

ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ที่โรงพยาบาลนครปฐม

Efficacy study of Real-time PCR and standard method for Mycobacterium tuberculosis and its multi drug-resistance diagnosis at Nakhonpathom Hospital

สิทธิพจน์ ผลิตกุศลธัช*, สุมาลี สังฆพรหม

Sitthipoj Phalitkusoltuch*, Sumalee Sungkhaprom

นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ*, นักเทคนิคการแพทย์

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิกโรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม

Medical Technologist, Professional Level*, Medical Technologist

Medical technologist and clinical pathology department, Nakhonpathom Hospital

*ผู้นิพนธ์หลัก (Corresponding Author); Email : poj_kku@hotmail.com

(Received: November 22, 2019, Revised: December 21, 2019, Accepted: December 24, 2019)

บทคัดย่อ

วัณโรค (Tuberculosis; TB) เป็นหนึ่งในโรคที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญในประเทศไทยโรคหนึ่ง การตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multi drug-resistant tuberculosis; MDR-TB) ทางห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ยังมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ ปัจจุบันมีการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง เช่น วิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ทดสอบมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีมาตรฐาน (Standard method) โดยใช้ตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วย 151 ตัวอย่าง ถูกนำมาประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs 2 ชนิด ได้แก่ ยา Rifampicin (RIF) และยา Isoniazid (INH) ด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการศึกษาพบว่า มีความไวร้อยละ 97.26, 100 และ 100 ค่าความจำเพาะร้อยละ 94.87, 100 และ 95.24 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 94.67, 100 และ 72.73 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 97.37, 100 และ 100 สำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรค, วัณโรคดื้อยา RIF และวัณโรคดื้อยา INH ตามลำดับ และพบตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันทั้งสองวิธีจากการตรวจวินิจฉัยวัณโรค และวัณโรคดื้อยา INH จำนวน 6 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีสำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้อง น่าเชื่อถือ และรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ต่อการวินิจฉัยในผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคได้

คำสำคัญ : Tuberculosis, multi drug-resistant tuberculosis, real-time PCR, standard method, ยา Rifampicin (RIF), ยา Isoniazid (INH)

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the causes of death in the world and is a major problem in Thailand. Culture is a standard method for diagnosis of tuberculosis and multi drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) but still have limitations. Currently, the molecular technique is high sensitivity and specificity which is a more popular method for testing. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the effectiveness of tuberculosis and multi drug-resistant tuberculosis diagnosis using real-time PCR method compared to the standard method. Sputum specimens from 151 patients evaluating the effectiveness of tuberculosis diagnosis and first line anti-tuberculosis drug resistance such as Rifampicin (RIF) and Isoniazid (INH) testing compared with culture method and drug susceptibility testing. A sensitivity of tuberculosis diagnosis, RIF resistance, and INH resistance using real-time PCR method compared to culture method was 97.26, 100 and 100 respectively. The result of tuberculosis diagnosis, RIF resistance and INH resistance with a specificity was 94.87, 100 and 95.24 respectively. A positive predictive value was 94.67, 100 and 72.73 and a negative predictive value of 97.37, 100 and 100 respectively. The inconsistent results from two methods for the diagnosis of tuberculosis and drug resistance INH found 6 and 3 samples, respectively. This study suggests that the real-time PCR technique is a method that provides accurate, reliable and fast for tuberculosis and its drug-resistant diagnosis for the benefit of diagnosis in patients with TB.

Keywords : Tuberculosis, multi drug-resistant tuberculosis, real-time PCR, standard method, Rifampicin drug (RIF), Isoniazid drug (INH)

