วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 27 ฉบับที่ 1 มกราคม - กุมภาพันธ์ 2561

Journal of Health Science
Vol. 27 No. 1, January - February 2018

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การตรวจเชื้อวัณโรคและการดื้อยา Rifampicin ด้วย Automated Nucleic Acid Amplification Test

วิพัฒน์ กล้ายุทธ วท.ม.*
จณิศรา ฤดีอเนกสิน วท.ม.*
ศราวุธ ตุ่นคำแดง วท.ม.**
เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ ปร.ด.*
โสภา ศรีสังข์งาม วท.บ.*
สุปราณี บุญชู วท.บ.*
สมชาย แสงกิจพร พ.บ.*

** สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*
*** กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก*

บทคัดย่อ วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ การตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจมีความจำเป็นในการช่วยวินิจฉัยโรค วิธีทางอณูชีววิทยาที่ให้ผลรวดเร็วได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐานโดยการเพาะเชื้อซึ่งใช้เวลานานกว่าจะทราบผล วิธี Xpert MTB/RIF เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ได้รับการแนะนำโดยองค์การอนามัยโลก เพื่อการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา rifampicin ได้พร้อมกันด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ สามารถใช้งานกับสิ่งส่งตรวจได้โดยตรง มีความไวและความจำเพาะสูง งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้งานวิธี Xpert MTB/RIF ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา rifampicin เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว ตัวอย่างทดสอบเป็นเสมหะส่วนที่เหลือจากการลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ซึ่งเตรียมสำหรับการเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาในงานประจำ จำนวน 140 ตัวอย่าง โดยส่วนที่เหลือจากการเพาะเชื้อลงบนอาหารจะนำมาทดสอบด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ผลการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ วิธี Xpert MTB/RIF ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 88.6 (116/131) และ 100.0 (9/9) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน liquid susceptibility testing (MGIT SIRE) วิธี Xpert MTB/RIF ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 87.5 (7/8) และ 97.2 (69/71) ตามลำดับ โดยสรุปวิธี Xpert MTB/RIF สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา rifampicin จากสิ่งส่งตรวจได้ ใช้ระยะเวลาทดสอบสั้น มีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน เหมาะแก่การใช้งานเพื่อตรวจหาผู้ป่วยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาได้ผลเร็ว

คำสำคัญ: **วัณโรค, วัณโรคดื้อยา rifampicin, การทดสอบ Xpert MTB/RIF**

บทนำ

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย จากรายงานขององค์การอนามัยโลกเมื่อปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 117,000 ราย หรือคิดเป็น 172 ต่อประชากร 100,000 ราย โดยถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 30 ประเทศที่มีผู้ป่วยวัณโรคจำนวนมาก[1] เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*; MTB) ซึ่งก่อให้เกิดโรควัณโรคถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน[2] การวินิจฉัยวัณโรคโดยทั่วไปจะตรวจจากอาการของผู้ป่วย การซักประวัติ และผลการเอกซเรย์ทรวงอก ร่วมกับผลตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่ง

