

ประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและความไวต่อยาด้วยวิธี Line Probe Assay
และวิธีมาตรฐานในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา

The Efficacy of Tuberculosis Diagnosis and Drug Sensitivity Using Line Probe Assay and
Standard methods in the Area under the Responsibility of the Office of Disease
Prevention and Control 9, Nakhon Ratchasima

เสวียน คำหอม*, สาวิตรี นุแรมรัมย์

Swian Kamhorn*, Sawitree Nuramrum

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา

The Office of Disease Prevention and control 9 Nakhon Ratchasima province

*Corresponding author: Labdpc5@gmail.com

(Received: May 23, 2023 / Revised: Jun 30, 2023 / Accepted: Jul 13, 2023)

บทคัดย่อ

เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย โดยเฉพาะ Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน (RIF) และยาไอโซไนอะซิด (INH) โดยทั่วไปการตรวจ MDR-TB อาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยอาหารชนิดแข็งและอาหารชนิดเหลว ซึ่งการรายงานผลตรวจต้องใช้ระยะเวลาานาน สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ได้นำวิธี Line Probe Assay (LPA) สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและการดื้อยา เพื่อเพิ่มความรวดเร็วในการรายงานผล การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังเชิงพรรณนา ดำเนินการรวบรวมข้อมูลจากแบบบันทึกผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2563 จำนวน 335 ตัวอย่าง วัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype MTBDRplus VER 2.0 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลหาค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าความถูกต้อง ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ผลการศึกษา พบว่า การทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน พบเชื้อ MDR-TB จำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.5) เชื้อที่ดื้อต่อยา INH ชนิดเดียว จำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.5) และไวต่อยาทั้ง 2 ชนิด จำนวน 285 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85) ส่วนวิธี LPA สามารถวินิจฉัย เชื้อ MDR-TB จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6) เชื้อที่ดื้อต่อยา INH ชนิดเดียว จำนวน 27 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8)) เชื้อดื้อต่อยา RIF ชนิดเดียว จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1) และไวต่อยาทั้ง 2 ชนิด จำนวน 285 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85)

พบว่า การตรวจหาการดื้อยา INH, RIF และชนิด MDR-TB ด้วยวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype MTBDRplus VER 2.0 มีความไวร้อยละ 90, 91.7 และ 84 มีความจำเพาะร้อยละ 98.9, 99.3 และ 100 มีค่าความถูกต้องร้อยละ 97.6, 98.8 และ 98.8 มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 93.8, 91.7 และ 100 มีค่าทำนายผลลบร้อยละ 98.3, 99.3 และ 98.7 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน โดยสรุป LPA ซึ่งเป็นวิธีตรวจทางอณูชีววิทยา เป็นวิธีที่มีความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องสูง สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและการดื้อยาในตัวอย่างเสมหะส่งตรวจจากผู้ป่วยได้ ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานและการรายงานผลตรวจของห้องปฏิบัติการ ทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยและรักษาจากแพทย์ที่รวดเร็ว มีประสิทธิภาพมากขึ้น ช่วยป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยไปสู่ชุมชน

คำสำคัญ: วัณโรค, ไลนโพรบแอสเสย์, การทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน

Abstract

Mycobacterium tuberculosis (MTB) poses a significant global health challenge in Thailand, particularly Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), resistant to rifampicin and isoniazid drugs. The diagnosis of MDR-TB traditionally relies on conventional culture and drug susceptibility testing (DST) using solid and liquid mediums, which can result in a prolonged turnaround time for result interpretation. To address this issue, the Office of Disease Prevention and Control 9, Nakhon Ratchasima, introduced Line Probe Assay (LPA) for molecular diagnosis of MDR-TB, aiming to expedite the diagnostic process. A retrospective descriptive study was conducted, analyzing secondary data collected routinely from the laboratory for individual patients diagnosed with TB between October 1, 2019, and September 30, 2020. A total of 335 specimens were included in the analysis. The study aimed to compare the efficacy of LPA (Genotype MTBDRplus VER 2.0) and DST in detecting INH and RIF-resistant tuberculosis. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of LPA were analyzed using standard DST as a golden reference. Results from the standard DST revealed that 25 isolates (7.5%) were MDR-TB, while 25 (7.5%) were INH-resistant, and 285 (85%) were susceptible to both INH and RIF. The efficiency of LPA by Genotype MTBDRplus VER 2.0 for detecting INH-resistant, RIF-resistant, and MDR-TB showed 90%, 91.7%, and 84% sensitivity, with specificity rates of 98.9%, 99.3%, and 100%, respectively. The overall accuracy was 97.6%, 98.8%, and 98.8%, with PPV and NPV values indicating high diagnostic reliability. In conclusion, LPA demonstrated high sensitivity, specificity, and accuracy in detecting drug-resistant tuberculosis. This molecular method holds promise for facilitating early and appropriate treatment for tuberculosis patients and preventing the community spread of MDR-TB.

