลเป็น วัณโรคชนิดดื้อต่อยา isoniazid และตัวอย่างที่มีการเรืองแสงของสี HEX ที่ความยาวคลื่น 556 นาโนเมตร มากกว่าค่า baseline แปลผลเป็นวัณโรคชนิดดื้อต่อยา rifampicin

หลังจากดำเนินการตรวจในแต่ละขั้นตอนแล้ว ตรวจสอบความถูกต้อง ครบถ้วนของข้อมูล ลงรหัส บันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ ประมวลผลด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 11 เพื่อหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าความถูกต้อง ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

## ผลการศึกษา

จากผลการตรวจวินิจฉัย และการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคโดยใช้หลักการ real-time PCR ด้วยชุดน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Detection และ Anyplex™ II MDR-TB Detection โดยเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานในปัจจุบันคือการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคบนอาหารแข็งและเครื่อง BACTEC™ MGIT™ 960 System (MGIT 960) และการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยเครื่อง MGIT 960 จากตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 147 ราย พบว่า วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลตรงกับ

การตรวจด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 84 ราย คิดเป็นร้อยละ 57.9 ให้ผลต่างกัน คือ ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่สามารถตรวจด้วยวิธี real-time PCR จำนวน 59 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.6 โดย เป็น MTB จำนวน 58 ราย และ NTM จำนวน 1 ราย ในการศึกษานี้ พบการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลชีพชนิดอื่น (contamination) จากการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งไม่นำมาคำนวณในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 2 ราย ผลสรุปดังแสดงในตารางที่ 1

**Table 1** Comparison between conventional culture and real-time PCR.

| | | Conventional Culture & identification | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Growth (%) | No Growth (%) | Total (%) |
| Real-time PCR | Positive (%) | 61(42.1) | 59(40.7) | 120(82.8) |
| | Negative (%) | 2(1.4) | 23(15.9) | 25(17.2) |
| | | 63(43.4) | 82(56.6) | 145(100.0) |

ค่าที่ได้จากตารางที่ 1 สามารถนำไปคำนวณความเที่ยงตรงเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองวิธีพบว่า วิธี real-time PCR มีค่าความไวเท่ากับ (61/63)x100 = 96.8% ค่าความจำเพาะเท่ากับ (23/82)x100 = 28.0% ค่าความถูกต้อง ((61+23)/145)x100 = 76.9% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ (59/120)x100 = 49.2% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ (23/25)x100 = 92.0% ผลการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยเครื่อง MGIT 960 โดยเปรียบเทียบกับวิธี real-time PCR โดยเปรียบเทียบกันเฉพาะที่มีข้อมูลทั้ง 2 การทดสอบ จำนวนทั้งสิ้น 78 รายพบให้ผลตรงกันทั้งสองวิธี จำนวน 66 ราย คิดเป็นร้อยละ 84.6 ให้ผลต่างกัน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.4 ดังแสดงในตารางที่ 2 การตรวจหาการดื้อยา rifampicin, isoniazid และ ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) แสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 1

**Table 2** Results of MTB detection with MGIT 960 and real-time PCR.

| | **Number of tests** | **Percent** |
|---|---|---|
| Different results | 12 | 15.4 |
| Same result | 66 | 84.6 |
| - MDR-TB | 3 | 3.9 |
| - Mono-resistance | 4 | 5.1 |
| - Susceptible | 27 | 34.6 |
| - NTM | 14 | 17.9 |
| - Negative (no growth) | 18 | 23.1 |

**Table 3** Results of MTB detection with MGIT 960 and real-time PCR.

| Real-time PCR/MGIT 960 | No. of Test | Sensitvity | Specificity |
|---|---|---|---|
| RIF-R / RIF-R | 3 | 50.0 | 100.0 |
| RIF-R / RIF-S | 0 | | |
| RIF-S / RIF-R | 3 | | |
| RIF-S / RIF-S | 31 | | |
| INH-R / INH-R | 7 | 70.0 | 100.0 |
| INH-R / INH-S | 0 | | |
| INH-S / INH-R | 3 | | |
| INH-S / INH-S | 27 | | |
| MDR / MDR | 3 | 42.9 | 100.0 |
| MDR / MTB Susceptible | 0 | | |
| MTB susceptible / MDR | 4 | | |
| MTB susceptible / MTB susceptible | 30 | | |

