

Evaluation of Reverse Blot Hybridization Assay for Detection of Mycobacteria

Nitaya Teerawatanasuk* Peerapat Phaktapha and
Benjawan Homkanjan

Department of Medical Technology, Sunpasitthiprasong Hospital, Ubon Ratchathani Province, Thailand

Abstract

Mycobacterial infection is a contagious disease that can occur in all human organs, mostly the lungs (80%). Extrapulmonary mycobacterial infection can be found in several tissue sites including lymph nodes, spine, abdomen, urinary tract, reproductive organ and neuronal organ. Conventional diagnosis of mycobacterial infection can be done by two methods, acid-fast staining (AFB) and mycobacterial culture. Each method has its own limitation, for instance, AFB staining requires large numbers of microbial pathogens in order to be detected, whereas mycobacterial culture takes 2 - 3 months to get the result. In this study, a novel molecular method, the REBA Myco-ID[®] test kit using reverse blot hybridization assay, has been used to detect mycobacterial pathogen in specimens collected from various organs containing small number of mycobacteria or non-tuberculous mycobacteria (NTM). Comparative study of the results using real time PCR, DNA sequencing and REBA Myco-ID[®] test in 34 samples showed the overall consistency with 100% sensitivity and specificity. In addition, the sensitivity of AFB staining, mycobacterial culture method and REBA Myco-ID[®] test were also compared. The sensitivity of AFB staining was found to be 35.3% and that of the culture method was 66.7%. In conclusion, the results suggested that REBA Myco-ID[®] test provides a high sensitivity and specificity test results for mycobacterial diagnosis. Despite the high cost, the method is considered worthwhile to be used for diagnosis of mycobacterial infection, particularly extrapulmonary mycobacterial infection, NTM infection and clinical specimens with low number of mycobacterial pathogens.

Keywords: Diagnosis of mycobacterial infection, Reverse blot hybridization assay, Real Time PCR, DNA sequencing

*Corresponding author E-mail address: nidteeraw@gmail.com

Received: 6 February 2019

Revised: 24 April 2019

Accepted: 22 May 2019

การประเมินผลการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยวิธี Reverse Blot Hybridization

นิตยา ธีระวัฒนสุข* พีรภัทร ภักตะภา และ เบญจวรรณ หอมแก่นจันทร์

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สามารถพบได้ในทุกอวัยวะของร่างกาย โดยส่วนใหญ่มักพบที่ปอด (ร้อยละ 80) ส่วนวัณโรคนอกปอดอาจพบได้ในอวัยวะอื่น เช่น ต่อม้ำน้ำเหลือง กระดูกสันหลัง ช่องท้อง อวัยวะในระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบสืบพันธุ์ และระบบประสาท การวินิจฉัยวัณโรคนิยมตรวจด้วยวิธีย้อมด้วยสีทึบกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อและวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อ แต่ทั้งสองวิธีมีข้อจำกัด โดยการย้อมด้วยสีทึบกรดต้องมีปริมาณของเชื้อในสิ่งส่งตรวจมากพอจึงจะตรวจพบได้ ส่วนการเพาะเลี้ยงและวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อต้องใช้ระยะเวลานาน 2-3 เดือน การศึกษานี้ได้นำชุดตรวจ REBA Myco-ID® ซึ่งอาศัยหลักการ reverse blot hybridization assay มาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากอวัยวะที่อาจมีเชื้อวัณโรคในปริมาณน้อย หรือมีการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค (non-tuberculous mycobacteria; NTM) โดยศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธี real time PCR และ DNA sequencing ผลการศึกษาในตัวอย่าง 34 ราย พบว่าผลตรวจด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID® มีความสอดคล้องกับผลตรวจจากวิธี real time PCR และ DNA sequencing โดยมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาข้อมูลย้อนหลังเพื่อหาความไวของผลการตรวจด้วยวิธีย้อมด้วยสีทึบกรดและการเพาะเลี้ยงและวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อ เปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี REBA Myco-ID® พบว่าการตรวจด้วยวิธีย้อมด้วยสีทึบกรดและการเพาะเชื้อ มีความไวร้อยละ 35.3 และ 66.7 ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี REBA Myco-ID® มีความไวและความจำเพาะสูง แม้จะมีต้นทุนค่าใช้จ่ายสูง แต่ก็มีคุณค่าเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรีย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค และสิ่งส่งตรวจที่อาจมีปริมาณของเชื้อก่อโรคน้อย