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรค (Tuberculosis;TB) เป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่มีสาเหตุจากเชื้อ Mycobacterium Tuberculosis วัณโรคเป็นหนึ่งในโรคติดต่อที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในทั่วโลกและเป็นปัญหาสำคัญในประเทศไทยโรคหนึ่ง อุบัติการณ์ของการเกิดวัณโรคทั่วโลกในปี 2017 พบผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคประมาณ 10 ล้านคนและเสียชีวิตจากการติดเชื้อวัณโรค 1.6 ล้านคน โดยพบผู้ป่วยวัณโรคมากที่สุดในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ร้อยละ 44 และมีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multi drug-resistance TB; MDR-TB) ร้อยละ 82 อีกทั้งประเทศไทยถูกจัดให้เป็น 1 ใน 14 ประเทศที่พบว่ามีปัญหาวัณโรคสูง (High TB burden countries) โดยเฉลี่ยประชากรไทยมีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคคิดเป็น 156 ต่อแสนประชากร¹ ดังนั้นวัณโรคจึงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศไทย ในสถานการณ์ที่มีการติดเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานเพิ่มมากขึ้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อการวินิจฉัยวัณโรคจึงมีความสำคัญอย่างมากในการมีส่วนช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยมีโอกาสในการรักษาหายมากขึ้น ลดอัตราการครองเตียงในโรงพยาบาล และยังช่วยลดปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรครวมถึงวัณโรคดื้อยา ซึ่งเป็นมาตรการสำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมวัณโรค

การตรวจเพื่อการวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น การย้อมสี acid-fast strain และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์, การเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) แม้ว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเป็นวิธีที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและประหยัด แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความไว (sensitivity) ของการตรวจพบเชื้อ โดยจะต้องมีเชื้อในสิ่งส่งตรวจประมาณ 5,000-10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงจะสามารถตรวจพบเชื้อได้² ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจเป็นวิธีมาตรฐาน (standard method) ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าการ

ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่ก็มีข้อจำกัดเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจใช้เวลานานเฉลี่ยประมาณ 4-8 สัปดาห์³ ในทางตรงข้ามการตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจโดยการทดสอบทางอณูชีววิทยา (Molecular) หรือ PCR-based method เช่น real-time PCR เป็นอีกหนึ่งวิธีที่นิยมนำมาใช้ทดสอบในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) สูงและได้ผลที่รวดเร็ว

ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs 2 ชนิด ได้แก่ วัณโรคที่ดื้อต่อยา Rifampicin (RIF-R TB) และวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid (INH-R TB) ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป AnyplexTM MTB/NTM Real-time Detection และ AnyplexTM II MTB/MDR Detection เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Drug susceptibility test : DST) ในตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยรายใหม่ที่ถูกสงสัยว่าเป็นวัณโรคและมารับบริการการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม โดยการประเมินเปรียบเทียบกับหลักการทางสถิติหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบจากการศึกษาครั้งนี้สามารถเป็นหนึ่งในทางเลือกสำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานรวมถึงเพื่อให้ผู้ป่วยวัณโรคได้รับการวินิจฉัยและการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ถูกต้องและเหมาะสมกับผู้ป่วย

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษาเป็น Diagnostic test

ศึกษาในสิ่งส่งตรวจทางคลินิกชนิดเสมหะที่เก็บจากผู้ป่วยตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2559 ถึง ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 151 ราย ที่ส่งตรวจที่โรงพยาบาลนครปฐม โดยมีข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Real-time PCR และวิธีมาตรฐานเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจหาความไวต่อยา (drug susceptibility test)

ในกลุ่มยา first-line anti-tuberculosis drugs เรียบร้อยแล้ว

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Rifampicin (RIF-R TB) และวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid (INH-R TB) ด้วยวิธี Real-time PCR ในตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยรายใหม่ เทียบกับวิธีมาตรฐานเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (DST)

ขั้นตอนการศึกษา

1. การตรวจหาเชื้อวัณโรค (MTB), วัณโรคที่ดื้อต่อยา Rifampicin (RIF-R TB), วัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid (INH-R TB) ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และ Anyplex™ II MTB/MDR Detection