Keywords: Tuberculosis, Line Probe Assay, Standard drug susceptibility testing

บทนำ

วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามชีวิตมนุษยชาติมาเป็นเวลานาน ในปี พ.ศ.2564 องค์การอนามัยโลกคาดประมาณว่า อุบัติการณ์ของผู้ป่วยวัณโรคของโลกสูงถึง 10.6 ล้านคน เป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multi-drug resistant tuberculosis; MDR-TB) ประมาณ 450,000 คน และมีผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตประมาณ 1.6 ล้านคน วัณโรคอยู่ใน 10 อันดับแรกของสาเหตุการเสียชีวิตทั่วโลก สำหรับสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้คาดประมาณว่า ในปี 2564 ประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรค ประมาณ 103,000 ราย คิดเป็น 143 ต่อประชากรแสนคน มีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา (MDR/RR-TB) ประมาณ 2,400 ราย อัตราการดื้อยาในกลุ่มผู้ป่วยรายใหม่ (New cases) ร้อยละ 1.7 และอัตราการดื้อยาในกลุ่มผู้ป่วยที่เคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน (Previously treated cases) ร้อยละ 9.8⁽¹⁾ การวินิจฉัย MDR-TB ทางห้องปฏิบัติการใช้วิธีการย้อมสีทึบกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธีมาตรฐานและวิธีทางอณูชีววิทยา

การตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรคในปัจจุบันมีหลายวิธี วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 แบบ คือ การเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็ง (solid media) เป็นวิธีดั้งเดิม ใช้เวลาเพาะเลี้ยงจนทราบผลการดื้อยาประมาณ 9-12 สัปดาห์ และการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว (liquid media) เช่น วิธีใช้เครื่อง BACTEC-MGIT 960 ใช้เวลาเพาะเลี้ยงจนทราบผลการดื้อยาประมาณ 3-5 สัปดาห์^(2,3) จะเห็นได้ว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างนาน ซึ่งในระหว่างรอผลการตรวจวิเคราะห์ผู้ป่วยอาจได้รับสูตรยาที่ไม่เหมาะสม และก่อให้เกิดปัญหาเชื้อดื้อยา

นอกจากนี้การใช้สูตรยารักษาแนวทางที่ 1 (first line drugs) กับผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยา MDR-TB อยู่แล้ว จะทำให้ผลการรักษาล้มเหลว และมีโอกาสแพร่กระจายเชื้อวัณโรคดื้อยาสู่ผู้อื่นได้ ดังนั้น การนำเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา (molecular method) มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์จึงเป็นทางเลือกที่สำคัญ ซึ่งจะช่วยให้สามารถรายงานผลการตรวจวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว องค์การอนามัยโลกได้รับรองวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรคด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยได้รับรองวิธี line probe assay (LPA) ในปีพ.ศ. 2551⁽⁴⁾

วิธี Line Probe Assay; LPA อาศัยหลักการ polymerase chain reaction (PCR) และ reverse hybridization โดยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคและตำแหน่งยีนที่สนใจ โดยใช้สารตั้งต้นที่ติดฉลากด้วยสาร biotin และตรวจจับสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น ในเวลาเดียวกันจะจับกับส่วนของ nucleotide ในยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยา (single nucleotide polymorphisms: SNPs) ด้วย probes ที่จำเพาะ (specific oligonucleotide probes) ซึ่งตรึงอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสโดยจะเห็นปฏิกิริยาเป็นแถบสีเกิดขึ้นเมื่อพบตำแหน่งยีนที่สนใจ และไม่เกิดแถบสีเมื่อไม่พบตำแหน่งยีนนั้นๆ วิธี LPA จะตรวจหาตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน (mutation region) หรือการขาดหายไปของยีน wild-type นำมาสำหรับวิธี LPA ที่มีจำหน่ายในปัจจุบันมีหลายบริษัท เช่น INNO-LiPARIFTB (บริษัท Innogenetics) และ REBA MTB-MDR (บริษัท YD diagnostics) และ Genotype MTB-DRplus (บริษัท Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) เป็นต้น โดยน้ำยา REBA MTB-MDR และ Genotype MTBDRplus สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา ของเชื้อวัณโรค

