

การตรวจวินิจฉัยโรคดื้อยา Isoniazid และ Rifampicin ได้ผลเร็วด้วยวิธี Real-time PCR และ Melting Curve Analysis

เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ ปร.ด.*

โสภา ศรีสังข์งาม วท.บ.*

วรศักดิ์ สุทาชัย วท.ม (เทคนิคการแพทย์)***

วิวัฒน์ กล้ายุธ วท.ม.*

กวรรณ นพพรพร วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)*

สุทัศน์ วิมลเศรษฐ์ วท.ม. (เทคนิคการแพทย์) ****

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

** สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 พิษณุโลก กรมควบคุมโรค

*** สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ กรมควบคุมโรค

**** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1 เชียงใหม่ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

***** ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จนิศรา ฤดีเนกสิน วท.ม.*

รัชณีพร คำมินทร์ ปร.ด.**

สุปราณี บุญชู วท.บ.*

ประภาพร สุภาพกุล ค.บ.*

บุญรัตน์ วงศ์ชมภู วท.ม. (เทคนิคการแพทย์)****

สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ปร.ด.*

บทคัดย่อ วัณโรคและวัณโรคดื้อยาเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB) ซึ่งเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) ดื้อต่อยาหลัก ได้แก่ยา isoniazid (INH) และ rifampicin (RIF) รักษายากและใช้เวลานานในการรักษา การตรวจวัณโรคและวัณโรคดื้อยาทางห้องปฏิบัติการที่รู้ผลเร็วมีความสำคัญ ช่วยในการเลือกใช้ยาที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการแพร่ติดต่อ และลดอัตราการเสียชีวิต ข้อจำกัดของการตรวจวัณโรคดื้อยาโดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธีเพาะเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานให้ผลตรวจช้า วัตถุประสงค์การวิจัยนี้เพื่อประเมินวิธี real-time PCR (polymerase chain reaction) สำหรับตรวจวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลักที่ได้ผลเร็ว โดยตรวจสอบพันธุกรรม DNA และการเปลี่ยนแปลง DNA ของเชื้อวัณโรคที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ทำการคัดเลือกตัวอย่างประเมินที่เป็นเชื้อวัณโรคซึ่งเพาะขึ้นบนอาหารเพาะเชื้อ และมีผลทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค (drug susceptibility testing, DST) จำนวน 148 ตัวอย่าง ตรวจการดื้อยาด้วยวิธี real-time PCR เปรียบเทียบผลกับวิธี DST ได้ผลดังนี้ (1) กลุ่มเชื้อไวต่อยา 54 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับ DST ทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) (2) กลุ่มเชื้อวัณโรคดื้อยา INH 50 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับ DST 43 ใน 50 ตัวอย่าง (ร้อยละ 86) (3) กลุ่มเชื้อดื้อยา RIF 6 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับ DST 5 ใน 6 ตัวอย่าง และ (4) กลุ่มเชื้อ MDR-TB 38 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับ DST 34 ใน 38 (ร้อยละ 89) ตัวอย่างผลที่ไม่ตรงกันเมื่อเปรียบเทียบผลของ real-time PCR กับผลของวิธี DNA Sequencing พบว่าให้ผลตรงกัน 11 ใน 12 ตัวอย่าง สรุปวิธี real-time PCR ให้ผลตรวจเร็ว สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน เหมาะสมในการตรวจวัณโรคดื้อยา ซึ่งผลตรวจใช้ประโยชน์ได้ในการรักษา

คำสำคัญ: วัณโรคดื้อยา, วิธี real-time PCR, ยา isoniazid, ยา rifampicin, วัณโรคดื้อยาหลายขนาน MDR-TB

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ เกิดจากการติดเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) จากรายงานปี 2558 ขององค์การอนามัยโลก ประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 120,000 ราย หรือคิดเป็น 172 ต่อประชากรแสนคน และอัตราการดื้อยาหลายขนานในผู้ป่วยรายใหม่ประมาณร้อยละ 2 และร้อยละ 24 ในผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษา จัดอยู่กลุ่ม 22 ประเทศทั่วโลกที่มีผู้ป่วยวัณโรคจำนวนมาก⁽¹⁾ วัณโรคดื้อยาทำให้การรักษาและการควบคุมยากขึ้น และแนวโน้มการดื้อยาในประเทศไทยเพิ่มขึ้น วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB) ซึ่งเชื้อดื้อยาหลักอย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ ยา isoniazid (INH) และ rifampicin (RIF) รักษายากและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากวัณโรคปอดติดต่อทางการหายใจ การแพร่ติดต่อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาจึงเกิดขึ้นง่าย การควบคุมวัณโรคดื้อยาให้ได้ผลต้องอาศัยการค้นหาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องรวดเร็วและให้การรักษาด้วยยาที่ได้ผล การตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยาหลัก 2 ชนิด ได้แก่ ยา INH และ RIF โดยการทดสอบความไวของเชื้อดื้อยาด้วยการเพาะเชื้อ (drug-susceptibility testing, DST) เป็นวิธีมาตรฐาน ใช้เวลานาน 2-4 เดือน ทำให้การรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาดังกล่าวด้วยยาที่ได้ผลล่าช้า มีการแพร่ติดต่อด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาและใช้เทคนิค molecular ตรวจการดื้อยาของเชื้อวัณโรคซึ่งทราบผลเร็ว และผลการตรวจใช้เป็นแนวทางในการรักษาเมื่อเริ่มต้น