1.1 การ pre-treatment ตัวอย่างเสมหะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ⁴ เติมนาล์ค-NaOH (0.5% NALC, 2% NaOH, and 1.47% trisodium citrate) ลงในตัวอย่างเสมหะ ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที ต่อจากนั้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นปั่นด้วยความเร็วรอบ 15,000g (13,000 rpm) นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เติมน้ำละลาย 1X PBS ปริมาตร 1 ml และผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 15,000g (13,000 rpm) นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ซึ่งจะได้สารสุดท้ายเป็นตะกอน sediment ให้ทำการเติม Lysozyme solution 200 ul ลงในตะกอน sediment นั้น แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้น เติมนาล์ค A 4 ul ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมน้ำละลาย Proteinase K (10 mg/ml) 40 ul ผสมให้เข้ากัน นำเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ Magnesia 16 โดยใช้ชุดน้ำยา Magnesia 16 Genomic DNA Bacterial kit

1.2 การสกัดสารพันธุกรรม โดยเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ Magnesia16⁵

นำตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการ pre-treatment ปริมาตร 200 uL มาสกัดสารพันธุกรรมจากเครื่องสกัดสารพันธุกรรมอัตโนมัติ Magnesia16 (Anatolia Geneworks®, Turkey) ใช้หลักการ Cellulose coated magnetic beads extraction ด้วยน้ำยา Magnesia 16 Genomic DNA Bacterial Kit ซึ่งใช้เวลาการสกัดในเครื่อง 44 นาที โดยรูปแบบน้ำยาเป็นลักษณะ cartridge ที่บรรจุน้ำยา Lysis buffer, Binding buffer, Beads mixture, Wash 1 Buffer, Wash 2 Buffer, Distilled water และ Elution Buffer ซึ่ง eluted nucleic acid ที่ได้จะมีปริมาตร 60 uL

1.3 การตรวจวิเคราะห์และการแปลผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค (MTB) ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection⁴

นำสารพันธุกรรมที่สกัด มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค ตามวิธีการในคู่มือน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection ซึ่งเป็นการใช้เทคโนโลยี DPO โดยแต่ละตัวอย่างใช้สารพันธุกรรมที่สกัดได้ 5 uL รวมกับ Real-time PCR Master mix 15 uL ประกอบด้วย 10X MTB/NTM OM 2 uL, RNase-free water 3 uL และ 2X Anyplex PCR Master Mix (with UDG) 10 uL ต่อจากนั้น นำเข้าเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Real-time PCR System (Bio-Rad, USA) ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ pre-denaturation 95°C 15 นาที, ทำ PCR 45 รอบ โดย denaturation 95°C 30 วินาที, annealing และ extension 60°C 1 นาที โดยตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ขั้นตอนที่ 60°C เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลา 2 ชั่วโมง สามารถแปลผลการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรมการแปลผลอัตโนมัติ Seegene viewer ซึ่งตัวอย่างที่ถูกแปลผล MTB positive จะมีกราฟ Amplification curve เห็นเส้น Baseline threshold value ของสี FAM ที่ 1200 โดยมี Ct cutoff value ที่ 40 สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคชุดน้ำยามี DPO Primer ที่ตรวจจับยีน IS6110 และ MPB64 และในการตรวจวิเคราะห์ทุกรอบจะมีการควบคุมคุณภาพชุดน้ำยาโดย Positive และ Negative Amplification Controls ที่ให้มากับชุดน้ำยา และใน Master

mix มี Internal Control ถูกใส่มาเพื่อช่วยควบคุมในเรื่องของการยับยั้งปฏิกิริยาการทำ PCR โดย IC ได้ถูก optimize มาให้มีการเพิ่มปริมาณอย่างพอเหมาะควบคู่ไปกับสารพันธุกรรมเป้าหมายในตัวอย่างส่งตรวจ

1.4 การตรวจวิเคราะห์และการแปลผลการ

ตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin (RIF-R TB) และวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid (INH-R TB) ด้วยหลักการ Real-time PCR โดยน้ำยา Anyplex™ II MTB/MDR Detection⁶