ได้ 2 ชนิด คือ isoniazid (INH) และ rifampicin (RIF) ขณะที่ INNO-LiPARIFTB สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรคได้ 1 ชนิด คือ rifampicin จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามากกว่าร้อยละ 95 ของการดื้อยา RIF ตรวจพบที่ตำแหน่ง 81 base pair ของยีน rpoB⁽⁵⁻⁸⁾ ขณะที่ตำแหน่งกลายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดื้อยา INH เกิดขึ้นได้หลายยีนและหลายตำแหน่ง โดยร้อยละ 50-94 ตรวจพบที่ตำแหน่ง codon 315 ของยีน KatG⁽¹³⁻¹⁵⁾ ร้อยละ 6-30 ตรวจพบที่ตำแหน่ง InhA promoter⁽⁸⁻¹²⁾ และร้อยละ 1-12 ตรวจพบที่ตำแหน่ง ahpC-oxyR intergenic^(8,11,12) มีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา Genotype MTBDRplus ซึ่งมีค่าความไว และความจำเพาะของการตรวจดื้อต่อยา RIF ร้อยละ 98.1 (95% CI 95.9 - 99.1) และร้อยละ 98.7 (95% CI 97.3-99.4) ตามลำดับ มีความไวและความจำเพาะของการตรวจดื้อต่อยา INH ร้อยละ 84.3 (95%CI 77.0-90.0) และร้อยละ 99.5 (95% CI 98.0-100) ตามลำดับ เนื่องจากความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่จึงได้การศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Genotype MTBDRplus VER 2.0 กับเชื้อวัณโรคในเขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ยังไม่เคยทำการศึกษา

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษา ประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาโดยวิธี Line Probe Assay โดยชุดน้ำยา Genotype MTBDRplus VER 2.0 เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นำไปใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาที่มีคุณภาพ ให้ผลตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ

น่าเชื่อถือ ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการวินิจฉัยและรักษาวัณโรคดื้อยาในผู้ป่วย รวมทั้งการเฝ้าระวัง ป้องกันควบคุมวัณโรคดื้อยาในพื้นที่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยาโดยวิธี Line Probe Assay เปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน โดยวิเคราะห์ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าความถูกต้อง (accuracy) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value)

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษาวินิจฉัย การศึกษานี้เป็นการศึกษาย้อนหลังเชิงพรรณนา (Retrospective descriptive study) โดยรวบรวมข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2563

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง ผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2563 ซึ่งมีข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเสมหะส่งตรวจของผู้ป่วยไม่ซ้ำรายทั้งหมด จำนวน 539 ตัวอย่าง

เกณฑ์การคัดเลือก (Inclusion criteria) เป็นตัวอย่างเสมหะส่งตรวจที่มีข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการครบถ้วน ได้แก่ ผลเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อวัณโรค ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน และผลการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Line Probe Assay

เกณฑ์การคัดออก (Exclusion criteria) เป็นตัวอย่างเสมหะส่งตรวจที่มีข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการไม่สมบูรณ์ หรือมีข้อมูลที่ไม่ครบถ้วน โดยมีผลตรวจวิเคราะห์ที่ไม่ครบถ้วนของทั้ง 2 วิธี ได้แก่ ผลเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อวัณโรค ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน และผลการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Line Probe Assay

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. แบบบันทึกผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งประกอบด้วย ผลเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อวัณโรค ผลการทดสอบความไวต่อยาวิธีมาตรฐาน และผลการตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Line Probe Assay