การดื้อยาของเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง DNA ของเชื้อวัณโรคในยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา⁽²⁾ ปัจจุบันมีวิธีการตรวจวิเคราะห์วัณโรคดื้อยา รวดเร็วและองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้เทคนิค Molecular ได้แก่ Xpert MTB/RIF assay สำหรับตรวจ การดื้อยา RIF และเทคนิค Line probe assay (LPA) สำหรับตรวจการดื้อยา INH และ RIF โดยตรวจการเปลี่ยนแปลงของ DNA หรือ mutation ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ได้แก่ ยีน *mpoB* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา RIF, ยีน *katG*

ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH แสดงการดื้อยา INH ระดับสูง (high-level) และยีน *inhA* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH แสดงการดื้อยา INH ระดับต่ำ (low level)⁽²⁻⁴⁾ สามารถใช้ตรวจตัวอย่างเสมหะโดยตรงและให้ผลตรวจใน 1-2 วัน โดย Xpert MTB/RIF assay ตรวจการดื้อยา RIF ได้เพียงชนิดเดียว ในขณะที่วิธี LPA สามารถตรวจการดื้อยา INH และ RIF แต่การทดสอบมีหลายขั้นตอน และมีรายงานไม่สามารถตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลง DNA ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในอีกหลายตำแหน่ง⁽⁴⁾

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธี real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยา INH และ RIF ของชุดทดสอบ Anyplex™ II MTB/MDR detection (Seegene Inc, Korea) ซึ่งมีปฏิกิริยาแบบ multiplex PCR และวิเคราะห์การดื้อยาดังด้วย melting curve analysis โดยตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *mpoB* 18 ตำแหน่ง ยีน *katG* 4 ตำแหน่ง และตรวจการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *inhA* 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีรายงานเกี่ยวข้องกับการดื้อยา^(2,5) ประเมินวิธีการโดยเปรียบเทียบผลตรวจการดื้อยาทั้งสองชนิดด้วยวิธี real-time PCR กับผลการทดสอบความไวของเชื้อดื้อยาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เนื่องจากเป็นวิธีการใหม่ และมีหลักการตรวจที่สอดคล้องกับวิธีที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ จึงศึกษาเพื่อประเมินวิธีการประกอบการพิจารณาเลือกใช้

วิธีการศึกษา

คัดเลือกตัวอย่างเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้น โดยเชื้อเพาะได้จากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคในงานตรวจบริการ เก็บตัวอย่างเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 148 ตัวอย่าง เป็นเชื้อที่รู้ผลการทดสอบความไวต่อยา INH และ RIF ด้วยวิธี DST แบ่งกลุ่มได้ดังนี้ (1) กลุ่มเชื้อวัณโรคไวต่อยาทั้งสองชนิดจำนวน 54 ตัวอย่าง (2) กลุ่มเชื้อวัณโรคดื้อยา INH ชนิดเดียว 50 ตัวอย่าง (3) กลุ่มเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF ชนิดเดียว 6 ตัวอย่าง และ (4) กลุ่มเชื้อวัณโรค MDR 38 ตัวอย่าง

การตรวจการดื้อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี DST

วิเคราะห์โดยการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคในอาหารแข็งด้วย agar proportion method ตามมาตรฐาน⁽⁶⁾ และทดสอบเชื้อวัณโรคต่อยาในอาหารเหลวโดยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ MGIT 960 (Becton Dickinson Diagnostic Systems)^(7,8)

การเตรียมสารพันธุกรรม DNA เตรียมตามคู่มือของชุดทดสอบ (Anyplex DNA Extraction, Seegene Inc, Korea) มีขั้นตอนคือ นำเชื้อมาย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย Lysis buffer และเม็ด bead ในปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 20 นาที ปั่นแยกและเก็บสารละลายส่วนใสด้วยความเร็ว 10,000 rpm 5 นาที ได้ตัวอย่าง DNA พร้อมนำไปใช้สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ต่อไป

การวิเคราะห์การดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี real-time PCR ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ II MTB/MDR detection ภายในหลอดปฏิกิริยาประกอบด้วย 4x MTB/MDR TOM 5 ไมโครลิตร (probe ติดฉลากสารเรืองแสง), 4x Anyplex PCR Master Mix 5 ไมโครลิตร, น้ำ RNase-Free 5 ไมโครลิตร สารละลายสารพันธุกรรม DNA 5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร primer และ probe ใช้ของชุดทดสอบซึ่งไม่แสดงรายละเอียด probe ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง 4 ชนิด สำหรับตรวจการเปลี่ยนแปลง DNA ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH และ RIF รวม 25 ตำแหน่ง จากการวิเคราะห์ค่า melting temperature (Tm) ซึ่งมีค่าแตกต่างกัน โดยสารเรืองแสง FAM ติดฉลาก probe สำหรับตรวจหา DNA ของเชื้อวัณโรค มีค่า Tm ในช่วง 65.0 ถึง 65.5 องศาเซลเซียส สาร HEX แสดงการเปลี่ยนแปลง DNA ที่เกิดขึ้นในยีน *rpoB* มีค่า Tm ในช่วง 62.0 ถึง 70.0 องศาเซลเซียส สาร Cal Red 610 แสดงการเปลี่ยนแปลงในยีน *katG* มีค่า Tm ในช่วง 62 ถึง 64.5 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงใน *InhA* promoter มีค่า Tm ในช่วง 69.5 ถึง 72.0 องศาเซลเซียส และสาร Quasar 670 แสดงส่วนของ DNA ที่เป็นตัวอย่างควบคุม Internal control (IC)

