ว กรมวิทย พ 2567; 66 (4): 500–516

การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Multiplex Real-time PCR

วิลาวัลย์ กันทะสอน ณัชชา ปาณะจำนงค์ บัณฑิต พรหมรักษา และ ดุจดาว บุญยอด
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก อำเภอเมือง พิษณุโลก 65000

บทคัดย่อ วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประเทศไทย เกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) ซึ่งพบ *M. tuberculosis* (MTB) มากที่สุด ขณะที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่วัณโรค (Non-tuberculous mycobacteria; NTM) มักพบเป็นการติดเชื้อฉวยโอกาส การจำแนกเชื้อสองกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการวางแผนรักษาผู้ป่วย การตรวจด้วย real-time PCR เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง และสามารถรองรับตัวอย่างจำนวนมาก งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อวัณโรค MTB/NTM แบบ multiplex real-time PCR โดยใช้ primer/probe สำหรับยีน *IS6110* ที่จำเพาะต่อ MTC สามารถตรวจจับเชื้อมาตรฐาน MTB ได้ในความเข้มข้นต่ำสุด 0.12 copies/reaction และใช้ primer/probe สำหรับยีน *16S rRNA* ซึ่งจำเพาะต่อกลุ่ม *Mycobacterium* species (PAN) ทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน MTB และ NTM โดยให้ผลที่ 1.2 copies/reaction และ 0.12 CFU/reaction ตามลำดับ การประเมินวิธีการที่พัฒนาขึ้นนี้ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม เมื่อทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ผลการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ (gold standard) ในตัวอย่างเสมหะ จำนวน 230 ตัวอย่าง ซึ่งมีผลการเพาะเชื้อเป็นบวกกับ MTB และ NTM จำนวน 90 และ 50 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่าวิธีนี้มีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ สำหรับ MTB ที่ร้อยละ 88.9, 100.0, 100.0 และ 93.3 และสำหรับ NTM ที่ร้อยละ 84.0, 98.3, 93.3 และ 95.7 ตามลำดับ วิธีที่พัฒนาสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไวและความจำเพาะสูง ลดต้นทุนในการจัดซื้อน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ เพิ่มศักยภาพในการค้นหาผู้ติดเชื้อวัณโรค และส่งเสริมการยุติวัณโรคอย่างยั่งยืน

คำสำคัญ: วัณโรค, *Mycobacterium tuberculosis*, Non-tuberculous mycobacteria, Multiplex real-time PCR

Corresponding author E-mail: wilawan.k@dmsc.mail.go.th

Received: 10 April 2024 *Revised: 22 November 2024* *Accepted: 12 December 2024*

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis; TB) เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขระดับโลกและประเทศไทย กระบวนการป้องกันและควบคุมวัณโรคให้มีประสิทธิภาพนั้น ปัจจัยสำคัญ คือ การค้นหาผู้ป่วยวัณโรคให้รวดเร็วตั้งแต่เริ่มมีอาการ เพื่อให้ผู้ป่วยได้เข้ารับการรักษาได้อย่างรวดเร็ว ลดการแพร่กระจายของเชื้อ และส่งเสริมการยุติวัณโรคได้อย่างยั่งยืน จากการคาดการณ์อุบัติการณ์วัณโรคของประเทศไทยโดยองค์การอนามัยโลก ในปี พ.ศ. 2564 มีอุบัติการณ์วัณโรค 143 ต่อแสนประชากร หรือประมาณ 103,000 คน[1,2] ประเทศไทยได้จัดทำแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค ระยะที่ 2 (พ.ศ. 2566–2570) เพื่อกำหนดแนวทางในการดำเนินงานป้องกัน ดูแลรักษา และควบคุมวัณโรค โดยมีเป้าหมายลดอัตราอุบัติการณ์วัณโรคลงจาก 143 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2564 ให้เหลือ 89 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2570 และเพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (The End TB Strategy) ที่กำหนดไว้ในปี พ.ศ. 2578 (ค.ศ. 2035) และในยุทธศาสตร์ที่ 5 ตามแผนปฏิบัติการระดับชาติต่อต้านวัณโรค ได้ส่งเสริมการวิจัยและพัฒนานวัตกรรมในการป้องกันควบคุมวัณโรค เพื่อประชาชนและเครือข่ายเข้าถึงการใช้ประโยชน์ของงานวิจัยและนวัตกรรมในการยุติวัณโรค[2]