นำสารพันธุกรรมของตัวอย่างที่ให้ผล MTB เป็นบวกจากน้ำยา Anyplex™ II MTB/NTM Real-time Detection มาตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin และวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid ตามวิธีการในคู่มือน้ำยา Anyplex™ II MTB/MDR Detection ซึ่งเป็นการใช้เทคโนโลยี DPO ร่วมกับ TOCE โดยแต่ละตัวอย่างใช้สารพันธุกรรม MTB ที่ให้ผลบวก ที่สกัดไว้ 5 uL รวมกับ Real-time PCR Master mix 15 uL ประกอบด้วย 4X MTB/MDR TOM 5 uL, RNase-free water 5 uL และ 4X Anyplex PCR Master Mix (with UDG) 5 uL ต่อจากนั้น นำเข้าเครื่อง Real-time PCR รุ่น CFX96 Real-time PCR System (Bio-Rad, USA) ตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ pre-denaturation 95°C 15 นาที, ทำ PCR 50 รอบ โดย denaturation 95°C 30 วินาที, annealing 60°C 1 นาที และ extension 72°C 30 วินาที, ทำ Melting curve analysis โดย Pre-melting 55°C 30 วินาที, melting analysis 55°C - 85°C (5 sec/0.5°C) โดยตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่ขึ้นตอน melting analysis เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ใช้เวลา 2 ชั่วโมง 40 นาที สามารถแปลผลการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรมการแปลผลอัตโนมัติ Seegene viewer ซึ่งตัวอย่างที่ถูกแปลผลเป็น RIF-R TB Positive จะมีสัญญาณ melting curve ของสี HEX, ตัวอย่างที่ให้ผล INH-R TB Positive จะมีสัญญาณ melting curve ของสี CalRed610, ตัวอย่างที่เป็นเชื้อวัณโรคที่ไม่ดื้อยาทั้งสองชนิดจะไม่มีสัญญาณใดๆ และหากตัวอย่างเป็น MDR-TB จะมีสัญญาณ melting curve ของทั้งสี HEX และ CalRed610 เกิดขึ้นในปฏิกิริยาของตัวอย่างนั้นๆ สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin (RIF-R TB)

เป็นการใช้ DPO Primer ตรวจจับยีน *rhoB* ของเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin ตรงตำแหน่งการกลายพันธุ์ครอบคลุม 18 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง : L511P(CCG), Q513K(AAA), Q513L(CTA), Q513P(CCA), 3 amino acid deletion in 513~516, D516V(GTC), D516Y(TAC), S522L(TTC), S522Q(CAG), H526C(TGC), H526D(GAC), H526L(CTC), H526N(AAC), H526R(CGC), H526Y(TAC), S531L(TTG), S531W(TGG) และ L533P(CCG) และการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid (INH-R TB) เป็นการใช้ DPO Primer ตรวจจับยีน *katG* และ *inhA* promoter ของเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid ตรงตำแหน่งการกลายพันธุ์ครอบคลุม 7 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง : *katG* S315I(ATC), S315N(AAC), S315T(ACC) และ S315T(ACA); *inhA* promoter -15(T), -8(A) และ -8(C) โดยรวมชุดน้ำยาสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ทั้งหมด 25 ตำแหน่ง ร่วมกับเทคโนโลยี TOCE ทำให้สามารถตรวจวัดสัญญาณเป็น melting curve โดยเชื้อ RIF-R TB จะถูกวัดที่ช่องสัญญาณ HEX, เชื้อ INH-R TB จะถูกวัดที่ช่องสัญญาณ CalRed610 และในการตรวจวิเคราะห์ทุกรอบจะมีการควบคุมคุณภาพชุดน้ำยาโดย Positive และ Negative Amplification Controls ที่ให้มากับชุดน้ำยา และยังมี Wild Type Control เป็นตัวควบคุมคุณภาพที่ใช้ในการเปรียบเทียบ melting curve กับผลของตัวอย่างในการทำงานรอบนั้นๆ และใน Master mix มี Internal Control ถูกใส่มาเพื่อช่วยควบคุมในเรื่องของการยับยั้งปฏิกิริยาการทำ PCR โดย IC ได้ถูก optimize มาให้มีการเพิ่มปริมาณอย่างพอเหมาะควบคู่ไปกับสารพันธุกรรมเป้าหมายในตัวอย่างส่งตรวจ

2. การตรวจหาเชื้อวัณโรคและความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Standard Method)

ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยรายใหม่ทุกราย ของปี พ.ศ. 2559 ถึง ปี พ.ศ. 2560 จำนวน 151 ราย จะถูกส่งตรวจหาเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Drug susceptibility test : DST) ที่กลุ่มห้องปฏิบัติการ

ทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดราชบุรี ตามขั้นตอนของห้องปฏิบัติการ³

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์อธิบายข้อมูลผลลัพธ์ลักษณะที่ศึกษาของ 2 กลุ่มและแสดงข้อมูลปริมาณด้วย จำนวน จำแนกตามกลุ่ม แสดงความถูกต้องของการตรวจด้วยค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value: PPV) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value: NPV) เปรียบเทียบระหว่างชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection และน้ำยา Anyplex™ II MTB/MDR Detection (Seegene Inc., South Korea) กับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (DST)

คำจำกัดความ

MTB หมายถึง เชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis*

MDR คือวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-Resistance Tuberculosis) หมายถึง เชื้อวัณโรคที่ดื้อยาต้านวัณโรคอย่างน้อย 2 ขนาน คือ Isoniazid (INH) และ Rifampicin (RMP)

วิธีมาตรฐาน (Gold standard) หมายถึง วิธีที่ยอมรับกันทั่วไปในสาขางานนั้นๆ และมักเป็นวิธีที่ผ่านการศึกษา collaborative trial มาแล้ว แต่อาจมีบางวิธีที่ไม่ผ่านการศึกษา collaborative trial แต่เป็นวิธีที่ใช้กันมานานและได้รับการยอมรับกันทั่วไปในสาขางานนั้นแล้ว อาจเป็นวิธีที่ดีพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ มาตรฐาน

ภูมิภาค หรือมาตรฐานของประเทศ หรือมาตรฐานขององค์กรที่มีชื่อเสียงในสาขานั้นๆ การศึกษาค้นคว้าวิธีมาตรฐานคือการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการศึกษา

ตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยรายใหม่ทุกรายที่ส่งตรวจหาเชื้อวัณโรคทั้งหมด 151 ตัวอย่าง นำมาประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs ด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การตรวจวินิจฉัยวัณโรค

ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคจากตัวอย่างทั้งหมด 151 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก (Positive) หรือ MTB detected ทั้งจากวิธี Real-time PCR ด้วยชุดน้ำยา Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V 2.0) และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) โดยให้ผลตรวจพบเชื้อ MTB (MTB detected) สอดคล้องกันทั้งหมด 71 ตัวอย่าง ให้ผลตรวจไม่พบเชื้อ หรือ MTB not detected สอดคล้องกันทั้งสองวิธี 74 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างทั้งหมด 6 รายที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันระหว่างสองวิธี ประกอบด้วย ตัวอย่าง 4 รายให้ผล MTB detected ด้วยวิธี Real-time PCR แต่ให้ผล MTB not detected กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และตัวอย่าง 2 รายให้ผล MTB not detected ด้วยวิธี Real-time PCR แต่ให้ผล MTB detected กับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture)

Real-time PCR	Culture		
	MTB detected	MTB not detected	Total
MTB detected	71	4	75
MTB not detected	2	74	76
Total	73	78	151

2. การตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยยาหลายขนาน

ตัวอย่างที่ให้ผล MTB detected สอดคล้องกันทั้งจากวิธี Real-time PCR และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) จำนวน 71 ตัวอย่าง ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์วัณโรคด้วยยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs 2 ชนิด ได้แก่ ทดสอบความไวต่อยา Rifampicin (RIF) และยา Isoniazid (INH) ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Anyplex™ II

MTB/MDR Detection เปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (DST)

ผลการทดสอบความไวต่อยา Rifampicin (RIF) พบว่า วิธี Real-time PCR และวิธีทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด โดยให้ผลไวต่อยา RIF (RIF-Resistance) 1 ตัวอย่าง และให้ผลไวต่อยา RIF (RIF-Susceptible) 70 ตัวอย่าง และไม่มีตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยยา Rifampicin (RIF) ด้วยวิธี Real-time PCR และวิธีทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Real-time PCR	Drug Susceptibility Test		
	RIF-Resistance	RIF-Susceptible	Total
RIF-Resistance	1	0	1
RIF-Susceptible	0	70	70
Total	1	70	71

ผลการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid (INH) มี 8 ตัวอย่างที่ให้ผลไวต่อยา INH (INH-Resistance) สอดคล้องกันทั้ง 2 วิธี, 60 ตัวอย่างที่ให้ผลไวต่อยา INH (INH-Susceptible) สอดคล้องกันทั้งจากวิธี Real-time PCR และ

วิธีทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ 3 ตัวอย่างที่ให้ผล Resistance กับวิธี Real-time PCR แต่ให้ผล Susceptible กับการทดสอบความไวต่อยา INH บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยยา Isoniazid (INH) ด้วยวิธี Real-time PCR และวิธีทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Real-time PCR	Drug Susceptibility Test		
	INH-Resistance	INH-Susceptible	Total
INH-Resistance	8	3	11
INH-Susceptible	0	60	60
Total	8	63	71

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) คิดเป็นร้อยละ 97.26, 94.87, 94.67, และ 97.37 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4

จากผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs โดยทดสอบความไวต่อยา Rifampicin (RIF) ด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) คิดเป็นร้อยละ 100, 100, 100 และ 100 ตามลำดับ และการทดสอบความไวต่อยา Isoniazid

(INH) ด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และ ค่าทำนายผลลบ (Negative

Predictive Value) คิดเป็นร้อยละ 100, 95.24, 72.73 และ 100 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ทางสถิติการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

Testing	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Positive Predictive Value (%)	Negative Predictive Value (%)
MTB	97.26	94.87	94.67	97.37
RIF	100	100	100	100
INH	100	95.24	72.73	100

วิจารณ์

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Real-time PCR เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่ามีค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) ใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Seo Woo Kim และคณะ⁷ และมีตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันทั้งสองวิธีจากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time PCR และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ สำหรับกรณีแรกตรวจพบเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Real-time PCR แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากในตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยมีปริมาณของเชื้อวัณโรคที่น้อย โดยการเพาะเลี้ยงเชื้ออาศัยหลักการให้เชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิและสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างจากวิธี Real-time PCR ที่เป็นการตรวจปริมาณสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อวัณโรคโดยจะสามารถตรวจหาในกรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อยได้ ดังนั้น ในตัวอย่างเสมหะที่มีเชื้อวัณโรคปริมาณน้อยจึงเป็นสาเหตุให้ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อได้ ส่วนในกรณีที่สองที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียว และตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR นั้นอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ คุณภาพของตัวอย่างเสมหะที่ใช้ทดสอบ, ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่าง (pre-treatment)

ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR อาจจะมีตัวยับยั้งในกระบวนการทำ PCR (PCR inhibitor)

ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาในกลุ่ม first-line anti-tuberculosis drugs โดยทดสอบความไวต่อยา Rifampicin (RIF) และยา Isoniazid (INH) ด้วยวิธี Real-time PCR มีค่าความไว (sensitivity), ค่าความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value) ใกล้เคียงกับการศึกษาของไกรฤกษ์ สุธรรมและคณะ³ และการศึกษาของสมศักดิ์ สันธูไรและคณะ⁸ จากการศึกษาพบกรณีที่ให้ผลการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Real-time PCR ไม่สอดคล้องกับการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อกรณีที่ตรวจพบการดื้อยา INH ด้วยวิธี Real-time PCR แต่ไม่พบการดื้อยา INH ด้วยการทดสอบความไวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสาเหตุที่ตรวจไม่พบการดื้อยาดูจากการทดสอบความไวต่อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อวัณโรคที่ตรวจได้จากวิธี Real-time PCR เป็นการตรวจพบจากสารพันธุกรรม (DNA) ของเชื้อวัณโรคที่ตายแล้ว หรืออาจเกิดจากเชื้อในตัวอย่างเสมหะมียีสสองกลุ่ม (mixed population) คือมีทั้งกลุ่มเชื้อวัณโรคที่มียีสดื้อยาและที่ไม่มียีสดื้อยา จึงทำให้เชื้อในกลุ่มที่ไม่มียีสดื้อยาสามารถเจริญเติบโตบนเชื้อที่มียีสดื้อยา จึงอาจจะทำให้ตรวจไม่พบการดื้อยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งข้อเท็จจริงด้านความไม่สอดคล้องกันของผลการตรวจวินิจฉัยนั้น อาจ

ทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมด้วยวิธีการวิเคราะห์อื่นๆ หรือยืนยันผลด้วยวิธีการหาลำดับเบส (Sequencing) ประกอบกับการพิจารณาอาการของผู้ป่วยเพิ่มเติมได้

สรุป

การศึกษานี้แม้ว่าวิธี real-time PCR จะให้ผลความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานแต่เมื่อเทียบ ต้นทุนในการตรวจ พบว่า วิธี real-time PCR ยังมีต้นทุนค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าวิธีมาตรฐานทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ได้เฉพาะในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ที่มีงบประมาณอย่างเพียงพอ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการติดเชื้อวัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะการเพิ่มจำนวนของการติดเชื้อวัณโรคที่มีการดื้อยาหลายขนานหรือดื้อยาอย่างกว้างขวางเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ การตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำ รวดเร็ว ให้ผลถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือ โดยสามารถทราบรูปแบบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคตั้งแต่แรกย่อมส่งผลดีต่อการวางแผนการรักษาและการควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยรายใหม่ และผู้ป่วยที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ ทำให้ลดโอกาสในการกระจายเชื้อจากผู้ป่วยไปยังบุคคลอื่นได้ ดังนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถที่จะใช้เทคนิค Real-time PCR เป็นหนึ่งในวิธีสำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในผู้ป่วยวัณโรคได้ อีกทั้งยังช่วยลดเวลาในการรายงานผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้แพทย์สามารถนำผลการวินิจฉัยไปประเมินการรักษาผู้ป่วยต่อไปได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว เพื่อประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรค และช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาไม่ให้ออกสู่ชุมชน โดยทั้งนี้ เมื่อคิดต้นทุนเทียบกับประสิทธิผล จะพบว่า การนำวิธี real-time PCR มาตรวจหาเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยต้องใช้ต้นทุนสูงกว่าการใช้วิธีมาตรฐานแต่ให้ประสิทธิผลในการตรวจหาเชื้อวัณโรคได้ดีกว่า

บรรณานุกรม

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. [Internet] 2018. [cited 2019 February 13]. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. Kent PT, Kubica GP, Centers for Disease C. Public health mycobacteriology : a guide for the level III laboratory. Atlanta, Ga.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. 1985;1-226
3. Suthum K, Tipkrua N. Comparison of Mycobacterium tuberculosis drug resistance testing between Real-time PCR using a Dual Priming Oligonucleotide Method and drug susceptibility testing by The BACTECTM MGITTM 960 System. J Med Tech Assoc Thailand 2013;41:4654-66.
4. Seegene, Inc., Korea. User Manual: AnyplexTM MTB/NTM Real-time Detection (V2.0). 2015;3.02:15-23.
5. Anatolia Geneworks®, Turkey. User Manual: Magnesia16 Nucleic Acid Extraction Kit. 2012;4.0:17-18.
6. Seegene, Inc., Korea. User Manual: AnyplexTM II MTB/MDR Detection. 2015;1.0:15-28.
7. Kim SW, Kim SI, Lee SJ, Lee JH, Ryu YJ, Shim SS, et.al. The effectiveness of real-time PCR assay, compared with microbiologic results for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2015;78(1):1-7.

8. สมศักดิ์ สินธุไธ, กัญณภัทร เกษรสุคนธ์,
ปัทมา กล่อมพร, ธนกร โพธิ์วงศ์, รัชณีพร
คำมินทร์, และสุวรรณี กิริติวาสี. การตรวจ
วินิจฉัยและการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ
วัณโรคด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป AnyplexTM
Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน
การเพาะเลี้ยงเชื้อ. วารสารเทคนิคการแพทย์
เชียงใหม่ ปีที่ 49. 2559;218-226.