มีค่า Tm ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาทดสอบควบคุมโดยเครื่อง real-time PCR แบบ CFX 96 รุ่น C1000 (Bio-Rad Laboratories, USA) มีขั้นตอน Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที 1 รอบ เพิ่มจำนวน DNA เป้าหมาย (DNA amplification) ด้วยขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำ 50 รอบ หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาต่อด้วยอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 1 ครั้ง และวิเคราะห์ Tm ของผลผลิต PCR โดยการลดอุณหภูมิในช่วง 55-85 องศาเซลเซียส อัตราการลดอุณหภูมิ 0.5 องศาเซลเซียส ต่อ 5 วินาที วิเคราะห์ค่า Tm เพื่อแยกการดื้อยา INH และ RIF ด้วยโปรแกรมประมวลผล Seegene viewer

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สถิติที่ใช้เป็นสถิติเชิงพรรณนา วิเคราะห์ค่าความสอดคล้อง (positive agreement) ของวิธี real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธี DST

การตรวจลำดับเบส DNA (DNA sequence) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing ผลที่ได้ของลำดับเบส DNA ของยีน *rpoB*, ยีน *katG* และยีน *inhA* ในตัวอย่างเชื้อทดสอบ นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA ของเชื้อวัณโรคซึ่งไวต่อยา (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) ด้วยโปรแกรม Bio-Edit software

ผลการศึกษา

ผลของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา

วิธี real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยา Anyplex™ II MTB/MDR detection สามารถจำแนกเชื้อวัณโรคและเชื้อวัณโรคดื้อยา INH และ RIF โดยมีการควบคุมการทดสอบ ได้แก่ การควบคุมผลบวก เป็นหลอดปฏิกิริยาที่ภายในหลอดทดสอบมีตัวอย่างเชื้อวัณโรค การควบคุมผลลบ เป็นหลอดปฏิกิริยาที่ภายในหลอดทดสอบไม่มี

ตัวอย่างเชื้อวัณโรค ซึ่งต้องทดสอบทุกครั้งในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ชุดน้ำยามีตัวอย่างควบคุมภายใน (internal control, IC) ในหลอดทดสอบทุกหลอด ซึ่งจะปรากฏผลเป็นกราฟ IC ในทุกการทดสอบ สำหรับผลการตรวจการดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี real-time PCR แสดงในภาพที่ 1 มีดังนี้

ปฏิกิริยาควบคุมบวก (positive external control) ผลการทดสอบนี้พบเส้นกราฟ MTB ซึ่งมีค่า T_m ที่อุณหภูมิ 65.50 องศาเซลเซียส แสดงว่าในตัวอย่างทดสอบมีเชื้อวัณโรค การดื้อยา RIF มีค่า T_m ของเส้นกราฟ RIF-R ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส การดื้อยา INH มีค่า T_m 2 ค่า คือ T_m ของเส้นกราฟ INH-R1 (ตำแหน่ง *katG* gene) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส หรือ T_m ของเส้นกราฟ INH-R2 (ตำแหน่ง *inhA* promoter gene) ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส โดยมีปฏิกิริยาควบคุมภายในหลอดทดสอบที่แสดงด้วยเส้นกราฟ IC มีค่า T_m ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 1A) สำหรับค่า T_m ของเส้นกราฟ RIF-R และเส้นกราฟ IC ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส แยกกันด้วยเส้นกราฟที่ต่างสีกันในปฏิกิริยาควบคุมลบ (negative external control) ผลการทดสอบจะแสดงเฉพาะเส้นกราฟ IC เท่านั้น (ภาพที่ 1B)

ปฏิกิริยาทดสอบเชื้อวัณโรคไวต่อยา INH และ RIF ผลการทดสอบนี้พบเส้นกราฟ MTB และเส้นกราฟ IC (ภาพที่ 1C) แต่ไม่พบผลการดื้อยา RIF ของเส้นกราฟ RIF-R ไม่พบการดื้อยา INH ในยีน *katG* ของเส้นกราฟ INH-R1 และไม่พบการดื้อยา INH ของเส้นกราฟ INH-R2

ปฏิกิริยาทดสอบเชื้อวัณโรคดื้อยา INH แสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ INH-R1 หมายถึงเชื้อดื้อยา INH เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในยีน *katG* (ภาพที่ 1D) หรือเชื้อดื้อยา INH เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงใน promoter ของยีน *inhA* ซึ่งแสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ INH-R2 และเชื้อทุกตัวอย่างแสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ MTB ในการศึกษานี้ ผลการทดสอบ พบการดื้อยา INH 43 ใน 50 ตัวอย่าง