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) จัดอยู่ในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex (MTC) พบได้ในทุกอวัยวะของร่างกาย ส่วนใหญ่ร้อยละ 80 พบที่ปอด (pulmonary tuberculosis) ซึ่งสามารถแพร่เชื้อได้ง่าย และร้อยละ 20 พบที่อวัยวะอื่น ๆ นอกปอด (extrapulmonary tuberculosis) เชื้อ *Mycobacterium* แบ่งเป็น 3 กลุ่ม 1) *M. tuberculosis* complex (MTC) เป็นสาเหตุของวัณโรคในคนและสัตว์ มีจำนวน 8 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่พบมากที่สุด คือ *M. tuberculosis* ส่วนสายพันธุ์อื่นที่พบมากในกลุ่มนี้ เช่น *M. africanum* พบได้ในแถบแอฟริกา *M. bovis* มักก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งอาจติดต่อถึงคนได้ และเป็นสายพันธุ์ที่นำมาผลิตวัคซีนบีซีจี 2) Non-tuberculous mycobacteria (NTM) มีจำนวนมากกว่า 140 สายพันธุ์ เช่น *M. avium* complex (MAC) พบในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ หรือในสัตว์ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรคในคน ยกเว้นผู้ที่ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ และ 3) *M. leprae* เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน เชื้อ NTM พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อฉวยโอกาส แสดงอาการคล้ายวัณโรคปอด ซึ่งการจัดจำแนกเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการรักษาผู้ป่วยเป็นอย่างมาก และเป็นประโยชน์ในการตัดสินใจต่อการรักษาของแพทย์ เนื่องจากมีวิธีการและระยะเวลาที่รักษาแตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบความไวต่อยารักษาวัณโรค พบว่าผู้ติดเชื้อ NTM มากกว่าร้อยละ 95 ดื้อยารักษาวัณโรค ซึ่งหากไม่มีการตรวจคัดแยกผู้ติดเชื้อ NTM ออกจากผู้ป่วยวัณโรคจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่มีประสิทธิภาพและอาจส่งผลให้มีจำนวนผู้เสียชีวิตเพิ่มมากขึ้น[3,4]

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการย้อมสีทนกรด (acid-fast bacilli stain; AFB stain) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) การเพาะเลี้ยงเชื้อและพิสูจน์ยืนยันชนิด (mycobacterial culture and identification) และการทดสอบทางอณูชีววิทยา (molecular biology testing) รวมทั้งการทดสอบความไวต่อยา (drug susceptibility testing) การทดสอบแอนติเจนของเชื้อวัณโรค (TB antigen testing) และการทดสอบการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อวัณโรค (immune reactivity testing) ปัจจุบันโรงพยาบาลระดับชุมชนใช้วิธีการย้อมสี AFB ซึ่งมีความไวและความจำเพาะต่ำ ไม่สามารถตรวจเชื้อในกรณีที่มีน้อยหรือไม่อยู่ในระยะแพร่กระจาย และไม่สามารถจำแนกได้ว่าเชื้อที่พบเป็นเชื้อ MTC หรือ NTM ส่วนการตรวจโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยงและรายงานผล การส่งตรวจเสมหะด้วยวิธีอื่น เช่น Gene Xpert/RIF[5] ที่โรงพยาบาลศูนย์ขนาดใหญ่ ถึงแม้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำ ความไว ความจำเพาะสูง และสามารถตรวจการดื้อยา rifampicin ได้ แต่ไม่สามารถรองรับปริมาณตัวอย่างต่อวันที่มีจำนวนมากได้ ส่งผลให้เกิดความล่าช้าต่อการรักษาและควบคุมโรค

การตรวจเชื้อวัณโรคด้วยหลักการ real-time PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนและตรวจวัดเชิงปริมาณของสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ โดยหลักการติดฉลากสารเรืองแสงเข้ากับโพรบ (probe) สำหรับวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นระหว่างการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ทราบผลรวดเร็ว การตรวจด้วยวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูงร้อยละ 80 และร้อยละ 98–99 ตามลำดับ ทำให้ตรวจพบเชื้อได้รวดเร็วขึ้น อีกทั้งสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ได้[5,6] จากการศึกษาของ Kim JU และคณะ[7] และ Rocchetti TT และคณะ[8] ได้ประเมินประสิทธิภาพของ probe และไพรเมอร์ (primer) บนตำแหน่งยีน *IS6110* ที่มีความจำเพาะกับเชื้อวัณโรคกลุ่ม MTC และบนตำแหน่งยีน *16S rRNA* จำเพาะกับเชื้อ *Mycobacterium* species (PAN-*Mycobacterium*; PAN) ซึ่งรวมถึงเชื้อกลุ่ม NTM เพื่อตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม MTC และกลุ่ม NTM ในเชื้อมาตรฐาน พบว่าชุด primers และ probes ดังกล่าวสามารถตรวจเชื้อทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ประยุกต์ใช้ primer และ probe จากรายงานการศึกษาข้างต้น เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรค MTB และ NTM ด้วยเทคนิค multiplex real-time PCR โดยมีเป้าหมายนำวิธีการตรวจมาใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล เขตสุขภาพที่ 2 สำหรับเพิ่มศักยภาพการตรวจค้นผู้ติดเชื้อวัณโรค ทำให้ผู้ป่วยได้เข้าสู่การรักษาได้รวดเร็วขึ้น ลดการแพร่กระจายของเชื้อ ส่งเสริมการยุติวัณโรคได้อย่างยั่งยืน และลดราคาต้นทุนขององค์กรในการจัดซื้อน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษาและกลุ่มตัวอย่าง