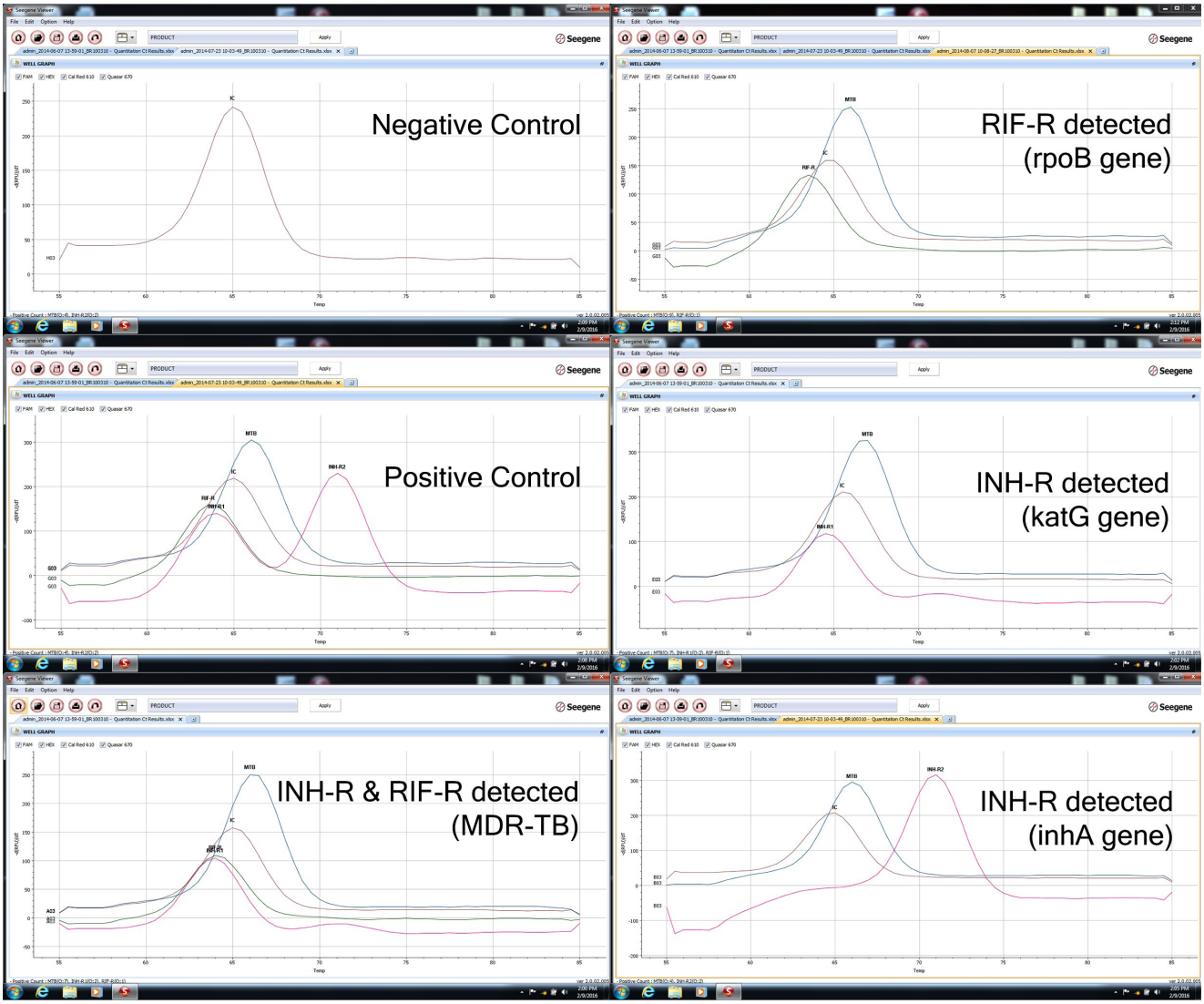


***Figure 1*** *Melting temperature peak of rpoB gene (HEX) inhA and katG gene (Cal Red 610) MTB (FAM) and IC (Quasar) in Multiplex Real-time PCR for TB.*