และพบตัวอย่างที่แสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ MTB, INH-R1, RIF-R จำนวน 1 ตัวอย่าง และแสดงผลบวกด้วยกราฟ MTB, INH-R2, RIF-R อีก 1 ตัวอย่าง

ปฏิกิริยาทดสอบเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF และ MDR เชื้อวัณโรคกลุ่มดื้อยา RIF มีจำนวน 6 ตัวอย่าง วิธี real-time PCR แสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ MTB และ RIF-R 5 ตัวอย่าง จึงให้ผลสอดคล้องตรงกับผลของวิธี DST 5 ใน 6 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1E) สำหรับเชื้อกลุ่ม MDR จำนวน 38 ตัวอย่าง วิธี real-time PCR แสดงผลบวกด้วยเส้นกราฟ MTB RIF-R และ INH-R จำนวน 34 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1F) สอดคล้องกับวิธี DST คิดเป็นร้อยละ 89 มี 4 ตัวอย่าง พบเฉพาะ RIF-R ผลการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR ครั้งนี้ ในตัวอย่าง MDR ไม่พบตัวอย่างที่ให้ผลวิเคราะห์ไวต่อยา INH และ RIF

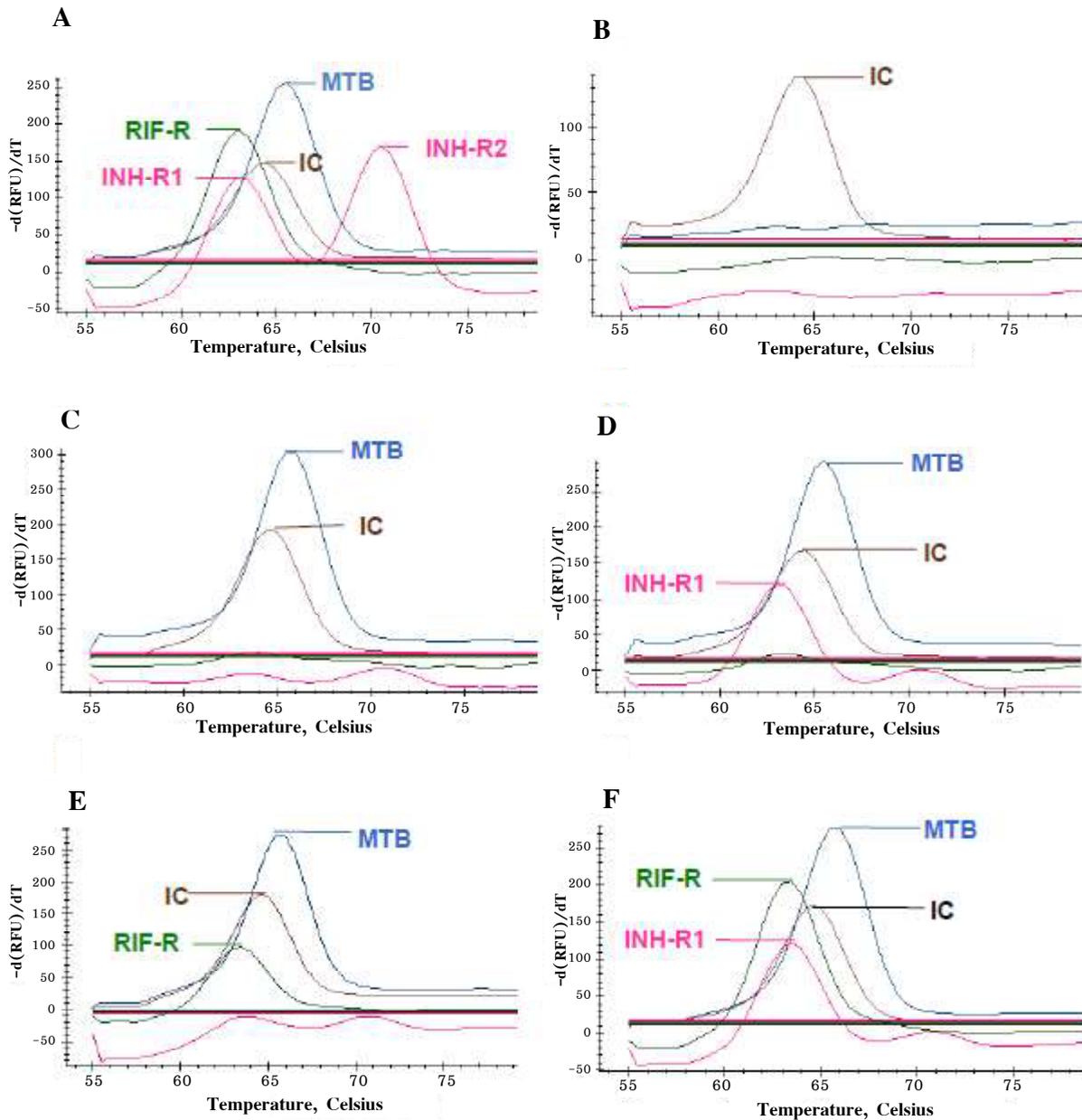
ผลการประเมินชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR detection

เปรียบเทียบผลตรวจการดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี real-time PCR กับวิธี DST ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ในกลุ่มเชื้อวัณโรคดื้อและไวต่อยาดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 1)