เชื้อมาตรฐาน

เชื้อมาตรฐานสำหรับขั้นตอนการพัฒนาวิธีการและใช้เป็นตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive control) ประกอบด้วย Amplirun® Total MDR-TB verification & contol panel (sputum), MBTC027 (Vircell Microbiologists, ประเทศสเปน) (3.2×10^4 copies/mL), *Mycobacterium avium* ATCC25291 (1.1×10^8 CFU/mL), *M.intracellulare* ATCC35761 (1.1×10^8 CFU/mL) เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Streptococcus pneumonia* ATCC49619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC29213 ได้รับการสนับสนุนจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ตัวอย่างจากผู้ป่วยวัณโรค

ตัวอย่างตะกอนเสมหะ (sputum sediment) ของผู้ป่วยที่ทราบผลการตรวจวิเคราะห์การเพาะเชื้อ (culture) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) จำนวน 230 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *M. tuberculosis* (MTB) จำนวน 90 ตัวอย่าง Non-tuberculous mycobacteria (NTM) จำนวน 50 ตัวอย่าง และตัวอย่างผลลบ จำนวน 90 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำ ระหว่างปี พ.ศ. 2564–2566 จากองค์การระหว่างประเทศเพื่อการโยกย้ายถิ่นฐาน (International Organization for Migration; IOM) อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก

Primers และ probes

ใช้การตรวจยีน *IS6110*[5,9] สำหรับการวินิจฉัยเชื้อ MTB ยีน *16S rRNA* สำหรับการตรวจ *Mycobacterium* species (PAN) และ RNase P (Endogenous IC housekeeping gene) สำหรับการควบคุมคุณภาพภายใน (internal control; IC) primers และ probes สังเคราะห์จากบริษัท Macrogen, สาธารณรัฐเกาหลี รายละเอียดลำดับเบสของ primers และ probes ดังแสดงในตารางที่ 1

การสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อมาตรฐานเพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพวิธีการตรวจและใช้เป็นตัวอย่างควบคุม

ดำเนินการภายใต้มาตรฐานความปลอดภัยทางห้องปฏิบัติการ ISO15190 และพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ โดยนำเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis*

ตารางที่ 1 ลำดับเบส (sequence) และความเข้มข้นของ primers และ probes

Target	Gene	Primer/ Probe	Sequence (5'to 3')	Final concentration* (μM)	References
MTB	*IS6110*	Forward	CGA ACT CAA GGA GCA CAT CAG	0.5	Kim JU et al.[7]
		Reverse	CAG GGT TAG CCA CAC TTT GC	0.5	
		Probe	FAM-CGC CAA CTA CGG TGT TTA CGG TG-BHQ1	0.18	
PAN (MTB and NTM)	*16S rRNA*	Forward	CGA ACG GAA AGG YCY CTT CG	0.5	Rocchetti TT et al.[8]
		Reverse	CCG TCG TCG CCT TGG TAG	0.5	
		Probe	HEX-TTT WGC GGT GTG GGA TGR GCC CG-BHQ1	0.2	
IC	*RNase P*	Forward	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	0.1	Boddicker JD et al.[10]
		Reverse	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	0.2	
		Probe	Cy5-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-BHQ3	0.2	

หมายเหตุ : * final concentration ได้จากการทดลองปรับสภาวะเหมาะสม

MTBC027 (MTB) อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized) ละลายกับ DNase-RNase free water ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 3.2×10^4 copies/mL จากนั้นเจือจางเป็น 1×10^4 copies/mL นำไปสกัดสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Zybio-IFU-Bacteria Nucleic acid Extraction kit BF-B-32 และเครื่องสกัดสารพันธุกรรม Zybio EXM3000 (Zybio, สาธารณรัฐประชาชนจีน) โดยใช้ปริมาตร 200 μl สกัดได้ DNA ปริมาตร 50 μl คิดเป็นความเข้มข้น 4×10^4 copies/mL หลังจากนั้นเจือจาง DNA แบบ 10 เท่า เป็น 4×10^4 - 4 copies/mL (5 ความเข้มข้น) เชื้อมาตรฐาน *M. avium* ATCC25291 (NTM)อยู่ในรูปผงแห้ง นำมาละลายกับ DNase-RNase free water ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 1.1×10^8 CFU/mL เจือจางเป็น 1×10^7 CFU/mL นำไปสกัด DNA โดยใช้ปริมาตร 200 μl ได้ DNA elution ปริมาตร 50 μl คิดเป็นความเข้มข้น 4×10^7 CFU/mL จากนั้นเจือจาง DNA แบบ 10 เท่า เป็น 4×10^7 - 4 CFU/mL (8 ความเข้มข้น)