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า การตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา rifampicin ด้วยวิธี real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีค่าความไวเท่ากับ (3/3+3)x100 = 50.0% ค่าความจำเพาะเท่ากับ (31/31)x100 = 100.0% ค่าความถูกต้องเท่ากับ ((3+31)/37)x100 = 91.9% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ (3/3)x100 = 100.0% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ (31/34)x100 = 91.2% และเมื่อตรวจสอบระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาของทั้งสองวิธี ตั้งแต่เริ่มกระบวนการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการจนถึงวันที่รายงานผลการตรวจ (turnaround time) พบว่าวิธีการทดสอบด้วยเครื่อง MGIT 960 มีระยะเวลาในการดำเนินการเฉลี่ย 13 วัน (7-22 วัน) ส่วนการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR มีระยะเวลาในการดำเนินการเฉลี่ย 2 วัน

## สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิผลของการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ LJ medium agar และ การใช้อาหารเหลว โดยเครื่อง BECTEC™ MGIT™ 960 ร่วมกับการจำแนกชนิดเชื้อด้วยวิธี rapid test ที่ใช้หลักการ immune chromatographic assay (ICA) ใช้ตัวอย่างทดสอบทั้งสิ้น 145 ราย มีตัวอย่างที่ให้ผลตรงกัน 84 ราย คิดเป็นร้อยละ 57.9 และมี 61 ราย ที่ให้ผลไม่ตรงกัน คิดเป็นร้อยละ 42 มีค่าความไวร้อยละ 96.8 ค่าความจำเพาะร้อยละ 28.1 แต่เนื่องจากเทคนิคในการปฏิบัติงานทั้ง 2 แบบแตกต่างกัน โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐานเพื่อการวินิจฉัยอาศัยหลักการให้เชื้อเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม แต่การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค real-time PCR เป็นการตรวจวัดปริมาณ DNA

ของเชื้อ สามารถตรวจวิเคราะห์ในกรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อยๆ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถตรวจพบได้ ผลที่ไม่ตรงกันส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารไม่เจริญเติบโต แต่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี real-time PCR

การวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาเป็นการเปรียบเทียบผลของการทดสอบที่สามารถออกผลได้ทั้ง 2 วิธี โดยมีตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์จำนวน 78 ตัวอย่างวิเคราะห์พบว่ามากกว่าร้อยละ 80 มีผลการทดสอบที่ตรงกันทั้ง 2 วิธี เมื่อนำตัวอย่างที่มีผลการตรวจหาความไวต่อยาทั้ง 2 วิธี (37 ตัวอย่าง) มาวิเคราะห์พบว่า การตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา rifampicin ด้วยเทคนิค real-time PCR เมื่อเทียบกับวิธี MGIT 960 พบมีค่าความไวร้อยละ 50.0 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100.0 การตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อต่อยา isoniazid มีค่าความไวร้อยละ 70.0 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100.0 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Valvatne H และคณะ[13] ซึ่งตรวจพบเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของยีน *katG* และ *inhA* ทำให้เชื้อดื้อยาชนิด isoniazid มากกว่าเชื้อวัณโรคที่มีที่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของยีน *rpoB* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา rifampicin การดื้อยานี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง *katG* ที่เกิดขึ้นได้บ่อยกว่าและเกิดขึ้นได้หลายยีนมากกว่าการกลายพันธุ์ในยีน *rpoB* และการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน มีค่าความไวร้อยละ 42.9 ค่าความจำเพาะร้อยละ 100.0 ค่าความถูกต้องร้อยละ 89.1 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 100.0 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 88.2