เชื้อวัณโรคไวต่อยา INH และ RIF จำนวนตัวอย่างทดสอบ 54 ตัวอย่าง จากการเปรียบเทียบผลการดื้อยาด้วยวิธี real-time PCR กับวิธี DST พบว่า real-time PCR ให้ผลตรวจพบเชื้อวัณโรคไวต่อยาสอดคล้องตรงกันทุกตัวอย่าง คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 100

เชื้อวัณโรคดื้อยา INH เปรียบเทียบผลตรวจด้วยวิธี real-time PCR กับวิธี DST ให้ผลตรวจเป็นเชื้อดื้อยา INH ตรงกัน 43 ใน 50 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 86 ไม่ตรงกันรวม 7 ตัวอย่าง ซึ่ง 5 ใน 7 ตัวอย่าง real-time PCR ให้ผลตรวจเป็นเชื้อไวต่อยา INH และ RIF (ตารางที่ 1) และมีตัวอย่าง 2 ใน 7 ตัวอย่างที่ real-time PCR ให้ผลตรวจเป็นเชื้อดื้อต่อยา INH และ RIF เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR สามารถจำแนกการเปลี่ยนแปลงของ DNA ที่เกิดขึ้นได้ พบตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *katG* 33 ตัวอย่าง และในยีน *inhA* 12 ตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างที่ให้ผล

ภาพที่ 1 การแสดงผลวิเคราะห์การดื้อยา INH และ RIF ของวิธี Real-time PCR โดยกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ melting และปริมาณการเรืองแสงชนิดต่าง ๆ



หมายเหตุ: แนวแกนนอนคืออุณหภูมิมีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) แนวแกนตั้งคือปริมาณการเรืองแสงมีหน่วยเป็น $-\text{d}(\text{RFU})/\text{dT}$ เส้นกราฟสีฟ้ามีอุณหภูมิจุดยอดกราฟ $65.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (MTB) แสดงผลตรวจเชื้อวัณโรค เส้นกราฟสีน้ำตาลมีอุณหภูมิจุดยอดกราฟ $65 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (IC) แสดงผลการควบคุมภายในปฏิกิริยา Real-time PCR เส้นกราฟสีเขียวมีอุณหภูมิจุดยอดกราฟ $64 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (RIF-R) แสดงผลการดื้อยา RIF และเส้นกราฟสีชมพูอุณหภูมิมีจุดยอดกราฟ $63 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (INH-R1) และ $71 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (INH-R2) แสดงการดื้อยา INH ผลวิเคราะห์มีหลายแบบดังนี้ ภาพ A คือผลของ Positive control ภาพ B คือผลของ Negative control ภาพ C คือผลตรวจไม่พบการดื้อยาของเชื้อวัณโรค ภาพ D คือผลตรวจพบการดื้อยา INH ภาพ E คือผลตรวจพบการดื้อยา RIF และภาพ F คือผลตรวจพบการดื้อยา RIF และ INH

ไม่ตรงกันด้วยวิธี DNA sequencing ใน 5 ตัวอย่างแรก ผลตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ DNA ส่วนอีกหนึ่ง (ตารางที่ 2 ลำดับที่ 1-5) พบมีจำนวน 4 ตัวอย่างให้ ตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส DNA ในยีน *katG*

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธี Real-time PCR เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อ ยาต้านวัณโรคโดยวิธี DST

กลุ่มเชื้อวัณโรค	จำนวนตัวอย่าง	ผลตรวจด้วยวิธี Real-time PCR				ร้อยละ ความสอดคล้อง
		จำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มเชื้อวัณโรค				
		Susceptible to INH, RIF	Mono INH-R	Mono RIF-R	MDR	
Susceptible to INH & RIF	54	54	0	0	0	100
Mono INH-R	50	5	43	0	2	86
Mono RIF-R	6	1	0	5	0	83
MDR (INH-R & RIF-R)	38	0	0	4	34	89

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจการดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี DST, Real-time PCR และวิธี DNA sequencing

ตัวอย่าง	วิธีการทดสอบการดื้อยา						
	DST (Culture) ¹		Real-time PCR ²		DNA Sequencing ³		
	INH	RIF	INH-R	RIF-R	INH		RIF
					ยีน <i>inhA</i>	ยีน <i>katG</i>	ยีน <i>rpoB</i>
1	R	S	Negative	Negative	WT	WT	WT
2	R	S	Negative	Negative	WT	WT	WT
3	R	S	Negative	Negative	WT	WT	WT
4	R	S	Negative	Negative	WT	WT	WT
5	R	S	Negative	Negative	WT	M (A1010G)	WT
6	R	S	Positive (INH-R1)	Positive	M (C-15T)	WT	M (Leu533Pro)
7	R	S	Positive (INH-R2)	Positive	WT	M (Ser315Thr)	M (Asp516Val)
8	S	R	Negative	Positive	WT	WT	WT
9	R	R	Positive	Positive	WT	WT	M (Ser531Leu)
10	R	R	Positive	Positive	WT	WT	M (Ser531Leu)
11	R	R	Positive	Positive	WT	WT	M (Ser531Leu)
12	R	R	Positive	Positive	WT	WT	M (Asp516Val)