คำสำคัญ: การวินิจฉัยวัณโรค, Reverse blot hybridization assay, Real time PCR, DNA sequencing

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: nidteeraw@gmail.com

รับบทความ: 6 กุมภาพันธ์ 2562

แก้ไขบทความ: 24 เมษายน 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 22 พฤษภาคม 2562

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis: TB) จัดเป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่พบบ่อยที่สุด และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตทั่วโลก เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MTB complex) ซึ่งเป็นสาเหตุการแพร่ระบาดของโรคที่มีผลกระทบต่อสุขภาพของประชาชนอย่างรุนแรง มีผู้ติดเชื้อนี้เป็นจำนวนสูงถึง 8.6 ล้านคนต่อปี และมีผู้ติดเชื้อเสียชีวิตมากกว่า 1.3 ล้านคน⁽¹⁾ ปัจจุบันผู้ป่วยวัณโรคในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยองค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่ยังคงมีปัญหาวัณโรค วัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี และวัณโรคดื้อต่อยาหลายขนาน (multidrug resistant TB; MDR-TB) ในอัตราสูง ตามการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลก ในปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยจะมีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำ 119,000 ราย ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 10,000 ราย และผู้ป่วยวัณโรคดื้อต่อยา rifampicin (rifampicin resistant TB; RR-TB) หรือดื้อต่อยาหลายขนาน (MDR-TB) 4,700 ราย ผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2559 จากรายงานของสำนักวัณโรค พบว่ามีผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรักษาวัณโรคที่เป็นผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยที่กลับมาเป็นซ้ำมากถึง 70,114 ราย ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 6,794 ราย (ร้อยละ 11 ของผู้ที่ได้รับการตรวจหาเชื้อเอชไอวี) วัณโรคดื้อต่อยาหลายขนาน (MDR-TB) ที่ดื้อต่อการรักษาด้วยยา isoniazid และ rifampicin 955 ราย และวัณโรคดื้อต่อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (extensively drug-resistant TB; XDR-TB) ซึ่งเป็น MDR-TB ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquinolones และ second-line injectable ด้วย 13 ราย⁽²⁾

เชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไม่ก่อให้เกิด

เกิดวัณโรค (non-tuberculous mycobacteria; NTM) ได้แก่ *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus* และ *M. massiliense* สามารถก่อโรคได้ในหลายส่วนของร่างกาย เช่น การติดเชื้อในปอด (pulmonary) ผิวหนังและเนื้อเยื่อ (skin and soft tissue) และต่อมน้ำเหลือง (lymph node) ซึ่งในปัจจุบันการติดเชื้อ NTM เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 20 เป็นร้อยละ 50 และในหลายประเทศยังพบการติดเชื้อ NTM บ่อยกว่าการติดเชื้อ *M. tuberculosis* นอกจากนี้การก่อโรคของเชื้อ NTM ยังมีความผันแปรและทำให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรง โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ หรือผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง^(3, 4)

การตรวจวินิจฉัยแยกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการติดเชื้อเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากการรักษา การพยากรณ์โรค และความสำคัญทางระบาดวิทยา (epidemiology) ของเชื้อ NTM มีความแตกต่างจากการติดเชื้อ *M. tuberculosis* อย่างมีนัยสำคัญ การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยการย้อมด้วยสีทึบกรด หรือ acid fast staining เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย ราคาถูกและทราบผลอย่างรวดเร็ว แต่เทคนิคนี้มีความไวต่ำและไม่สามารถใช้วินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อ *M. tuberculosis* และ NTM ได้ ส่วนการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจในอาหารแข็งชนิด Lowenstein-Jensen และ อาหารเหลว โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ เช่น MB/BacT ALERT 3D System (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) และ BACTEC MGIT 960 System (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)⁽⁵⁾ เป็นการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคตามมาตรฐาน แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากการเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรียในอาหารแข็งต้องใช้เวลาให้เชื้อเจริญเติบโตประมาณ 30-50 วัน และในอาหารเหลวประมาณ 15-20 วัน ดังนั้น ปัจจุบันห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงนิยม

นำเทคนิคการวินิจฉัยเชื้อมัยโคแบคทีเรียระดับโมเลกุล (molecular diagnosis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) มาใช้แพร่หลายมากขึ้น

ชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] (YD Diagnostics, Republic of Korea) เป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ reverse blot hybridization assay (Line Probe Assay; PCR-Assay) โดยใช้ Myc probe ที่จำเพาะต่อเชื้อมัยโคแบคทีเรีย และ multiple probes ที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tuberculosis* และมัยโคแบคทีเรียสปีชีส์อื่นที่มีความสำคัญทางคลินิก มาตรึงบนแผ่นเมมเบรน ก่อนนำตัวอย่างทดสอบที่ได้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วมา hybridize กับ probe บนแผ่นเมมเบรน ทำให้สามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้ถึง 21 สายพันธุ์ในครั้งเดียว ได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* complex, *M. ulcerans*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. haemophilum*, *M. genavense*/ *M. simiae*, *M. terrae*/ *M. nonchromogenicum*, *M. celatum*, *M. gordonae*, *M. szulgai*, *M. mucogenicum*, *M. aubagnense* และ *Mycobacterium* spp. จึงสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยไม่ต้องรอผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยของแพทย์ได้ทันที

โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ มีการส่งตัวอย่างที่เป็นเสมหะและไม่ใช่เสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียในระดับโมเลกุลจำนวนค่อนข้างมาก จึงได้นำชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] มาใช้ และเพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจจึงได้ศึกษา

เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] และวิธีการตรวจระดับโมเลกุลอื่นๆ อีก 2 วิธี ได้แก่ real time PCR และ DNA sequencing รวมทั้งวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ได้แก่ การย้อมด้วยสีทึบกรดและการเพาะเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างเป็นส่งตรวจที่เก็บจากอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเสมหะ

วัสดุและวิธีการ

1. การคัดเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ ได้จากส่งตรวจที่แพทย์ส่งตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่งานอณูชีวโมเลกุล โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ โดยการสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) ในช่วงระยะเวลา 3 เดือน ตั้งแต่เดือนมกราคม-เดือนมีนาคม 2561 จำนวนตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมดรวม 34 ราย เป็นเสมหะ 10 ราย น้ำจากอวัยวะภายใน หลอด หรือชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆ 24 ราย ซึ่งเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลือจากการตรวจด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] และทราบผลการตรวจแล้ว โดยเลือกสุ่มตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] เป็นบวก 24 ตัวอย่าง และให้ผลการตรวจเป็นลบ 10 ตัวอย่าง เพื่อส่งตรวจยืนยันด้วยวิธี real time PCR ที่บริษัท YD Diagnostics ประเทศเกาหลี และ DNA sequencing ที่บริษัท Bionics Company sequencing service ประเทศเกาหลี

2. การสกัดแยกดีเอ็นเอ

สกัดแยกดีเอ็นเอในสิ่งส่งตรวจ โดยเติมสารละลาย 4% NaOH (ถ้าเป็นสารคัดหลั่งและน้ำไขสันหลัง ใช้ 2% NaOH) เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้ได้ 50 มิลลิลิตร

ก่อนนำไปปั่นที่ 4,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนผสมกับน้ำ จากนั้นดูดส่วนผสม 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด เติมน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด ก่อนเติมน้ำกลั่น 1.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นอีกรอบ แล้วดูดส่วนใสทิ้งให้หมด เติมน้ำ DNA extraction solution 50 ไมโครลิตร เขย่านาน 1 นาที แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C โดยใช้ heat-block หรือ boiling water bath นาน 10 นาที นำไปปั่น 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใส (supernatant) มาใช้เป็นดีเอ็นเอสายแม่แบบสำหรับการตรวจด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID®, real time PCR และ DNA sequencing

3. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID®

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID® เริ่มจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยวิธี PCR โดยใช้ REBA Myco-ID® Primer I และ Primer II ตามวิธีในเอกสารของชุดน้ำยา จากนั้นนำ PCR product มา hybridize กับ specific probe ที่ตรึงอยู่บน nylon membrane strip แล้วตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และแปลผลชนิดของเชื้อโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ HybREAD 480 หลักการ reverse blot hybridization ตามวิธีการของบริษัท⁽⁶⁾

4. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยวิธี real time PCR

การจำแนกสปีชีส์เชื้อ *M. tuberculosis* และ NTM ด้วยวิธี real time PCR เพื่อยืนยันว่ามีเชื้อวัณโรคแบคทีเรียในตัวอย่างที่ศึกษาหรือไม่ และเป็นเชื้อ *M. tuberculosis* หรือ NTM โดยใช้ชุด

น้ำยา Real MTB-ID® (YD Diagnostics, Republic of Korea) ตามเอกสารชุดน้ำยาของบริษัทผู้ผลิต

5. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยวิธี DNA sequencing

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยวิธี DNA sequencing โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ RNA polymerase β -subunit-encoding gene (*rpo B*)⁽⁷⁾ ของเชื้อวัณโรคแบคทีเรีย แล้วนำมาหาลำดับเบสด้วยวิธี chain termination method โดยใช้ BigDye® terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) และเครื่องอ่านลำดับเบสดีเอ็นเอแบบอัตโนมัติ ABI 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) นำลำดับเบสบนสายนิวคลีโอไทด์ของเชื้อวัณโรคแบคทีเรียในตัวอย่างที่อ่านได้ ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อวัณโรคแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank ของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เพื่อวิเคราะห์สปีชีส์ของเชื้อที่พบในตัวอย่างที่ศึกษา

ผลการศึกษา

1. ชนิดของตัวอย่าง

จากตัวอย่างทั้งหมด 34 ราย เป็นเสมหะ (sputum) 10 ราย น้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid; CSF) 6 ราย น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) 6 ราย ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง (tissue from lymph nodes) 3 ราย น้ำจากช่องเยื่อหุ้มหัวใจ (pericardial effusion) 2 ราย และอื่นๆ (epidural fluid, bone marrow, spinal cord, tissue, pus, peritoneal dialysis) 7 ราย ให้ผลการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อวัณโรคแบคทีเรียด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID® พบเชื้อ *M. tuberculosis* complex

(MTB complex) 17 ราย โดยตรวจพบจากเสมหะ 7 ราย น้ำไขสันหลัง 2 ราย น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด 3 ราย ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง 2 ราย และอื่นๆ (spinal cord, tissue และ pus) 3 ราย นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* spp. อีก 6 ราย โดยตรวจพบจากเสมหะ 1 ราย น้ำไขสันหลัง 1 ราย

น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด 1 ราย น้ำจากช่องเยื่อหุ้มหัวใจ 1 ราย และอื่นๆ (bone marrow และ epidural fluid) 2 ราย และพบ *M. abscessus* 1 รายจากเสมหะ ส่วนตัวอย่างอีก 10 ราย ตรวจไม่พบเชื้อ (Table 1)

Table 1 Identification of Mycobacteria in 34 Specimens using REBA Myco-ID®

Specimen	MTB complex	<i>Mycobacterium</i> spp.	<i>M. abscessus</i>	Negative	Total
Sputum	7	1	1	1	10
CSF	2	1	0	3	6
Pleural effusion	3	1	0	2	6
Lymph nodes	2	0	0	1	3
Pericardial	0	1	0	1	2
Epidural fluid	0	1	0	1	2
Others	3	1	0	1	5
Total	17	6	1	10	34

2. ประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อมัคโคแบคทีเรียด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID®