ใช้การตรวจหลายวิธี เช่น การตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรด (acid-fast staining; AFB) เป็นการตรวจเบื้องต้นที่ประหยัดและให้ผลตรวจรวดเร็ว แต่ตัวอย่างต้องมีเชื้อจำนวนมาก และบอกผลได้เพียงเป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียไม่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค[3] วิธีที่เป็นมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค จะใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลานานประมาณ 3-8 สัปดาห์ จึงจะทราบผล[3] ต่อมามีการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาที่ให้ผลการทดสอบได้รวดเร็ว และมีความจำเพาะกับเชื้อวัณโรคเพื่อมาใช้ร่วมกับวิธีมาตรฐาน วิธีการตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมชนิด DNA ของเชื้อวัณโรคโดย nucleic acid amplification test (NAAT) ได้มีการพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในงานตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการโดยมีหลายรูปแบบ เช่น conventional polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีใช้อยู่ทั่วไป และ real-time PCR ที่สามารถตรวจได้ผลรวดเร็วขึ้น และสามารถตรวจสอบผลได้แบบ real-time อย่างไรก็ดี ผู้ตรวจวิเคราะห์ต้องมีทักษะความชำนาญงานสูง ทั้งในด้านการเตรียมตัวอย่าง การทำปฏิกิริยาตรวจวิเคราะห์ รวมทั้งมีทักษะในการใช้เครื่องมือ และสามารถใช้โปรแกรมการควบคุมเครื่องและวิเคราะห์ผลตรวจได้ จึงมีการพัฒนา automated NAAT เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อวัณโรค และได้รับการแนะนำโดยองค์การอนามัยโลก โดยการตรวจสารพันธุกรรมเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Xpert MTB/RIF[4,5] ซึ่งเป็นเทคโนโลยี NAAT ใหม่ สำหรับการตรวจเชื้อวัณโรคและการดื้อยา rifampicin (RIF) ไปพร้อมกันแบบอัตโนมัติ โดยเครื่องจะทำการสกัด DNA ดูดจ่ายสารละลาย ทำปฏิกิริยา real-time PCR และวิเคราะห์ผลของปฏิกิริยา โดยตรวจสอบ DNA ที่เป็นเป้าหมายจำเพาะกับเชื้อวัณโรค การทำงานของเครื่องตรวจ NAAT ระบบอัตโนมัติทำให้ตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย นอกจากนี้เครื่องมือยังมีวิธีการควบคุมการทำงานที่ไม่ซับซ้อน และการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR ทำให้ได้ผลตรวจรวดเร็ว โดยการตรวจวัณโรคด้วย Xpert MTB/RIF จะทราบผลภายในเวลาน้อยกว่า 2 ชั่วโมง นอกจากนี้เทคโนโลยีได้ออกแบบเป็นระบบปิด โดยปฏิกิริยาทุกขั้นตอนเกิดขึ้นในกล่องตลับ (cartridge) ขนาดเล็ก ตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ เช่น เสมหะ จะถูกบรรจุลงใน cartridge จากนั้นจึงใส่ cartridge ลงในช่องรับ ซึ่งมีอย่างน้อย 4 ช่องรับ ทำให้สามารถตรวจตัวอย่างได้จำนวนหลายตัวอย่างพร้อมกัน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน cartridge เป็นการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณด้วยวิธี real-time PCR เพื่อการตรวจเชื้อวัณโรคและการดื้อยา RIF ของเชื้อ ระบบอัตโนมัติและระบบปิดนี้ ช่วยลดการสัมผัสเชื้อวัณโรคโดยตรง จึงลดอันตรายและความเสี่ยงในการติดเชื้อ รวมทั้งสามารถจัดการตัวอย่างได้ง่ายขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันวิธี Xpert MTB/RIF จึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการวัณโรค เพื่อความรวดเร็วในการตรวจหาผู้ป่วยวัณโรคเบื้องต้น สำหรับการให้การรักษาที่ถูกต้อง และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้งานวิธีการตรวจสารพันธุกรรมด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ automated real-time PCR หรือเครื่อง GeneXpert ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และประเมินการใช้งานของวิธีโดยการเปรียบเทียบกับผลตรวจด้วยวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว

วิธีการศึกษา

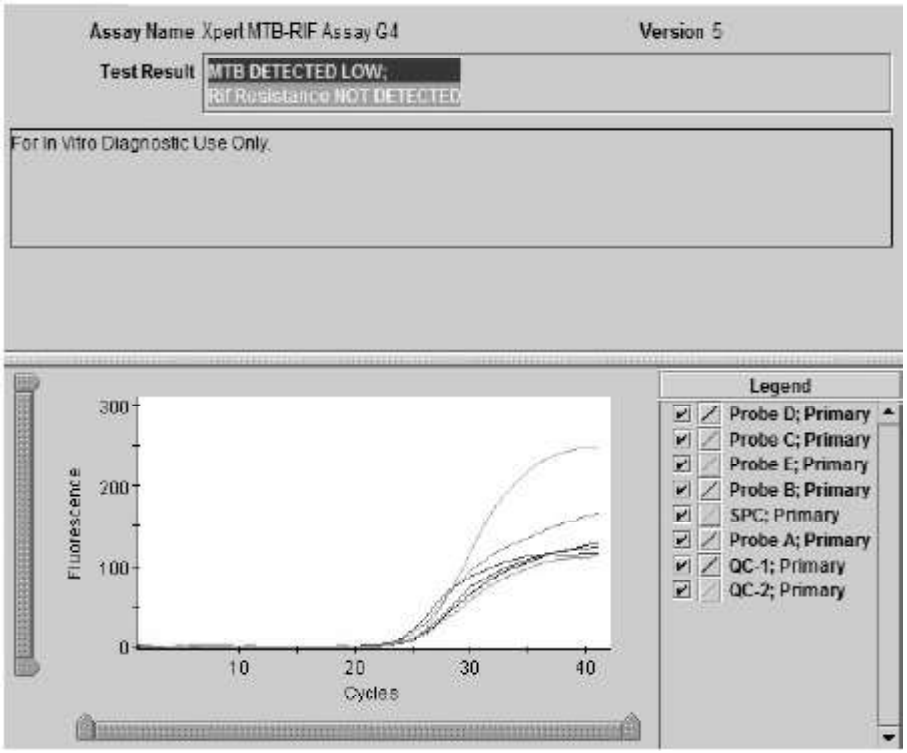
เป็นการศึกษาแบบ retrospective โดยใช้ตัวอย่างเสมหะส่วนที่เหลือจากกระบวนการลดการปนเปื้อน (decontaminate) ด้วยวิธี N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH)[6] ของการปฏิบัติในงานประจำจากห้องปฏิบัติการวัณโรค กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลแม่สอด ที่ถูกเก็บไว้จำนวน 140 ตัวอย่าง ขั้นตอนปฏิบัติในงานประจำคือ การทดสอบย้อมสีทนกรด (acid-fast staining; AFB) ด้วยวิธีการของ Kinyoun จากนั้นทำการเพาะเชื้อโดยใช้เสมหะที่ผ่านกระบวนการลดการปนเปื้อนประมาณ 200 µl หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Löwenstein-Jensen (LJ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แล้วอ่าน

ผลเป็นรายสัปดาห์ และหยด 0.5 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว MGIT (mycobacteria growth indicator tube; Becton Dickinson, USA) แล้วนำไปบ่มในเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 เป็นเวลา 6 สัปดาห์ (เครื่องจะแจ้งเตือนอัตโนมัติ เมื่อพบการเจริญของเชื้อ) หากมีเชื้อเจริญขึ้นมาให้ทำการยืนยันเป็นเชื้อวัณโรคด้วยวิธี immunochromatographic (SD BIOLINE TB Ag MPT64; Standard Diagnostics, Korea) เมื่อได้รับการยืนยันเป็นเชื้อวัณโรค จะทำการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลวด้วยชุด MGIT SIRE kit (Becton Dickinson, USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

การเตรียมตัวอย่างและการทดสอบ Xpert MTB/RIF

การทดสอบ Xpert MTB/RIF (Cepheid, USA) ปฏิบัติตามวิธีมาตรฐาน โดยใช้เสมหะส่วนที่เหลือจากการเตรียมตัวอย่างเสมหะเพื่อการเพาะเชื้อปริมาณ 500 µl ใส่ลงใน screw-cap centrifuge tube ขนาด 15 ml จากนั้นเติมน้ำยา Sample Reagent ลงไป 1.5 ml เพื่อละลายตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำลายเชื้อวัณโรคที่มีชีวิตในตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาใช้ pasture pipette ขนาด 2.5 ml ดูดตัวอย่างจากหลอดเพื่อนำมาใส่ใน Xpert MTB/RIF cartridge แล้วจึงนำเข้าเครื่อง GeneXpert เพื่อทำการทดสอบต่อไป และเมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบโปรแกรมจะทำการวิเคราะห์ผลให้โดยอัตโนมัติ แสดงผลพบหรือไม่พบเชื้อวัณโรค พร้อมปริมาณเบื้องต้นของเชื้อ และผลการทดสอบการดื้อยา RIF (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 โปรแกรม GeneXpert Dx System แสดงผลพบเชื้อวัณโรคปริมาณน้อย (low) และไม่พบการดื้อยา RIF รวมทั้งแสดงกราฟระหว่าง cycles และ fluorescence ของ probe A ถึง E ที่ใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา RIF บริเวณตำแหน่ง 81-bp rifampicin resistance-determining region (RRDR) หรือ codon 507 ถึง 533 ของยีน *rpoB* โดยแต่ละ probe จะตรวจที่ codon แตกต่างกัน (A คือ codon 507 ถึง 512, B คือ codon 511 ถึง 518, C คือ codon 518 ถึง 523, D คือ codon 522 ถึง 528 และ E คือ codon 528 ถึง 533) และของ SPC (sample processing control) ที่ใช้ควบคุมคุณภาพของการเตรียมตัวอย่าง