RNase P (IC) ใช้ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเสมหะของผู้ที่ไม่ติดเชื้อแล้วเจือจาง DNA แบบ 10 เท่า จำนวน 3 ความเข้มข้น นำ DNA ไปทดสอบกับวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยให้ค่า cycle threshold (Ct) อยู่ระหว่าง 25-35

การเตรียมตัวอย่างควบคุม (positive control; PC) ทำโดยผสม DNA ของเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 ที่ความเข้มข้น 4×10^2 copies/mL, *M. avium* ATCC25291 ที่ความเข้มข้น 4×10^2 CFU/mL และ RNase P ที่มีค่า Ct เหมาะสมรวมในหลอดเดียวกัน อัตราส่วน 1:1:1 และทดสอบกับวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เก็บรวบรวมผลค่า Ct จำนวน 20 ครั้ง และคำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean Ct)

การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเสมหะ

DNA จากตัวอย่างเสมหะด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูปและเครื่องมือเดียวกันกับเชื้อมาตรฐาน โดยมีขั้นตอน pre-treatment ตัวอย่างเสมหะด้วย 2% NaOH (Zybio, สาธารณรัฐประชาชนจีน) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น กรณีตัวอย่างเสมหะที่มีลักษณะหนืดใช้ micropipette ขนาด 1,000 μL (Biohit, สาธารณรัฐฟินแลนด์) ปิเปตเสมหะปริมาตร 200 μL ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 mL (Axygen, สาธารณรัฐประชาชนจีน) จากนั้นเติม pre-treatment solution ปริมาตร 100 μL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer (Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา) เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปบ่มที่ Dry Bath incubator (Thermolyne,

สหรัฐอเมริกา) อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 300 µL ไปสกัด DNA กรณีตัวอย่างเสมหะที่มีลักษณะเหลวใส ผสมตัวอย่างให้เข้ากันด้วย vortex mixer ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 1,000 µL ลงใน microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 mL นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที (Thermo Scientific, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง ปริมาตร 800 µL ระวังไม่ให้ติดตะกอนขึ้นมาด้วย เติม pre-treatment solution ปริมาตร 100 µL ได้ปริมาตรรวม 300 µL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 10 วินาที และนำไปบ่มที่ Dry Bath incubator อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปสกัดสารพันธุกรรม โดยการเติม Proteinase K ปริมาตร 15 µL (Zybio, สาธารณรัฐประชาชนจีน) ลงในตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการ pre-treatment แล้ว ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 µL

การทดสอบสภาวะเหมาะสมของวิธีการตรวจวิเคราะห์ multiplex real-time PCR

นำ primer และ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ MTB, NTM และ RNase P ทดสอบกับตัวอย่างควบคุมชนิดบวก เพื่อเลือกความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเป้าหมายแบบ singleplex real-time PCR โดยทดสอบความเข้มข้นของ primer ในช่วง 0.1-0.9 µM และ probe ในช่วง 0.15-0.25 µM เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้ว ทดสอบแบบรวมปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน (multiplex real-time PCR) เพื่อปรับความเข้มข้นอีกครั้ง สำหรับการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมทำโดยทดสอบไล่ระดับอุณหภูมิ (gradient temperature) ระหว่าง 55.0-65.0 °C จากนั้นพิจารณาค่า Ct และกราฟลักษณะ s curve ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้ง 3 เป้าหมาย ภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียวกัน

การตรวจแบบ multiplex real-time PCR มีปริมาตรรวมสุทธิ 15 µL/reaction ประกอบด้วย 2X KAPA probe fast qPCR master mix (Roche, แอฟริกาใต้) ปริมาตร 7.5 µL, primer mix และ probe mix อย่างละ 1 µL ความเข้มข้นสุดท้ายของ primer และ probe หลังจากปรับความเหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 1, DNase-RNase free water ปริมาตร 2.5 µL และ DNA template ปริมาตร 3 µL ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง CFX Opus96 (Bio-RAD, สหรัฐอเมริกา) มีขั้นตอนการทำปฏิกิริยา คือ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น amplification จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 15 วินาที ตั้งเครื่องตรวจวัดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ในแต่ละรอบการเกิดปฏิกิริยาที่ขั้นตอน extension ตรวจวัดในช่องแสง FAM สำหรับตรวจวัดเป้าหมาย MTB ช่องแสง HEX สำหรับตรวจวัดเป้าหมาย PAN และช่องแสง Cy5 สำหรับตรวจวัดเป้าหมาย IC