เนื่องจากบางตัวอย่างมีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอต่อการทดสอบด้วยวิธีตรวจระดับโมเลกุลได้ทั้งสองวิธี คือ real time PCR และ DNA sequencing จึงทำให้จำนวนตัวอย่างที่ใช้สำหรับการตรวจของแต่ละวิธีไม่เท่ากัน โดยตัวอย่าง 17 ราย ที่ตรวจพบ MTB complex ด้วยชุดตรวจ REBA Myco-ID® ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ตรวจด้วยวิธี real time PCR ทั้งหมด และเมื่อนำตัวอย่างเหล่านี้ 13 ราย มาตรวจด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าให้ผลเป็น MTB complex ตรงกันทั้งหมด เมื่อศึกษาข้อมูลย้อนหลังของตัวอย่างทั้ง 17 รายนี้ พบว่ามีการตรวจโดยการย้อมด้วยสีทึบกรด 13 ราย ซึ่งให้ผลบวก 4 ราย (ร้อยละ 30.8) เป็นเสมหะ 3 ราย (AFB 2+ จำนวน 1 ราย, AFB 3+ จำนวน 2 ราย) และชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง 1 ราย (AFB 3+) นอกจากนั้นยังได้ตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ 10 ราย พบ MTB 8 ราย (ร้อยละ 80) จากเสมหะ 3 ราย ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง 2 ราย หนอง 1 ราย น้ำไขสันหลัง 1 ราย และน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด 1 ราย

ตัวอย่างที่ชุดตรวจ REBA Myco-ID® ตรวจพบว่าเป็นเชื้อ *Mycobacterium* spp. มี 6 ราย และ *M. abscessus* 1 ราย ให้ผลตรวจสอดคล้องกับผลที่ได้จากวิธี sequencing ทั้งหมด เมื่อนำตัวอย่างจากกลุ่มนี้ 2 รายไปตรวจด้วยวิธี real time PCR ให้ผลเป็น *Mycobacterium* spp. ทั้ง 2 ราย นอกจากนี้ตัวอย่างทั้ง 7 รายได้เคยมีการตรวจโดยการย้อมด้วยสีทึบกรด 4 ราย ซึ่งให้ผลบวก 2 รายจากเสมหะ ส่วน

ละ 30.8) เป็นเสมหะ 3 ราย (AFB 2+ จำนวน 1 ราย, AFB 3+ จำนวน 2 ราย) และชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง 1 ราย (AFB 3+) นอกจากนั้นยังได้ตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อ 10 ราย พบ MTB 8 ราย (ร้อยละ 80) จากเสมหะ 3 ราย ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง 2 ราย หนอง 1 ราย น้ำไขสันหลัง 1 ราย และน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด 1 ราย

ไขกระดูกและสิ่งส่งตรวจจากฝีตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีนี้ ส่วนการตรวจด้วยวิธีเพาะเชื้อมี 2 ราย แต่ไม่พบเชื้อ

ตัวอย่างที่ชุดตรวจ REBA Myco-ID® ให้ผลลบ 10 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยวิธี DNA sequencing ให้ผลลบตรงกันทุกราย โดยมีตัวอย่างจากน้ำไขสันหลัง 1 รายที่พบเชื้อ *Nocardia* spp. หรือ *Rhodococcus* spp. โดยวิธี DNA sequencing ส่วนการตรวจด้วยวิธี real time PCR 2 รายให้ผลลบทั้ง 2 ราย (Table 2)

เมื่อศึกษาชนิดของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคแบคทีเรียโดยวิธีต่าง ๆ (Table 3) พบว่าชุดตรวจ REBA Myco-ID® ให้ผลบวกสอดคล้องกับวิธี real time PCR และวิธี DNA Sequencing ในตัวอย่างทุกชนิด ส่วนข้อมูลการศึกษาย้อนหลังของการส่งตรวจด้วยการย้อมด้วยสีทึนกรด และการเพาะเชื้อในรายที่ให้ผลบวก มีการส่งตรวจ AFB 17 ราย ให้ผลบวกเพียง 6 ราย (ร้อยละ 35.3) และส่งตรวจเพาะเชื้อ 12 ราย พบเชื้อ 8 ราย (ร้อยละ 66.7)

Table 2 Comparison of REBA Myco-ID® with four different methods in detection of mycobacterial pathogens

REBA Myco- ID®	Real Time PCR	DNA Sequencing	AFB stain	Culture
MTB complex (17)	17/17 (100%)	13/13 (100%)	4/13 (30.8%)	8/10 (80%)
<i>Mycobacterium</i> spp. (6)	2/2 (100%)	6/6 (100%)	1/3 (33%)	0/2
<i>M. abscessus</i> (1)	-	1/1 (100%)	1/1 (100%)	-
Negative (10)	2/2 (100%)	9/9 (100%)	7/7 (100%)	4/4 (100%)