การคำนวณค่าความไวและความจำเพาะวิธีทดสอบ

วิเคราะห์ผลการทดสอบของวิธี Xpert MTB/RIF เทียบกับวิธีมาตรฐานเพาะเชื้อ และวิธีการทดสอบความไวต่อยา RIF โดยอาหารเหลว ด้วย 2-way contingency table analysis เพื่อคำนวณค่าความไวและความจำเพาะด้วยโปรแกรม MedCalc®(7)

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติให้ทำการศึกษาวิจัยในมนุษย์โดยคณะกรรมการจริยธรรมวิจัย โรงพยาบาลแม่สอด

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบการย้อมสีทนกรดและผลการเพาะเชื้อ

จากตัวอย่างจำนวน 140 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการย้อมสีทนกรด 99 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 41 ตัวอย่าง ใน 99 ตัวอย่างที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นบวกนั้น ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกเชื้อวัณโรคทั้ง 99 ตัวอย่าง ในขณะที่ 41 ตัวอย่างที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นลบนั้น ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกเชื้อวัณโรค 32 ตัวอย่าง และเป็นลบเชื้อวัณโรค 9 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบผลกับวิธีการเพาะเชื้อ วิธีการย้อมสีทนกรดให้ค่าความไวเป็นร้อยละ 75.6 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, 67.3-82.7) และค่าความจำเพาะเป็นร้อยละ 100.0 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, 66.4-100.0)

ผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และค่าความไวและความจำเพาะเมื่อเทียบกับ วิธีมาตรฐานเพาะเชื้อ

จากตัวอย่างจำนวน 140 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Xpert MTB/RIF 116 ตัวอย่าง และให้ผลลบ 24 ตัวอย่าง ใน 116 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Xpert MTB/RIF นั้น ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกเชื้อวัณโรคทั้ง 116 ตัวอย่าง ในขณะที่ 24 ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี Xpert MTB/RIF นั้น ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกเชื้อวัณโรค 15 ตัวอย่าง และเป็นลบเชื้อวัณโรค 9 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบผลกับวิธีการเพาะเชื้อ วิธี Xpert MTB/RIF ให้ค่าความไวเป็นร้อยละ 88.6 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, 81.8-93.5) และค่าความจำเพาะเป็นร้อยละ 100.0 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, 66.4-100.0) พบผลลบลวง (false negative) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อร้อยละ 11.5 (15/131) นอกจากนี้หากจำแนกผลการเพาะเชื้อตามกลุ่มของผลการทดสอบการย้อมสีทนกรดด้วยนั้น ในกลุ่มที่ผลการทดสอบการย้อมสีทนกรดเป็นบวก และผลการเพาะเชื้อเป็นบวก (smear +, culture +) การทดสอบ Xpert MTB/RIF จะให้ค่าความไวร้อยละ 100.0 (99/99) ส่วนในกลุ่มที่ผลการทดสอบการย้อมสีทนกรดเป็นลบ แต่ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก (smear -, culture +) การทดสอบ Xpert MTB/RIF จะให้ค่าความไวร้อยละ 53.1 (17/32) และค่าความจำเพาะร้อยละ 100.0 (9/9) ซึ่งตัวอย่างที่ให้ผลเป็น false negative เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อ เป็นตัวอย่างในกลุ่มนี้ทั้งหมด ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ผลการทดสอบการตรวจหาการดื้อยา RIF ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และค่าความไวและความจำเพาะเมื่อเทียบกับการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว

จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 79 ตัวอย่าง เมื่อเทียบกับการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว วิธี Xpert MTB/RIF ตรวจพบการดื้อยาทั้งหมด 7 จาก 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 87.5) และตรวจไม่พบการดื้อยาจำนวน 69 จาก 71 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97.2) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

วิจารณ์

การตรวจหาเชื้อวัณโรคในปัจจุบันมีการพัฒนาไปอย่างมาก การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาร่วมกับวิธีดั้งเดิม เช่น การย้อมสีทนกรด ช่วยให้การวินิจฉัยวัณโรคโดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคปอดเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้เทคโนโลยีใหม่ ๆ นั้นอาจมีข้อจำกัด เช่น ราคาของเครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบที่มีราคาสูงขึ้น ทำให้ห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 ค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF เทียบกับวิธีมาตรฐานเพาะเชื้อ