หมายเหตุ: คำย่อ DST ย่อจาก Drug susceptible testing, INH ย่อจาก Isoniazid, RIF ย่อจาก Rifampicin, INH-R ย่อจาก Isoniazid-resistance, RIF-R ย่อจาก Rifampicin-resistance, R ย่อจาก resistance หมายถึงดื้อยา, S ย่อจาก Susceptible, WT ย่อจาก Wild type, M ย่อจาก Mutation

1) แสดงผลการดื้อยาด้วย S เมื่อเชื้อไวต่อยา, R เมื่อเชื่อดื้อยา

2) แสดงผลการดื้อยาด้วย Negative เมื่อไม่พบเส้นกราฟที่แสดงการดื้อยา และ Positive เมื่อพบเส้นกราฟที่แสดงการดื้อยา

3) แสดงผลการดื้อยาด้วย WT เมื่อไม่พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสารพันธุกรรม DNA และแสดง M

(ตำแหน่งและชนิดกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป) เมื่อพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนสารพันธุกรรม DNA

ในตำแหน่งใหม่ ซึ่งไม่มีอยู่รายการ probe ของ real-time PCR นอกจากนี้วิธี real-time PCR รายงานผลตรวจพบการดื้อยา RIF ใน 2 ตัวอย่างของเชื้อในกลุ่มดื้อยา INH นี้ เมื่อตรวจด้วยวิธี DNA sequencing พบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีน *rpoB* ที่ตำแหน่ง 533 (leu533Pro) และอีกหนึ่งตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลง DNA ในยีน *rpoB* ที่ตำแหน่ง 516 (Asp516Val) (ตารางที่ 2 ลำดับที่ 6-7)

เชื้อวัณโรคดื้อยา RIF ผลการตรวจวัณโรคดื้อยา RIF ด้วย real-time PCR ให้ผลตรงกับวิธี DST 5 ใน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ผลไม่สอดคล้องกัน 1 ตัวอย่างเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing (ตารางที่ 2 ลำดับที่ 8) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *rpoB* สอดคล้องกับผลของ real-time PCR ซึ่งรายงานผลเชื้อไม่ดื้อยา RIF

เชื้อวัณโรคดื้อหลายขนาน (MDR) ผลการตรวจวัณโรคดื้อยา MDR ด้วยวิธี real-time PCR ให้ผลตรงตรงกับวิธี DST จำนวน 34 ใน 38 คิดเป็นอัตราส่วนร้อยละ 89 จำนวน 4 ตัวอย่างที่ให้ผล real-time PCR ได้ผลดื้อยา RIF อย่างเดียว เมื่อตรวจตัวอย่างที่ทั้งสองวิธีให้ผลไม่ตรงกันนี้ด้วย DNA sequencing (ตารางที่ 2 ลำดับที่ 9-12) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *rpoB* แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *katG* และยีน *inhA* วิธี real-time PCR จึงให้ผลสอดคล้องกับ DNA sequencing ทั้ง 4 ตัวอย่าง ซึ่งรายงานผลเป็นเชื้อดื้อยา RIF อย่างเดียว

วิจารณ์

การตรวจวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี real-time PCR ด้วยชุดตรวจ Anyplex™ II MTB/MDR detection เป็นเทคโนโลยีใหม่ ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียว โดยการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *katG* และ *inhA* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH และยีน *rpoB* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา RIF โดยใช้ probe 5 ชนิด ตัดผลด้วยสารเรืองแสงต่างกัน และวิเคราะห์ melting temperature ของผลผลิต

PCR แสดงผลวิเคราะห์แบบ real-time ด้วยกราฟ MTB, RIF-R, INH-R1 และ INH-R2 โดยมี internal control เป็นตัวอย่างควบคุมภายในหลอดทดสอบ รู้ผลเร็วภายใน 1-2 วัน การศึกษานี้ประเมินวิธีการโดยเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์การดื้อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR กับผลการทดสอบความไวของเชื้อดื้อยา (DST) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในงานประจำ

ผลการประเมิน วิธีการ real-time PCR ให้ผลสอดคล้องสูงกับวิธี DST โดยในตัวอย่างเชื้อวัณโรคซึ่งไวต่อยา INH และ RIF ให้ผลตรงกับวิธี DST ทุกตัวอย่าง สำหรับกลุ่มเชื้อดื้อยา ตัวอย่างที่ผลตรวจสองวิธีไม่ตรงกันนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing ซึ่งเป็น gold standard ของเทคนิค molecular วิธี real-time PCR ให้ผลตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของ DNA สอดคล้องกับวิธี DNA Sequencing จำนวน 11 ใน 12 ตัวอย่าง ซึ่งผลตรวจ real time PCR และ DNA sequencing ที่ไม่ตรงกับวิธี DST ในกลุ่มเชื้อดื้อยา INH อาจเนื่องจากเชื้อมีกลไกการดื้อยาอื่นหรือมีการเปลี่ยนแปลงในยีนอื่น เช่น ยีน *ndh*, *ahpC* หรือยีน *furA*^(2, 9-10) อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาในกลุ่มเชื้อดื้อยา INH อย่างเดียว พบการเปลี่ยนแปลง DNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา INH ในยีน *katG* มีสัดส่วนสูงร้อยละ 74 (33 ใน 45) และพบการเปลี่ยนแปลงในยีน *inhA* ร้อยละ 26 (12 ใน 45) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cohen และ Becerra ปี 2004 และ Cohen และคณะปี 2014⁽¹¹⁻¹²⁾ ซึ่งรายงานการดื้อยา INH เนื่องจากเปลี่ยนแปลง DNA ของยีน *katG* ร้อยละ 31-97 การศึกษานี้ยังแสดงว่าเชื้อดื้อยา INH มักพบการเปลี่ยนแปลง DNA ในยีน *katG* และ *inhA* สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาหลายฉบับ⁽¹¹⁻¹³⁾ อย่างไรก็ตาม พบการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในยีน *katG* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่อยู่นอกเหนือจาก probe ของวิธี real-time PCR และพบการเปลี่ยนแปลง DNA ในบางตำแหน่งที่ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Ramirez และคณะ 2010⁽¹¹⁾ ในส่วนของผลตรวจที่ไม่ตรงกันที่ไม่ทราบสาเหตุ ควรทดสอบการดื้อยาตามมาตร-