การแปลผลและรายงานผลสามารถอ่านและรายงานผลได้ เมื่อ PC ได้ตามเกณฑ์ และตัวอย่างควบคุมชนิดไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย (no template control; NTC) ต้องไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ผลบวกต้องได้ค่า Ct น้อยกว่า 40 ผลกำกวม (inconclusive) ค่า Ct มากกว่าหรือเท่ากับ 40 ดังแสดงในตารางที่ 2

การทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวควบคุมผลบวก การประเมินผลวิธีการตรวจของวิธีที่พัฒนา (method validation)

การประเมินความถูกต้องของวิธีทดสอบ ตามหลักเกณฑ์การคัดเลือกประเมินวิธีการตรวจและน้ำยาทางห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์[11] ได้แก่ การทดสอบความจำเพาะของวิธี (analytical specificity), limit of detection (LOD) และ measurement range หรือ linearity โดยทดสอบกับเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 และ *M. avium* ATCC25291

ตารางที่ 2 การแปลผลและการรายงานผลของวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ผลการทดสอบ			การแปลผล	การรายงานผล
IC (Cy5)	**MTB (FAM)**	**PAN (HEX)**		
+	+	+	MTB: Detected Mycobacteria: Detected	MTB infection*
+	–	+	MTB: Not detected Mycobacteria: Detected	NTM
+	–	–	MTB: Not detected Mycobacteria: Not detected	Negative
+	+	–	MTB: Detected Mycobacteria: Not detected	Invalid**
–	–	–	MTB: Not detected Mycobacteria: Not detected	Invalid**

หมายเหตุ: * กรณีค่า Ct ของ PAN น้อยกว่าค่า Ct ของ MTB อาจเป็นการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง MTB และ NTM
** ผลที่เป็น Invalid ให้เตรียมตัวอย่าง และดำเนินขั้นตอนการทดสอบใหม่อีกครั้ง

การทดสอบความจำเพาะ (analytical specificity) ของวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะกับ *M. tuberculosis* MTBC027, *M. avium* ATCC25291, *M. intracellulare* ATCC35761 และทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) กับกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะอาการของโรคใกล้เคียงกัน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Streptococcus pneumonia* ATCC49619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC29213 โดยทดสอบ 3 ซ้ำ ทุกตัวอย่างของเชื้อ

การหาปริมาณความต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD)

ทดสอบวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 และ *M. avium* ATCC25291 เจือจางความเข้มข้นแบบ 10 เท่า คือ 12, 1.2, 0.12, 0.012 และ 0.0012 copies/reaction แต่ละความเข้มข้นทำการทดสอบ 20 ซ้ำ ใช้เกณฑ์การตัดสินที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (confidence interval; CI)

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (measurement range หรือ linearity)

ทดสอบวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 และ *M. avium* ATCC25291 เจือจางความเข้มข้นแบบ 10 เท่า โดยใช้ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 และ 8 ความเข้มข้น ตามลำดับ ครอบคลุมค่าต่ำ กลาง และสูง ทำซ้ำแต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ นำค่า Ct ที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นคำนวณหาค่าเฉลี่ย โดยแปลงระดับความเข้มข้นเป็นค่า log นำมาเขียนกราฟเปรียบเทียบค่า Ct ที่อ่านได้ของแต่ละความเข้มข้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) โดยทั่วไปเกณฑ์การยอมรับค่า R ต้องมากกว่า 0.975 และ R^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.950[11]

การประเมินการใช้งานทางคลินิก

ทดสอบวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่างตะกอนเสมหะ (sputum sediment) ที่เหลือจากการนำไปเพาะเชื้อ (gold standard) จาก IOM จำนวน 230 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเพาะเชื้อผลบวก MTB จำนวน 90 ตัวอย่าง ผลบวก NTM

จำนวน 50 ตัวอย่าง และผลเพาะเชื้อเป็นลบ จำนวน 90 ตัวอย่าง

จริยธรรมการวิจัยในมนุษย์

โครงการนี้ผ่านการรับรองด้านจริยธรรมในคนจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่โครงการวิจัย 6/2566 วันที่ได้รับการอนุมัติ 17 มีนาคม พ.ศ. 2566