		การทดสอบย้อมสีทนกรดบวก การเพาะเชื้อวัณโรค		การทดสอบย้อมสีทนกรดลบ การเพาะเชื้อวัณโรค	
		บวก	ลบ	บวก	ลบ
Xpert MTB/RIF	พบเชื้อวัณโรค	99	0	17	0
	ไม่พบเชื้อวัณโรค	0	0	15	9

	ร้อยละความไว (95% CI*)	ร้อยละความจำเพาะ (95% CI)
รวม	88.6 (81.8-93.5)	100.0 (66.4-100.0)
การทดสอบย้อมสีทนกรดบวก และการเพาะเชื้อวัณโรคบวก	100.0 (96.3-100.0)	N/A
การทดสอบย้อมสีทนกรดลบ และการเพาะเชื้อวัณโรคบวก	53.1 (34.7-70.9)	100.0 (66.4-100.0)

*ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95% confidential interval)

ตารางที่ 2 ค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจหาการดื้อยา RIF ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF เทียบกับการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว

		การทดสอบความไวต่อยา RIF (MGIT SIRE kit)		ร้อยละความไว (95% CI)	ร้อยละความจำเพาะ (95% CI)
		ดื้อต่อยา	ไวต่อยา		
Xpert MTB/RIF	พบการดื้อยา	7	2	87.5	97.2
	ไม่พบการดื้อยา	1	69	(47.4-99.7)	(90.2-99.7)

บางแห่งไม่สามารถทำการทดสอบได้ การเลือกใช้เทคโนโลยีดังกล่าวจึงต้องมีการคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ ด้วย นอกจากเรื่องความถูกต้องของผลการทดสอบที่ถือว่าเป็นเรื่องสำคัญ วิธีทางอณูชีววิทยาที่ได้รับการแนะนำโดยองค์การอนามัยโลกเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจคือวิธี Xpert MTB/RIF[4] ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อได้จากทั้งตัวอย่างทดสอบโดยตรง และตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นสำหรับการเพาะเชื้อ เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ทำได้ง่าย สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่สามารถตรวจหาเชื้อด้วยวิธีย้อมสีทนกรดได้ ให้ผลรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง และสามารถตรวจหาได้ทั้งเชื้อวัณโรค บอกปริมาณเชื้อเบื้องต้นได้ และยังทดสอบการดื้อยา RIF ของเชื้อนั้นๆ ด้วย ข้อจำกัดของวิธีนี้ได้แก่ เครื่องมือและชุดทดสอบมีราคาค่อนข้างสูง อย่างไรก็ดีในประเทศไทยนั้น หากเป็นผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ของระบบบริการสุขภาพโดยสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช.) จะสามารถเบิกจ่ายค่าตรวจวิเคราะห์ได้[8] รวมทั้งยังมีการสนับสนุนงบประมาณของกองทุนโลกผ่านกรมควบคุมโรค ที่สนับสนุนให้มีการใช้งานเครื่องมือในประเทศไทย รวมทั้งในประเทศเพื่อนบ้านบางประเทศที่จัดอยู่ในกลุ่ม 30 ประเทศที่มีผู้ป่วยวัณโรคจำนวนมาก ได้แก่ กัมพูชา อินโดนีเซีย พม่า ฟิลิปปินส์ และเวียดนาม ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณเช่นกัน[1] ดังนั้น วิธีการนี้จึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยมีรายงานการวิจัยและการใช้งานในต่างประเทศเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ดี การศึกษาวิจัยและรายงานการใช้งานวิธีการนี้ในประเทศไทยยังมีจำกัด คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการใช้งานวิธีการตรวจสารพันธุ-