ฐานเพาะเลี้ยงซ้ำ

จากผลการทดสอบเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF ผลที่ไม่ตรงกับวิธี DST อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อวัณโรคมีการดื้อยาโดยกลไกอื่นนอกจากการเปลี่ยนแปลงของ DNA ในบริเวณ 81 เบสของ rifampicin resistance determining region (RRDR) ในยีน *rpoB*⁽¹⁴⁾ โดยจากรายงานการศึกษาวิจัยต่างๆ พบว่าการดื้อยา RIF ส่วนใหญ่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม DNA ในยีน *rpoB* บริเวณ RRDR ซึ่งเกี่ยวข้องกับเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF มีประมาณร้อยละ 95 และมีรายงานทางระบาดวิทยาแสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม DNA ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 516, 526 และ 531^(2,9,16-18) สอดคล้องกับวิธี real-time PCR ที่มี probe สามารถตรวจหาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในลำดับเบส 81 bp ของ RRDR ในยีน *rpoB* อย่างไรก็ตามวิธี real-time PCR ไม่สามารถระบุตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของ DNA ได้

การศึกษาประเมินวิธี real-time PCR ในกลุ่ม MDR-TB ตัวอย่างที่วิธี real-time PCR ให้ผลตรวจพบเฉพาะ RIF-R ไม่พบการดื้อยา INH อาจเนื่องจากการดื้อยาอาจเกิดขึ้นโดยการเปลี่ยนแปลง DNA ในตำแหน่งอื่นที่ตรวจสอบไม่ได้ด้วยวิธี real-time PCR หรือเกิดขึ้นเนื่องจากกลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ DNA

ผลประเมินวิธีการ real-time PCR นี้ ให้ผลตรวจส่วนใหญ่สอดคล้องกับผลของ DST ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานซึ่งตรวจการดื้อยาจากการเจริญของเชือบนอาหารที่มียาต้านวัณโรค ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 2-4 เดือน จึงไม่ได้ผลตรวจเมื่อเริ่มต้นการรักษา ส่วนข้อดีของ Molecular จะให้ผลตรวจรวดเร็วภายใน 1 วัน แต่ไม่ครอบคลุมการตรวจกลไกการดื้อยาทั้งหมด ฉะนั้น การตรวจวิเคราะห์วัณโรคดื้อยาในงานประจำนอกจากตรวจด้วยเทคนิคทาง molecular ที่รู้ผลเร็วแบบตรวจคัดกรองแล้ว ควรที่จะตรวจการดื้อยาด้วยวิธี DST ควบคู่ และการติดตามผลรักษาอย่างต่อเนื่อง

การตรวจการดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี real-time

PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปนี้ นอกจากประสิทธิภาพแล้วมีข้อดีอื่น เช่น ชุดน้ำยามีการควบคุมคุณภาพในการผลิต เป็นไปตามมาตรฐานของน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย มีตัวอย่างควบคุมในและนอกหลอดทดสอบ มีโปรแกรมประมวลผล บันทึกและจัดทำรายงานผล ซึ่งสะดวกและง่ายสำหรับผู้วิเคราะห์ ชุดน้ำยานี้ให้ผลตรวจการดื้อยา INH และ RIF ได้พร้อมกันภายในหลอดปฏิกิริยาเดียว เมื่อเปรียบเทียบการใช้ชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นเอง ชุดน้ำยาที่เตรียมขึ้นเองอาจมีราคาสูงกว่า อย่างไรก็ตามจะใช้ในวงจำกัด ขณะที่ชุดน้ำยาสำเร็จรูปใช้กันอย่างแพร่หลาย มีการยอมรับการใช้ในวงกว้าง ผลการประเมินและคุณสมบัติที่ดีนี้ ใช้เป็นข้อพิจารณาประกอบการเลือกใช่วิธีการใหม่ต่อไป