2. ชุดทดสอบการตรวจวิเคราะห์การดื้อยา INH และ RIF ด้วยวิธี Line Probe Assay โดยใช้ชุดน้ำยา Genotype MTBDRplus VER 2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ซึ่งเป็นการตรวจหาการดื้อยารักษาวัณโรคโดยวิธี Line probe assay (LPA) อาศัยหลักการ Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค ร่วมกับหลักการ Reverse Hybridization โดยใช้ยีนที่จำเพาะ (Specific oligonucleotide probe) ที่ติดฉลากด้วยสาร Biotin เพื่อตรวจจับชิ้นส่วน Nucleotide ในยีนของเชื้อวัณโรคที่เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยาด้วยยีนที่จำเพาะ ซึ่งตรึงอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะเห็นปฏิกิริยาเป็นแถบสีเกิดขึ้นเมื่อพบตำแหน่งยีนที่สนใจ และไม่เกิดแถบสีเมื่อไม่พบตำแหน่งยีนนั้นๆ ซึ่งสามารถตรวจหาตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน (mutation region) หรือการขาดหายไปของยีน wild-type โดย

การดื้อต่อยา INH จะพบการกลายพันธุ์ของยีน katG และยีน inhA ส่วนการดื้อต่อยา RIF จะพบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB

3. ชุดทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐานอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค คือ อาหารไข่สูตร Lowenstein-Jensen (LJ) media มีส่วนประกอบของสารละลายเกลือแร่ ซึ่งประกอบด้วย asparagine, magnesium citrate, magnesium sulphate และ mono potassium phosphate เมื่อเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะถูกนำมาทดสอบหาแอนติเจน MPT64 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นเฉพาะในเชื้อกลุ่ม Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) ด้วยชุดทดสอบ TB Ag MPT64 Rapid (SD, Korea) เพื่อวินิจฉัยแยกเชื้อกลุ่ม MTBC ออกจากเชื้อกลุ่ม Non-tuberculous mycobacteria (NTM) การทดสอบความไวต่อยา INH และ RIF ของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน (Proportional method) โดยเพาะเชื้อ MTBC ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ media ที่มียา INH ความเข้มข้น 0.2 µg/ml, 1 µg/ml, ยา RIF ความเข้มข้น 40 µg/ml และอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ media ที่ไม่มียา นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียา ถ้าโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียามีปริมาณเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 1 ของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา ก็รายงานว่าเป็นเชื้อดื้อยาดังกล่าว

ขั้นตอนการศึกษา

1. เก็บข้อมูลแบบบันทึกผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งประกอบด้วย

ผลเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกวินิจฉัยชนิดของวัณโรค ผลการทดสอบความไวต่อยาวิธีมาตรฐาน และผลตรวจวิเคราะห์ทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี Line Probe Assay

2. ตรวจสอบความถูกต้อง ครบถ้วนของข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรงของเครื่องมือ ได้แก่ การหาค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าความถูกต้อง (accuracy) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) โดยใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความไวต่อยาไอโซไนอะไซด์ (INH) ของเชื้อวัณโรค

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลการตรวจวินิจฉัย และการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA โดยชุดทดสอบ GenoType MTBDRplus VER 2.0 เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค และการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน มีตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2563 ซึ่งถูกคัดเลือกสำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ จำนวน 335 ตัวอย่าง พบว่า

วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกวินิจฉัยชนิดของเชื้อวัณโรคให้ผลตรงกับการตรวจด้วยวิธี LPA จำนวน 323 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96.4 ให้ผลต่างกันคือ ผลการทดสอบความไวต่อยา INH และ RIF จำนวน 12 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.6 และจากตัวอย่างเชื้อจำนวน 335 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค INH และ RIF โดยวิธี มาตรฐาน พบว่า เป็นเชื้อดื้อยาทั้งสองชนิด วินิจฉัยเป็น MDR-TB จำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.5) เชื้อดื้อต่อยา INH ชนิดเดียววินิจฉัยเป็น non-MDR-TB จำนวน 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.5) และเชื้อที่ไม่ดื้อต่อยาทั้งสองชนิดวินิจฉัยเป็น susceptible-TB จำนวน 285 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85) โดยจากตัวอย่างเสมหะที่พบเชื้อวัณโรคทั้ง 335 ตัวอย่าง เมื่อนำมาพิจารณาแยกเป็น 3 ชุด