Table 3 Comparison of positive results out of total specimens tested among five different methods

Specimen	REBA Myco- ID®	Real Time PCR	Sequencing	AFB stain	Culture
Sputum	9(9)	7(7)	6(6)	5(9)	3(6)
CSF	3(3)	2(2)	2(2)	-	-
Pleural effusion	4(4)	3(3)	4(4)	0(2)	1(1)
Lymph nodes	2(2)	2(2)	2(2)	1(1)	2(2)
Pericardial	1(1)	1(1)	1(1)	-	-
Epidural fluid	1(1)	-	1(1)	0(1)	-
Others	4(4)	4(4)	4(4)	0(4)	2(3)
Total	24(24)	19(19)	20(20)	6(17)	8(12)

() =Total specimens Tested

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยชนิดของเชื้อมัคโคแบคทีเรียโดยวิธี reverse blot hybridization assay โดยใช้ชุดตรวจ REBA Myco-ID[®] พบว่ามีความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐานทางโมเลกุลอื่นๆ ได้แก่ วิธี real time PCR และ DNA sequencing ในทุกตัวอย่างที่ได้เปรียบเทียบโดยมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wang HY และคณะ⁽⁸⁾ ที่ได้ศึกษาการวินิจฉัยชนิดของเชื้อมัคโคแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจระบบทางเดินหายใจที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดน้ำ (BACTEC[™] MGIT[™] 960 system) โดยใช้ REBA Myco-ID[®] เปรียบเทียบกับ real time PCR และ PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) จากการศึกษาพบว่า REBA Myco-ID[®] มีความไวในการวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* (MTB) และ nontuberculous mycobacteria (NTM) ร้อยละ 100 และ 97.5 ตามลำดับ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาย้อนหลังผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยการย้อมด้วยสีทึนกรด และการตรวจเพาะเชื้อ พบว่าในตัวอย่าง 34 รายที่ส่งมาศึกษามีการส่งย้อมด้วยสีทึนกรด 24 ราย ส่งตรวจเพาะเชื้อ 17 ราย วิธีย้อมด้วยสีทึนกรดมีความไวในการตรวจพบเชื้อร้อยละ 35.3 ส่วนการเพาะเชื้อมีความไวในการตรวจพบเชื้อร้อยละ 66.7 ซึ่งเป็นข้อมูลที่สอดคล้องกับผลการวิจัยอื่นที่ผ่านมว่า การตรวจคัดกรองด้วยการย้อมด้วยสีทึนกรดมีความไวต่ำ สิ่งส่งตรวจต้องมีเชื้อมากถึง 5,000-10,000 เซลล์ในสิ่งส่งตรวจ 1 มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก ส่วนการเพาะเชื้อจะพบการเจริญเติบโตของเชื้อได้หากในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณเชื้อที่ 10-100 เซลล์ในปริมาตรสิ่งส่งตรวจ 1 มิลลิลิตร⁽⁹⁾ ดังนั้นสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณเชื้อน้อย เช่น น้ำจากอวัยวะภายในจะมีโอกาสให้ผลบวกจากการย้อมด้วยสี