สรุป

วิธี real-time PCR ให้ผลตรวจวัณโรคดื้อยา INH และ RIF ด้วยปฏิกิริยา Multiplex PCR และวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Melting curve analysis ตรวจหาการเปลี่ยนแปลง DNA ในยีนได้หลายตำแหน่งภายในปฏิกิริยาเดียวกัน รู้ผลการทดสอบได้ภายใน 1-2 วัน แผลผลการทดสอบง่าย และผลมีความสอดคล้องสูงกับผลตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคดื้อยา INH และ RIF ขนานด้วย DST ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เป็นวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ตรวจคัดกรองวัณโรคดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ สำนักงานควบคุมและป้องกันโรคที่ 2 พิษณุโลก และสำนักงานควบคุมและป้องกันโรคที่ 1 เชียงใหม่ กรมควบคุมโรค

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization; 2016.
2. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuber-*

- culosis*: 1998 update. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;79:3-29.
3. Brnard M, albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in high-volume public health laboratory in South Africa. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:787-92.
 4. Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC, Ray SM, Wang YF, Metchock B, et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. *Am J Med Sci* 2013;345:143-8.
 5. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:1320-30.
 6. Curry International Tuberculosis Center and California Department of Public Health. Drug-resistant tuberculosis: a survival guide for clinicians. 2nd Ed. California: Curry International Tuberculosis Center; 2011.
 7. Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. *J Clin Microbiol* 1999;37:150-4.
 8. Bemer P, Palicova F, Rusch-Gerdes S, Drugeon HB, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:150-4.
 9. Baker LV, Brown TJ, Maxwell O, Gibson AL, Fang Z, Yates MD, et al. Molecular analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from England and Wales reveals the phylogenetic significance of the *abpC*-46A polymorphism. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1455-64.
 10. Boonaiam S, Chaiprasert A, Prammananan T, Leechawengwongs M. Genotypic analysis of gene associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:396-9.
 11. 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;48:4003-9.
 12. Cohen T, Becerra MC, Murray MB. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. *Microb Drug Resist* 2004;10:280-5.
 13. Cohen KA, Bishai WR, and PYM AS. Molecular basis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2014 [cited 2014 Jun 10];2:MGM2-0036-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26103975>
 14. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358:591-3.
 15. Heym B, Alzari PM, Honor'e N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1995;15:235-45.
 16. Marrakchi H, Laneelle G, Quemard A. *InhA*, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* 2000;146(Pt 2):289-96.
 17. Zheng R, Zhu C, Guo Q, Qin L, Wang J, Lunmei L, et al. Pyrosequencing for rapid detection of tuberculosis resistance in clinical isolates and sputum samples from retreatment pulmonary tuberculosis patients. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014 [cited 2014 Apr 13];14:200. Available from: <http://WWW.biomedcentral.com/1471-2334/14/200>
 18. Albert H, Bwanga F, Mukkada S, Nyesigo B, Ademun JP, Lukyamuzi G, et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda. *BMC Infect Dis* 2010;10:41.

Abstract: Rapid Detection of Tuberculosis Resistant to Isoniazid and Rifampicin by Real-Time PCR and Melting Curve Analysis

Benjawan Phetsuksiri, Ph.D.*; Janisara Rudeeaneksin, M.Sc.*; Sopa Srisunggam, B.Sc.*; Ratchaneeporn Khummin, Ph.D.; Vorasak Sutachai, M.Sc.***; Supraanee Bunchoo, B.Sc.*; Wiphat Klayut, M.Sc.*; Prapaporn Supapakul, B.Ed.*; Gorrawan Noppornphan, B.Sc.*; Boonrat Wongchompoo, M.Sc.****; Sutudsanee Vimolsarte, M.Sc.*****; Somchai Sangkitporn, M.D., Ph.D.***

National Institute of Health, Department of Medical Sciences; ** The Office of Disease Prevention and Control 2 Phitsanulok, Department of Disease Control; * The Office of Disease Prevention and Control 1 Chiang Mai, Department of Disease Control; **** Regional Medical Sciences Center 1 Chiang Mai, Department of Medical Sciences; ***** Regional Medical Sciences Center 7 Khon Kaen, Department of Medical Sciences*

Journal of Health Science 2017;26:634-43.

Tuberculosis (TB) is a chronic disease and drug resistant tuberculosis is considered a serious public health treat. The treatment of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) in which *M. tuberculosis* poses resistance to at least isoniazid and rifampicin, major anti-tuberculosis drugs is difficult and time consuming. Drug-susceptibility testing (DST) for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is important for the effective treatment of tuberculosis (TB). This study assessed the real-time PCR method for rapid detection of drug-resistant tuberculosis (DR-TB). The assay was able to detect MTB resistant to isoniazid (INH) and rifampicin (RMP) simultaneously based on the analysis of DNA mutations. A total of 148 MTB clinical isolates having the results of DST, a standard method based on culture, were selected and subjected to real-time PCR analysis. A comparison of real-time PCR results and DST data showed a concordance, 54 of 54 (100%) in susceptible strains, 43 of 50 (86%) for INH resistance, 5 of 6 for RMP resistance and 34 of 38 isolates (89%) for multidrug-resistant TB (MDR-TB). Comparison of detection results by real-time PCR and DST, 12 samples showed discrepancy results. Further analysis revealed concordance with sequencing analysis in 11 of 12 samples. In conclusion, the method is rapid and suits for routine use in rapid detection of drug resistant TB. The detection result provides useful information in the initiation of TB treatment.

Key words: drug resistant TB, real-time PCR, isoniazid, rifampicin