ผลการตรวจทั้ง 2 วิธี พบว่า เชื้อวัณโรคดื้อยา INH ให้ผลดื้อยาตรงกัน จำนวน 45 ราย ให้ผลไวต่อยาตรงกัน จำนวน 282 ตัวอย่าง โดยให้ผลต่างกัน คือ วิธี LPA พบดื้อยาแต่วิธีมาตรฐานให้ผลไวต่อยาจำนวน 3 ตัวอย่าง และวิธี LPA ให้ผลไวต่อยาแต่วิธีมาตรฐานให้ผลดื้อต่อยาจำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรงของเครื่องมือ พบว่าในการตรวจหาการดื้อยา INH ด้วยวิธี LPA มีค่าความไว ร้อยละ 90, ค่าความจำเพาะ ร้อยละ 98.9, ค่าความถูกต้อง ร้อยละ 97.6, ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 93.8 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 98.3 รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตาราง 1 ผลการทดสอบความไวต่อยาไอโซไนอะซิด (INH) ด้วยวิธี Line Probe Assay; LPA และวิธีมาตรฐาน

		วิธีมาตรฐาน		รวม
		ดื้อต่อยา INH	ไวต่อยา INH	
วิธี Line Probe Assay	ดื้อต่อยา INH	45	3	48
	ไวต่อยา INH	5	282	287
รวม		50	285	335

2. ผลการทดสอบความไวต่อยาไรแฟมพิซิน (RIF) ของเชื้อวัณโรค

ผลการตรวจทั้ง 2 วิธี พบว่าเชื้อวัณโรคดื้อยา RIF ให้ผลตรงกัน จำนวน 22 ตัวอย่าง ให้ผลไวต่อยาตรงกัน จำนวน 309 ตัวอย่าง โดยให้ผลต่างกัน คือ วิธี LPA พบดื้อยาแต่วิธีมาตรฐานให้ผลไวต่อยาจำนวน 2 ตัวอย่าง และวิธี LPA ให้ผลไวต่อยาแต่

วิธีมาตรฐานให้ผลดื้อต่อยาจำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรงของเครื่องมือ พบว่า ในการตรวจหาการดื้อยา RIF ด้วยวิธี LPA มีค่าความไว ร้อยละ 91.7, ค่าความจำเพาะ ร้อยละ 99.3, ค่าความถูกต้อง ร้อยละ 98.8, ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 91.7 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 99.3 รายละเอียดดังตารางที่ 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบความไวต่อยาไรแฟมพิซิน (RIF) ด้วยวิธี Line Probe Assay; LPA และวิธีมาตรฐาน

		วิธีมาตรฐาน		รวม
		ดื้อต่อยา RIF	ไวต่อยา RIF	
วิธี Line Probe Assay	ดื้อต่อยา RIF	22	2	24
	ไวต่อยา RIF	2	309	311
รวม		24	311	335

3. ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB)

ผลการตรวจทั้ง 2 วิธี พบว่าเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ให้ผลตรงกัน จำนวน 21 ตัวอย่าง ให้ผลไวต่อยาตรงกัน จำนวน 310 ตัวอย่าง โดยให้ผลต่างกัน คือ วิธี LPA ให้ผลไวต่อยาแต่วิธีมาตรฐานให้ผลดื้อต่อยาจำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อ

วิเคราะห์โดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรงของเครื่องมือ พบว่าในการตรวจหาเชื้อวัณโรคชนิด MDR-TB ด้วยวิธี LPA มีค่าความไว ร้อยละ 84, ค่าความจำเพาะ ร้อยละ 100, ค่าความถูกต้อง ร้อยละ 98.8, ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 98.7 รายละเอียดดังตารางที่ 3

ตาราง 3 ผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคหลายขนาน (MDR-TB) ด้วยวิธี Line Probe Assay; LPA และวิธีมาตรฐาน

		วิธีมาตรฐาน		รวม
		ดื้อต่อยา*	ไวต่อยา**	
วิธี Line Probe Assay	ดื้อต่อยา*	21	0	21
	ไวต่อยา**	4	310	314
รวม		25	310	335

*ดื้อต่อยา = ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าดื้อต่อยา 2 ชนิด ทั้ง INH และ RIF (เชื้อ MDR-TB)