ทึนกรดน้อยมาก ส่วนการเพาะเชื้อมีความไวในการตรวจพบเชื้อสูงขึ้นแต่ต้องใช้ระยะเวลาจนถึงทราบผล ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการวินิจฉัยโรคแทน เช่น วิธี reverse blot hybridization assay ที่มีความไวและความจำเพาะสูงสามารถทราบผลการตรวจภายในระยะเวลาสั้นๆ และให้ผลเชื่อถือได้ทั้งในการตรวจหา *M. tuberculosis* และ NTM นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรียได้หลายชนิดในคราวเดียวกัน ซึ่งในปัจจุบันเริ่มพบการติดเชื้อมัคโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรคมากขึ้น โดยเฉพาะในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง จากการศึกษาวิจัยของ McCarthy KD และคณะในปี พ.ศ. 2555⁽¹⁰⁾ ได้เก็บข้อมูลผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยและเวียดนาม รวม 1,060 ราย พบผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรค 124 ราย (ร้อยละ 12) แต่ติดเชื้อ NTM จำนวนมากถึง 218 ราย (ร้อยละ 21) ส่วนการศึกษาวิจัยของ Ridpeng A และคณะ⁽¹¹⁾ ในผู้ป่วยเด็กติดเชื้อเอชไอวี อายุ 0-15 ปีที่เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ที่ติดเชื้อมัคโคแบคทีเรีย ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2545 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2555 จำนวน 28 ราย พบว่ามีการติดเชื้อ *M. tuberculosis* 17 ราย และติดเชื้อ NTM 11 ราย โดยพบ *Mycobacterium avium* complex (MAC) 7 ราย (ร้อยละ 63.6) *M. sacrofuracim* 2 ราย (ร้อยละ 18.2) และ *M. kansasii* 2 ราย (ร้อยละ 18.2) ส่วนผลการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ *M. tuberculosis* พบว่ามีผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาหาย 14 ราย (ร้อยละ 82) ผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาต่อเนื่อง 3 ราย (ร้อยละ 18) ไม่มีผู้ป่วยเสียชีวิต สำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTM พบว่าผู้ป่วยได้รับการรักษาหาย 6 ราย (ร้อยละ 55) ผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาต่อเนื่อง 1 ราย (ร้อยละ 9) และมีผู้ป่วยเสียชีวิต 4 ราย (ร้อยละ 36) นอกจากนี้ยัง

พบว่าเชื้อ NTM มีการติดต่อทางด้านจุลชีพสูง ดังนั้น การจำแนกสปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียจึงมีความสำคัญ ต่อการเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วย

ถึงแม้ต้นทุนค่าใช้จ่ายในการวินิจฉัยโรคโดยการตรวจระดับโมเลกุล (molecular diagnosis) จะสูงกว่าการย้อมด้วยสีทึบกรดและการเพาะเชื้อ มากกว่า 4 เท่า แต่ระยะเวลาในการรู้ผลตรวจอย่าง ถูกต้องจะเร็วกว่ามาก ซึ่งจะเกิดประโยชน์ทางคลินิก ต่อแพทย์ในการตัดสินใจเลือกแนวทางการรักษาผู้ป่วย ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างรวดเร็วก่อนที่จะโรคลุกลามและแพร่ กระจายเชื้อให้ผู้อื่นมากขึ้น และเพื่อช่วยลดอัตราการ ติดเชื้อวัณโรคในประชากรให้เมืองไทยปลอดวัณโรค ได้เร็วขึ้นตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุข

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท YD Diagnostics (ประเทศไทย) จำกัด ในการสนับสนุนการตรวจยืนยัน ด้วยวิธี real time PCR และ DNA sequencing

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. WHO/HTM/TB/2013.15. Geneva, Switzerland: WHO, 2013. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Accessed May 2014.
2. Bureau of Tuberculosis, Ministry of Public Health. National tuberculosis Control Programme Guideline, Thailand, 2018. 1st ed. Bangkok: Graphic and design, 2018. (in Thai)
3. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.
4. Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 970-6.
5. Antonio S, Soria I, Roman J, *et al.* Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of Mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19:1259-64.
6. YD Diagnostics. User Manual of Molecu-Tech HybREAD480; rev November 2013.
7. Kim BJ, Hong SK, Lee KH, *et al.* Differential Identification of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous Mycobacteria by duplex PCR assay using the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1308-12.
8. Wang HY, Kim H, Kim S, Bang H, Kim DK, Lee H. Evaluation of PCR-reverse blot hybridization assay for the differentiation and identification of *Mycobacterium* species in liquid cultures. *J Appl Microbiol* 2014; 118; 142-51.

9. Vignesh R, Balakrishnan P, Shankar EM, *et al.* Value of single acid-fast bacilli sputum smears in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive subjects. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1709-10.
10. McCarthy KD, Cain KP, Winthrop KL, *et al.* Nontuberculous Mycobacterial disease in patients with HIV in Southeast Asia. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 981-8.
11. Ridpeng A, Oberdorfer P. Clinical characteristics and treatment outcomes of mycobacterium infection among HIV-infected children. *Thai Journal of Pediatrics* 2015; 54: 223-39.