กรรม ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ automated real-time PCR หรือเครื่อง GeneXpert ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และประเมินการใช้งานของวิธี โดยการเปรียบเทียบกับผลตรวจด้วยวิธีมาตรฐานการเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลว จากผลการวิจัยที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเพาะเชื้อแล้ว วิธี Xpert MTB/RIF ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 88.6 และ 100.0 ตามลำดับสำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรค ซึ่งมีความถูกต้องใกล้เคียงกับงานวิจัยอื่น[3] นอกจากนี้หากแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นบวกและให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก (smear +, culture +) และกลุ่มที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นลบแต่ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก (smear –, culture +) แล้วนั้น วิธี Xpert MTB/RIF ให้ผลถูกต้องร้อยละ 100.0 ในการทดสอบกับกลุ่ม smear +, culture + ส่วนการทดสอบในกลุ่ม smear –, culture + วิธี Xpert MTB/RIF สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคได้ 17 จาก 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 53.1 ซึ่งค่าทดสอบที่ได้นี้มีค่าต่ำกว่ารายงานขององค์การอนามัยโลกที่รวบรวมข้อมูลจากผลการศึกษาจนถึงปี พ.ศ. 2557 รวม 23 รายงาน (จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 7,151 ตัวอย่าง) ได้ผลรวมอยู่ที่ประมาณร้อยละ 68.0 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95, 61-74) แต่หากดูในรายงานวิจัยที่แยกเป็นฉบับจะพบว่า ค่ารายงานในการใช้วิธี Xpert MTB/RIF กับตัวอย่างทดสอบกลุ่ม smear – มีค่าความไวที่ค่อนข้างแตกต่างกันเป็นช่วงที่กว้างระหว่างร้อยละ 43.0 ถึงร้อยละ 100.0[9] รวมทั้งรายงานการศึกษาอื่น ๆ ในช่วงปีถัดมาพบมีค่ารายงานค่าความไวในการตรวจวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน คือร้อยละ 48.6, 54.8, 77.7 และ 88.2 ตามลำดับ[10-13] ซึ่งปัจจัยโดยทั่วไปที่เป็นสาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากชนิดของตัวอย่างที่ใช้มีความแตกต่างกัน (เสมหะโดยตรงหรือเสมหะที่ผ่านกระบวนการลดการปนเปื้อน) หรือวิธีการย้อมสีทนกรดที่ใช้วิธีที่แตกต่างกัน เป็นต้น รวมทั้งปัจจัยที่เกิดจากการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้ตัวอย่างที่เก็บไว้ภายหลังจากการเพาะเชื้อแล้ว เพื่อการทดสอบซ้ำหรือจุดประสงค์อื่น ๆ ตามข้อกำหนดของโรงพยาบาล การใช้ตัวอย่างส่วนที่เหลือจากการตรวจเสมหะด้วยวิธีการปกติช่วงระยะเวลาที่เก็บและปริมาณตัวอย่างที่เหลืออาจส่งผลกระทบต่อการทดสอบได้ อย่างไรก็ดีเป็นรูปแบบหนึ่งของตัวอย่างตามสภาวะจริงในการใช้งาน นอกจากนี้ผล false negative ที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อนั้นสาเหตุอาจเกิดจาก limit of detection ของวิธี Xpert MTB/RIF ที่ต้องการเชื้อปริมาณสูงกว่า คือ น้อยกว่า 10 เซลล์ สำหรับวิธีเพาะเชื้อ[14] เปรียบเทียบกับ 131 colonies forming unit (CFU) ต่อมิลลิลิตร สำหรับวิธี Xpert MTB/RIF[5] อย่างไรก็ดี วิธีการนี้มีข้อดีที่สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าวิธีการย้อมสีทนกรดแบบดั้งเดิม ในส่วนของการตรวจหาการดื้อยา RIF ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF นั้น เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยาโดยอาหารเหลวผลการทดสอบ เชื้อที่ไวต่อยา RIF ให้ผลตรวจตรงคิดเป็นร้อยละ 97.2 ส่วนเชื้อที่ดื้อยา RIF สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF ได้จำนวน 7 จาก 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 87.5 อย่างไรก็ดี จำนวนตัวอย่างวิเคราะห์ในส่วนของเชื้อดื้อยานี้มีจำนวนน้อย ซึ่งเมื่อวิเคราะห์เป็นค่าร้อยละจะทำให้อัตราส่วนลดลงไปมาก ผลการทดสอบประเมินดังกล่าวจึงอาจไม่สามารถใช้อ้างอิงร้อยละ ความไวในการตรวจหาการดื้อยาได้ การเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบที่ดื้อยา RIF ให้มากขึ้นจึงมีความจำเป็น จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น วิธี Xpert MTB/RIF เป็นวิธีการที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรครวมทั้งการดื้อยา RIF จากสิ่งส่งตรวจ เหมาะสมกับการนำมาใช้เพื่อการตรวจหาผู้ป่วยวัณโรคในจุดรับบริการ (point-of-care testing) เนื่องจากวิธีการใช้งานง่าย มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว ช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องในทันที