**ไวต่อยา = ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่ามีความไวต่อยา 2 ชนิด ทั้ง INH และ RIF

อภิปรายผลการศึกษา

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและความไวต่อยาด้วยวิธี Line Probe Assay เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน จากตัวอย่างเสมหะทั้งหมด จำนวน 335 ตัวอย่าง พบว่าวิธี LPA มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าความถูกต้อง ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบสูง การตรวจหาการดื้อยา INH, RIF และชนิด MDR-TB ของวิธี LPA มีความไว ร้อยละ 90, 91.7 และ 84 มีความจำเพาะ ร้อยละ 98.9, 99.3 และ 100 มีค่าความถูกต้อง ร้อยละ 97.6, 98.8 และ 98.8 มีค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 93.8, 91.7 และ 100 มีค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 98.3, 99.3 และ 98.7 ตามลำดับ ซึ่งค่าความไวและความจำเพาะของการตรวจการดื้อยา RIF มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งมีค่าความไวต่อการตรวจการดื้อยา RIF อยู่ในช่วงร้อยละ 95-99⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ ส่วนการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา INH และการดื้อยาชนิด MDR-TB สูงกว่าการศึกษาก่อนหน้าที่กล่าวข้างต้น มีการศึกษาอื่นๆ ได้วิเคราะห์ข้อจำกัดหลักของชุดน้ำยา Genotype MTBDRplus VER 2.0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความไวใน

การตรวจหาการดื้อยา INH ต่ำ ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน katG ที่ตำแหน่ง S315T จึงได้มีการพัฒนาเพิ่มการตรวจหาการกลายพันธุ์ใน inhA^(16, 17)

จากผลการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่าวิธี LPA โดยชุดน้ำยา Genotype MTBDRplus VER 2.0 เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและสามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อต่อยา INH และ RIF ซึ่งสามารถตรวจทั้งในตัวอย่างที่เป็นโคลนของเชื้อและจากสิ่งส่งตรวจที่มีผลการตรวจ smear AFB ที่เป็นบวก การตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงที่มีผลเสมหะบวกโดยใช้ระยะเวลาในการตรวจทั้งสิ้นประมาณ 6 ชั่วโมงสามารถลดเวลาการรอให้โคลนของเชื้อเจริญ และการรอผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน (proportion method) ที่ต้องใช้ระยะเวลาหลายสัปดาห์ อย่างไรก็ตามวิธีทางอณูชีววิทยาโดยวิธี LPA ซึ่งใช้หลักการ PCR และ hybridization มีข้อดี คือสามารถรายงานผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาได้ 2 ชนิด คือ rifampicin (RIF) และ isoniazid (INH) ใช้ระยะเวลาในการรายงานผลประมาณไม่เกิน 14 วัน สามารถตรวจได้สูงสุด 48 ตัวอย่างต่อครั้ง ส่วนข้อจำกัดของวิธี LPA คือ ต้องจัดเตรียม

พื้นที่ห้องปฏิบัติการสำหรับงานก่อนทำ PCR (ขั้นตอนสกัด DNA และขั้นตอนเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าเครื่อง PCR) และงานหลังการทำ PCR (ขั้นตอน PCR amplification และขั้นตอน hybridization) เพื่อลดปัญหาการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอน PCR amplification ต้องจัดหาเครื่องมือต่างๆ หลายชนิด เช่น เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องไฮบริไดเซชัน เครื่องเขย่า เครื่องอ่างน้ำร้อน เครื่องให้ความร้อนหลอดทดลอง และเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น อีกทั้งผู้ปฏิบัติงานต้องได้รับการฝึกอบรมเป็นอย่างดี ต้องมีทักษะ ความชำนาญงานสูง ตัวอย่างที่จะนำมาตรวจด้วยวิธีนี้ควรมีผลตรวจ AFB smear เป็นบวก หรือใช้กับเชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นแล้ว (culture isolates)⁽¹⁸⁾ ซึ่งผลตรวจจะให้ค่าความถูกต้องสูง อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันวิธี LPA ถือเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยและทดสอบความไวต่อยา INH และ RIF เชื้อวัณโรคในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานยังต้องได้รับการตรวจเพื่อยืนยันการมีชีวิตของเชื้อวัณโรคควบคู่กันไป รวมทั้งการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน

สรุปผลการศึกษา

การตรวจทางอณูชีววิทยาโดยวิธี Line Probe Assay; LPA มีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าความถูกต้อง ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบสูง สามารถรายงานผลตรวจได้อย่างรวดเร็ว การนำวิธี LPA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรค จะช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยของแพทย์อย่างรวดเร็ว ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยสูตรยาที่เหมาะสมและลดการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาไปสู่ชุมชนได้อย่างทันทั่วถึง อย่างไรก็ตามการเลือกวิธี LPA มาใช้ใน

การตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ร่วมด้วย เช่น ความยากง่ายของวิธี ปริมาณงานความเพียงพอ ทักษะ ความชำนาญของบุคลากร ความเหมาะสมของสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และงบประมาณที่เพียงพอ เพื่อบริหารจัดการทรัพยากรให้มีความคุ้มค่า มีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

ข้อเสนอแนะจากการวิจัยครั้งนี้

แพทย์สามารถใช้วิธี LPA ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและการดื้อต่อยาในตัวอย่างเสมหะส่งตรวจจากผู้ป่วยได้ โดยใช้ระยะเวลาทางห้องปฏิบัติการน้อยกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยวิธีมาตรฐาน ทำให้ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยและรักษาจากแพทย์ที่รวดเร็ว

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

ควรนำเทคโนโลยี Next Generation Sequencing (NGS) มาใช้เพื่อตรวจวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ หรือการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของสารพันธุกรรมในตัวอย่างเชื้อวัณโรคเพิ่มเติม เนื่องจากมีรายงานศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า เชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ก่อให้เกิดการดื้อต่อยา INH จะไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยวิธี LPA ซึ่งจะช่วยให้หลีกเลี่ยงความผิดพลาดในการแยกวินิจฉัยและแปลผลการตรวจเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา หรือมีความไวต่อยาได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้สำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค ที่ได้ให้การสนับสนุนข้อมูล

ผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มพัฒนานวัตกรรมและวิจัย สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 9 จังหวัดนครราชสีมา ที่ช่วยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะเพื่อให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2565 [อินเทอร์เน็ต]. 2565 [เข้าถึงเมื่อ 2566 มิถุนายน 28]. เข้าถึงได้จาก: https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_profiles/?_inputs_entity_type=%22country%22&lan=%22EN%22&iso2=%22TH%22.
2. Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, van Belkum A. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(6):867-70.
3. Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(9):866-70.
4. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. การคัดกรองเพื่อค้นหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2561.
5. Makinen, J., H. J. Marttila, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, H. Soini. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:350-52.
6. Cho E, Shamputa IC, Kwak HK, Lee J, Lee M, Hwang S, et al. Utility of the REBA MTB-Rifa® assay for rapid detection of rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infect Dis*. 2013;13:478.
7. Rufai SB, Kumar P, Singh A, Prajapati S, Balooni V, Singh S. Comparison of Xpert MTB/RIF with line probe assay for detection of rifampin-mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2014;52:1846-52.
8. Bang H, Park S, Hwang J, Jin H, Cho E, Kim DY, et al. Improved rapid molecular diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis using a new reverse hybridization assay, REBA MTB-MDR. *J Med Microbiol*. 2011;60:1447-54.
9. Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin, and ethambutol resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2012;12:37.

10. Singhal R, Arora J, Lal P, Bhalla M, Myneeedu VP, Behera D. Comparison of line probe assay with liquid culture for rapid detection of multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res*. 2012;136:1044-7.
11. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5477-82.
12. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, Rodwell TC. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One*. 2015;10: e0119628.
13. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ*. 1969;41:21-43.
14. Cavusoglu, C., A. Turhan, P. Akinci, I. Soyler. Evaluation of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2338-2342.
15. Hillemann, D., M. Weizenegger, T. Kubica, E. Richter, S. Niemann. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3699-3703.
16. Miotto, P., F. Piana, V. Penati, F. Canducci, G. B. Migliori, D. M. Cirillo. Use of GenoType MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2485-2491.
17. Makinen, J., H. J. Marttila, M. Marjamaki, M. K. Viljanen, H. Soini. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:350-352.
18. Meaza A, Kebede A, Yaregal Z, Dagne Z, Moga S, Yenew B, et al. Evaluation of genotye MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):280.