ผล

การศึกษาความเหมาะสมของวิธีการที่พัฒนาขึ้น

ดำเนินการทดสอบโดยเลือกความเข้มข้นของ primer และ probe ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ MTB, NTM และ RNase P ในแต่ละเป้าหมายแบบ singleplex real-time PCR พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ primer ต่อ MTB, NTM ทั้ง forward และ reverse primer 0.5 μM และ RNase P forward primer 0.1 μM, reverse primer 0.2 μM และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ probe คือ MTB probe 0.18 μM, NTM probe 0.2 μM และ RNase P probe 0.2 μM การเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาในขั้นตอน annealing ของแต่ละเป้าหมาย โดยทดสอบไล่ระดับอุณหภูมิ (gradient temperature) ระหว่าง 55.0-65.0°C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 61.0-63.0°C จากนั้นนำมาทดสอบปฏิกิริยารวมในหลอดเดียวกันแบบ multiplex real-time PCR พบว่าการเกิดปฏิกิริยาเหมาะสมตามความเข้มข้นแบบ singleplex real-time PCR และสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายใต้สภาวะอุณหภูมิเดียวกันที่อุณหภูมิ 63.0°C ได้

ตัวอย่าง positive control จากการนำ DNA ของเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 *M. avium* ATCC25291 ผสมกับ RNase P จากตัวอย่างเสมหะของผู้ที่ไม่ติดเชื้อ มีผลทดสอบด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นพบค่าเฉลี่ย Ct และช่วงของค่า Ct (mean Ct (range Ct)) ของ MTB เท่ากับ 30.19 (29.62-31.76) PAN เท่ากับ 29.00 (26.56-31.95) และ IC เท่ากับ 31.40 (28.26-32.99)

วิธีการที่พัฒนาขึ้นใช้ปริมาตรรวมสุทธิ 15 μL/reaction โดยใช้สารเคมีและปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 3 มีขั้นตอนการทำปฏิกิริยาคือ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้น amplification จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 15 วินาที ผลการวัดสัญญาณสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ช่องแสง FAM สำหรับตรวจวัดเป้าหมายเชื้อ MTB ช่องแสง HEX สำหรับตรวจวัดเป้าหมายเชื้อ PAN และช่องแสง Cy5 สำหรับตรวจวัดเป้าหมาย IC ดังแสดงในภาพที่ 1 กำหนดการแปลผลและรายงานผลดังแสดงในตารางที่ 2 สามารถอ่านและรายงานผลได้เมื่อ PC ได้ตามเกณฑ์ และ NTC ต้องไม่มีสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ ผลบวกต้องได้ค่า Ct น้อยกว่า 40 ผลกำกวม (inconclusive) ค่า Ct มากกว่าหรือเท่ากับ 40

ความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์ (analytical specificity)

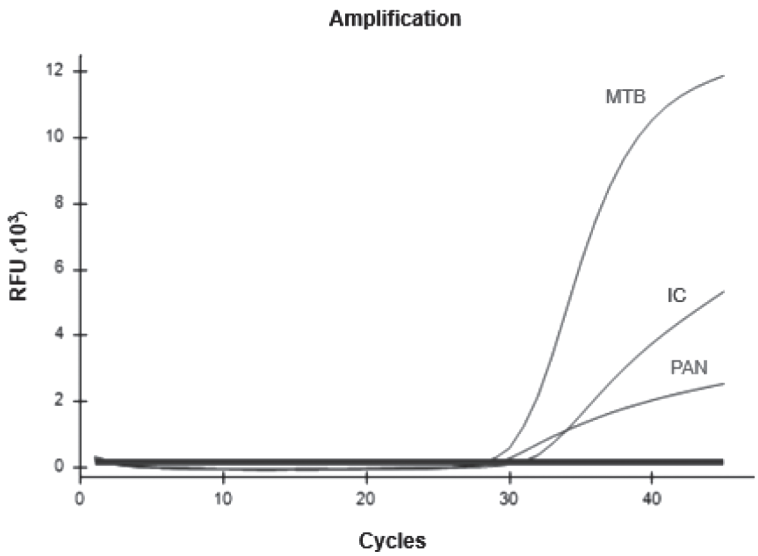
ผลการทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ โดยทดสอบ 3 ซ้ำทุกตัวอย่างของเชื้อทั้งวิธี singleplex real-time PCR และ multiplex real-time PCR พบผลลบทั้งหมด (ร้อยละ 100) โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการข้ามกลุ่ม (cross-reactivity) และให้ผลบวกกับเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 *M. avium* ATCC25291 และ *M. intracellulare* ATCC35761 ดังแสดงในตารางที่ 4

การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงการวิเคราะห์ (measurement range หรือ linearity)

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination; R^2) ในการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 โดยทดสอบกับ MTB primer/probe และ *M. avium* ATCC25291 โดยทดสอบกับ PAN primer/probe คือ 0.9984 และ 0.9975 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) คือ 0.9992 และ 0.9988 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 สารเคมีและปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา multiplex real-time PCR จำนวน 1 reaction