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.
2. Imaeda T. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. Int J Syst Bacteriol 1985;35:147-50.
3. World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework. Geneva: World Health Organization; 2015.
4. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva: World Health Organization; 2011.
5. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, *et al*. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. J Clin Microbiol 2010;48:229-37.
6. Kent BD, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a Guide for the Level III Laboratory. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control; 1985.
7. MedCalc Software. Free statistical calculators [Internet]. [cited 2016 May 20]. Available from: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php
8. สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. คู่มือบริหารกองทุนหลักประกันสุขภาพแห่งชาติเล่มที่ 2 การบริหารงบบริการผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์และการบริหารงบผู้ป่วยวัณโรค. กรุงเทพมหานคร: แสงจันทร์การพิมพ์; 2559.
9. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. Geneva: World Health Organization; 2013.
10. Geleta DA, Megerssa YC, Gudeta AN, Akalu GT, Debele MT, Tulu KD. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in sputum specimens in remote health care facility. BMC Microbiol 2015;15:220.
11. Luetkemeyer AF, Firnhaber C, Kendall MA, Wu X, Mazurek GH, Benator DA, *et al*. Evaluation of Xpert MTB/RIF versus AFB smear and culture to identify pulmonary tuberculosis in patients with suspected tuberculosis from low and higher prevalence settings. Clin Infect Dis 2016;62:1081-8.
12. Sharma SK, Kohli M, Yadav RN, Chaubey J, Bhasin D, Sreenivas V, *et al*. Evaluating the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay in pulmonary tuberculosis. PLoS One 2015;10:e0141011.
13. Pinyopornpanish K, Chaiwarith R, Pantip C, Keawvichit R, Wongworapat K, Khamnoi P, *et al*. Comparison of Xpert MTB/RIF assay and the conventional sputum microscopy in detecting *Mycobacterium tuberculosis* in northern Thailand. Tuberc Res Treat 2015;2015:571782.
14. World Health Organization. Laboratory service in tuberculosis control part III: culture. Geneva: World Health Organization; 1998.

Abstract: Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Rifampicin Resistance by Automated Nucleic Acid Amplification Test

Wiphat Klayut, M.Sc.*; Sopa Srisangngam, B.Sc.*; Janisara Rudeeaneksin, M.Sc.*; Supranee Boonchu, B.Sc.*; Sarawut Toonkomdang, M.Sc.; Somchai Sangkitporn, M.D.*; Benjawan Phetsuksiri, Ph.D.***

** National Institute of Health, Department of Medical Sciences; ** Department of Medical Technology, Maesot Hospital, Tak Province, Thailand*

Journal of Health Science 2017;26:96-103.

Tuberculosis remains a major health problem. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens is an important process to diagnose of the disease. A molecular testing that provides an accurate and is a faster than standard bacteriological cultures is used to combine with the conventional methods. Xpert MTB/RIF, a molecular testing that is endorsed by World Health Organization uses an automated real-time PCR machine called "GeneXpert" to simultaneous detection of *M. tuberculosis* and its rifampicin resistance directly from clinical specimens which offers a high sensitivity and specificity. This research aimed to study performance of Xpert MTB/RIF in the direct detection of *M. tuberculosis* and its rifampicin resistance comparing to standard culture methods and rifampicin susceptibility testing by liquid media. One hundred and forty of decontaminated sputum from routine TB laboratory service were used. After culturing, a remaining sample was analyzed by Xpert MTB/RIF. It was found that the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF were 88.55% (116/131) and 100.0% (9/9), respectively compared with TB culture, and 87.5% (7/8) and 97.18% (69/71), respectively compared with liquid susceptibility testing. Therefore, we concluded that Xpert MTB/RIF was suitable to use for detection of *M. tuberculosis* and its rifampicin resistance in clinical specimens which was highly sensitive and require less detecting time fewer than 2 hours.

Key words: **tuberculosis, rifampicin-resistant tuberculosis, Xpert MTB/RIF**