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้พบว่า ผลที่ได้ส่วนใหญ่ตรงกันของทั้งสองวิธี โดยค่าความจำเพาะ และค่าการทำนายผลบวก เท่ากับร้อยละ 100 แสดงให้เห็นว่าวิธีการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR มีค่าความจำเพาะสูง สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ramirez MV และคณะ[14] ซึ่งตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลการตรวจที่มีค่าความไวและค่าความจำเพาะร้อยละ 85 และ 98 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลพบว่าตัวอย่างส่งตรวจที่เชื้อไม่เจริญด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ จนทำให้ไม่สามารถนำเชื้อมาทดสอบหาการดื้อยาได้ แต่สามารถตรวจได้ด้วยวิธี real-time PCR น่าจะเป็นผลจากเชื้อที่พบในตัวอย่างนั้นเป็นเชื้อตายที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ แต่ยังคงตรวจวัด DNA ของเชื้อได้โดยไม่ต้องอาศัยเพียงเชื้อที่มีชีวิตอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม อาจเป็น false positive จากผู้ป่วยมีเชื้อที่ตายและร่างกายยังกำจัดออกไม่หมดได้[15] จึงต้องมีการทดสอบเพื่อหาข้อมูลสนับสนุนข้อขัดแย้งนี้ต่อไป โดยอาศัยการตรวจยืนยันโดยใช้หลักการอื่นเช่น การตรวจด้วยวิธีการตรวจหา antibody จาก lymphocyte secretion[16] หรือ การตรวจหา interferon gamma[17]

การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว หรือ MGIT 960 ที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานจำนวน 7 ราย ต่างจากการตรวจด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งใช้หลักการ real-time PCR ที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานเพียง 3 ราย สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Aung WW และคณะ[18] ซึ่งตรวจพบเชื้อดื้อยาหลายขนานจากการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าวิธีการตรวจพบจากวิธีการทำ real-time PCR ผลการตรวจที่ไม่ตรงกันอาจเกิดจากการตรวจด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการตรวจทางฟีโนไทป์เป็นการตรวจการแสดงออกของเชื้อที่มีต่อยา ในขณะที่วิธี real-time PCR อาศัยการสร้าง Dual Priming Oligonucleotide Probe ที่จำเพาะกับสายพันธุกรรมของเชื้อในตำแหน่งของการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อยา เพียงสองตำแหน่งคือยีน *InhA* หรือ *katG* และ *rpoB* ยังไม่ครอบคลุมตำแหน่งของยีนที่ดื้อยาทั้งหมดได้

ระยะเวลาเฉลี่ยในการตรวจวิเคราะห์ของการเพาะเลี้ยงเชื้อใน LJ Medium, MGIT 960 และการตรวจเพื่อแยกชนิดของเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อในกลุ่ม NTM ด้วยวิธี ICA เท่ากับ 51 วัน (49-55 วัน) และการตรวจหาการดื้อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี MGIT 960 จำนวน 13 วัน (7-22 วัน) รวมสองขั้นตอนมีระยะเวลาในการตรวจเฉลี่ยประมาณ 64 วัน เชื้อวัณโรคเป็นเชื้อที่เจริญแบ่งตัวได้ช้า หากมีเชื้อในตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ต้องใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีปริมาณมากพอจนสามารถตรวจวัดได้ และการรายงานผลว่าเชื้อไม่เจริญเติบโตต้องเพาะเลี้ยงเชื้อให้ครบตามจำนวนวันที่กำหนดไว้ จึงทำให้การตรวจในแบบเดิมใช้เวลานาน เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งใช้เวลาเฉลี่ยรวมระยะเวลารายงานผล 2 วัน แต่วิธี real-time PCR ยังไม่สามารถใช้ทดแทนวิธีการตรวจแบบเดิมได้เนื่องจากมีราคาต้นทุนต่อการทดสอบสูง (1,500 บาท) เมื่อเทียบกับชุดทดสอบมาตรฐาน (600 บาท) และยังมีผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องกันอยู่ แต่ด้วยความรวดเร็วในการตรวจ มีค่าความจำเพาะและค่าการทำนายผลบวกที่สูง สามารถนำวิธี real-time PCR มาใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น โดยเฉพาะผู้ป่วยรายใหม่ หรือผู้ป่วยที่สงสัยติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เพื่อการปรับเปลี่ยนการรักษาด้วยยาที่ถูกต้อง ลดการแพร่กระจายเชื้อไปสู่ชุมชนและบุคคลอื่น

การตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาให้ได้ผลตรวจที่ถูกต้อง รวดเร็ว ยังคงเป็นปัจจัยที่สำคัญในการลดจำนวนผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรค ลดการแพร่กระจายเชื้อ และลดค่าใช้จ่ายโดยรวมของการรักษาวัณโรคลงได้ การพิจารณาใช้วิธีการแบบใดขึ้นอยู่กับความต้องการของแพทย์ผู้รักษา ผู้ใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการต้องทราบข้อจำกัดของเทคนิคการตรวจ

ด้วยวิธี real-time PCR อีกทั้งกระบวนการขั้นตอนการรักษาทั้งหมดควรพิจารณาถึงปัจจัยหลายอย่างประกอบกัน เช่น ประวัติผู้ป่วย ประวัติการรักษา ลักษณะของการกินยา เป็นต้น ดังนั้น กระบวนการพัฒนาขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาให้มีประสิทธิภาพ ถูกต้อง น่าเชื่อถือ ยังเป็นสิ่งจำเป็นในการรักษา ป้องกันและควบคุมวัณโรค


## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.นพ.ศักดิ์ชัย ไชยมหาพฤกษ์ ผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้โอกาสในการศึกษาในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง


1. World Health Organization [Internet]. Switzerland: World Health Organization; C2015 [updated 2016 Feb 1; cited 2016 Feb 9] Available from http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. Global tuberculosis control : epidermiology, strategy, financing : WHO report 2009.
3. Ungkasrithongkul M. Situation of multidrug-resistant tuberculosis in Thailand: Fiscal year 2007-2009. Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. (in Thai)
4. Guillerm M, Usdin M, Arkinstall J. Tuberculosis diagnosis and drug sensitivity testing, An overview of the current diagnostic pipeline. Campaign for Access to Essential Medicines. Paris: October 2006.
5. Hansen WL, Beuving J, Bruggeman CA, Wolffs PF. Molecular probes for diagnosis of clinically relevant bacterial infections in blood cultures. J Clin Microbiol 2010; 48: 4432-8.
6. Netto GJ, Saad RD, Dysert PA 2nd. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. Proc (Bayl Univ Med Cent) 2003; 16: 379-83.
7. Ma X, Xu H, Shi L, Yang P, Zhang L, Sun X, et al. A Multiplex PCR assay for the detection of five influenza viruses using a dual priming oligonucleotide system. BMC Infect Dis. 2015; 15: 93-104
8. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, 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
9. Singh HB, Singh P, Jadaun GP, Srivastava K, Sharma VD, Chauhan DS, et al. Simultaneous use of two PCR systems targeting IS6110 and MPB64 for confirmation of diagnosis of tuberculous lymphadenitis. J Commun Dis. 2006; 38(3): 274-9.
10. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3637-48
11. Seegene, Inc. User Manual: AnyplexTM plus MTB/NTM Detection, MDR-TB Detection. 2011; Version 1.01: 16-26
12. Seegene, Inc. User Manual: AnyplexTM plus MTB/NTM Detection, MDR-TB Detection. 2011; Version 1.01: 29-37
13. Valvatne H, Syre H, Kross M, Stavrum R, Ti T, Phyu S, et al. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing. J Antimicrob Chemother 2009; 64(4): 694-701
14. Ramirez MV, Cowart KC, Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, Winchell JM, et al. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. J Clin Microbiol 2010; 48(11): 4003-9
15. Kaul KL. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on patient care. Clin Chem 2001; 47(8): 1553-8
16. Raqib R, Rahman J, Kamaluddin AKM, Kamal SM, Banu FA, Ahmed S, et al. Rapid diagnosis of active tuberculosis by detecting antibodies from lymphocyte secretions. J Infect Dis 2003; 188: 364-70
17. Mazurek G H, Jereb J, LoBue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States. CDC. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. MMWR 2005; 54(RR15): 49-55
18. Aung WW, Ei PW, Nyunt WW, Swe TL, Lwin T, Htwe MM, et al. Phenotypic and genotypic analysis of anti-tuberculosis drug resistance in M*ycobacterium tuberculosis* isolation in Myanmar. Ann Lab Med. 2015; 35(5): 494-9