Reagents	Volume/Reaction
2X KAPA probe fast qPCR master mix	7.5 µL
DNase-RNase free water	2.5 µL
Primer mix	1.0 µL
Probe mix	1.0 µL
DNA template	3.0 µL
Total Volume	15.0 µL



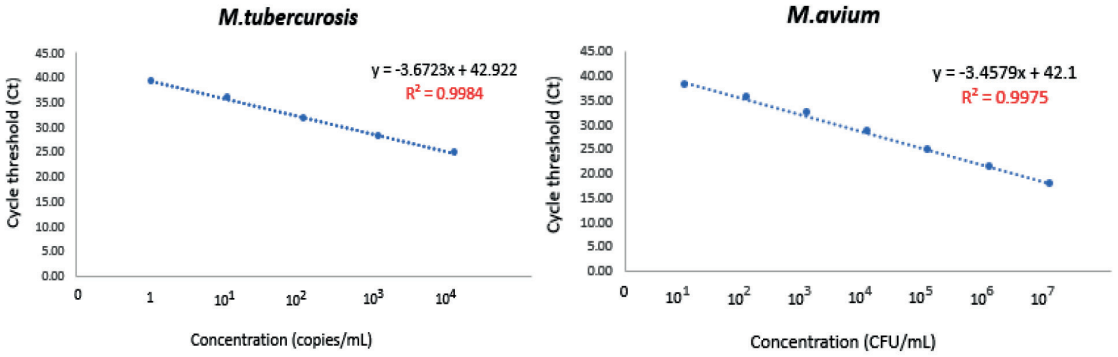
ภาพที่ 1 Amplification plot ของการตรวจ *M. tuberculosis* (MTB), *Mycobacterium* species (PAN) และ RNase P (IC) โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ตารางที่ 4 การทดสอบความจำเพาะของวิธี real-time PCR และ multiplex real- time PCR ที่พัฒนาขึ้น

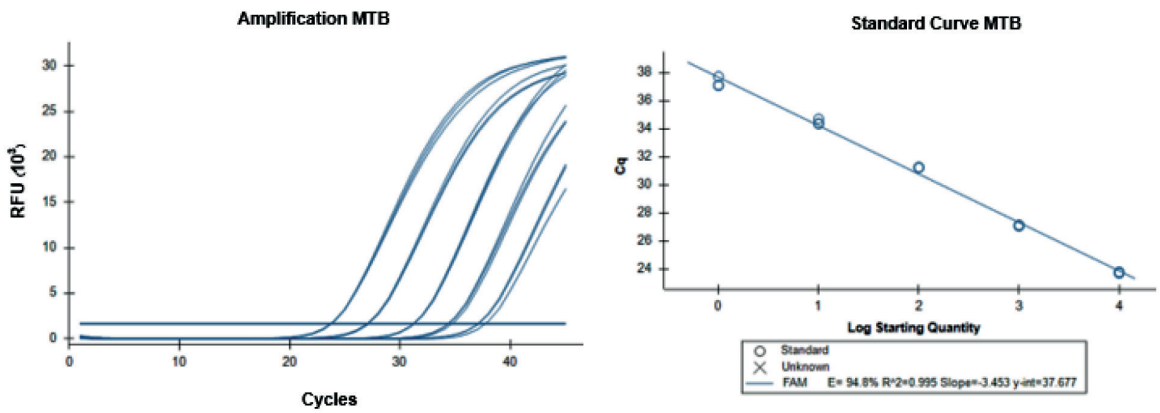
Pathogens	ผลการทดสอบ real-time PCR (จำนวนหลอดที่บวก)		
	Real-time PCR		Multiplex real-time PCR
	MTB primers	PAN primers	
M. tuberculosis MTBC027	3	3	3
M. avium ATCC25291	0	3	3
M. intracellulare ATCC35761	0	3	3
Streptococcus pneumonia ATCC49619	0	0	0
Klebsiella pneumonia ATCC700603	0	0	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	0	0	0
Staphylococcus aureus ATCC29213	0	0	0

กราฟมาตรฐาน (standard curve)

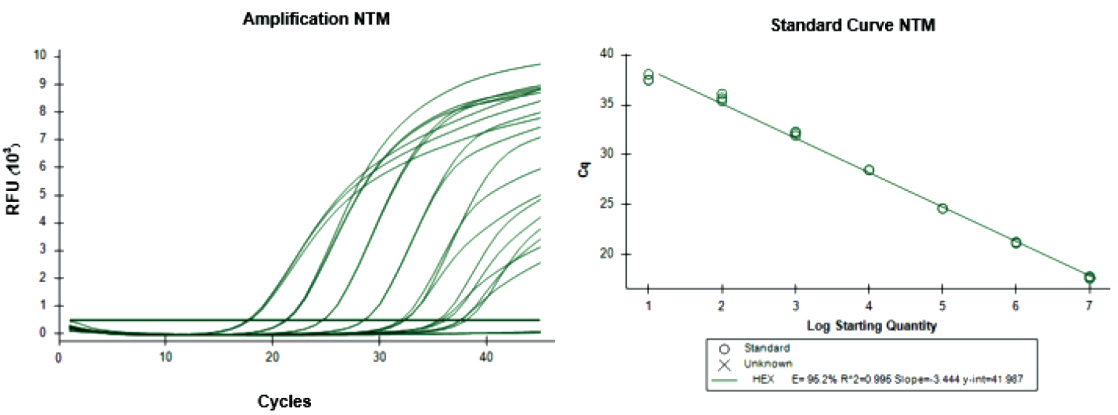
เชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 ความเข้มข้นตั้งแต่ 4×10^4 - 4 copies/mL และ *M. avium* ATCC25291 ความเข้มข้นตั้งแต่ 4×10^7 - 4 CFU/mL โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 2 ค่าประสิทธิ์การตัดสินใจในการตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 และ *M. avium* ATCC25291 โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐาน *M. avium* ATCC25291 โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

ปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD)

การทดสอบวิธีที่พัฒนาขึ้นกับตัวอย่าง DNA ของเชื้อมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4 copies/uL และความเข้มข้นที่เจือจางแบบ 10 เท่า 4 ความเข้มข้น ทดสอบความเข้มข้นละ 20 ซ้ำ โดยใช้ DNA ปริมาตร 3 uL/reaction ผลการทดสอบของ MTB โดยเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 มีค่า LOD เท่ากับ 0.12 copies/reaction และ PAN ทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 และ *M. avium* ATCC25291 มีค่า LOD เท่ากับ 1.2 copies/reaction และ 0.12 CFU/reaction ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทดสอบปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) โดยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น

	Target	Concentration (copies or CFU / reaction)*	Rate positive (Pos/N)	Cycle threshold (Ct)			
				Mean	SD	Min-Max	LOD (95% CI)
MTB	*M. tuberculosis* MTBC027	12	20/20	28.18	0.41	27.80 – 28.91	0.12 copies/reaction
		1.2	20/20	32.19	0.77	31.26 – 33.37	
		0.12	20/20	35.54	0.62	35.02 – 36.52	
		0.012	18/20	37.21	0.69	36.60 – 38.56	
		0.0012	7/20	38.92	0.89	38.17 – 40.12	
PAN	*M. tuberculosis* MTBC027	12	20/20	32.18	0.87	31.29 – 33.79	1.2 copies/reaction
		1.2	20/20	35.90	1.01	34.19 – 37.29	
		0.12	5/20	37.20	0.77	36.51 – 38.50	
		0.012	5/20	38.31	0.93	37.70 – 39.38	
		0.0012	2/20	39.70	0.57	39.30 – 40.10	
	M. avium ATCC25291	12	20/20	26.69	0.48	26.20 – 27.83	0.12 CFU/reaction
		1.2	20/20	29.60	0.41	29.50 – 30.15	
		0.12	20/20	33.81	0.93	33.17 – 35.14	
		0.012	16/20	36.94	0.78	36.56 – 38.36	
		0.0012	7/20	38.57	0.60	38.16 – 39.78	

หมายเหตุ : * หน่วย copies หรือ CFU ใช้ตามที่ผู้ผลิตกำหนด

การประเมินการใช้งานทางคลินิก

ตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากเสมหะผู้ป่วยจำนวน 230 ตัวอย่าง ได้แก่ ผลเพาะเชื้อบวก MTB จำนวน 90 ตัวอย่าง ผลเพาะเชื้อบวก NTM จำนวน 50 ตัวอย่าง และผลเพาะเชื้อลบ จำนวน 90 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยในการตรวจ MTB มีความไว ร้อยละ 88.9 (80/90) ความจำเพาะ ร้อยละ 100.0 (140/140) ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100.0 (80/80) และ ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 93.3 (140/150) ส่วน NTM มีความไว ร้อยละ 84.0 (42/50) ความจำเพาะ ร้อยละ 98.3 (177/180) ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 93.3 (42/45) และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 95.7 (177/185)

ตารางที่ 6 การตรวจตัวอย่าง DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเสมหะด้วยวิธี multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture)

Real-time PCR (in-house)	Culture (Gold standard)			
	Growth			No growth
	MTB	NTM	รวม (ตัวอย่าง)	
positive	80	42	122	3*
negative	10	8	18	87
รวม (ตัวอย่าง)	**90**	**50**	**140**	**90**

หมายเหตุ : *real-time PCR ให้ผล NTM เป็นบวก

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM ด้วยวิธี multiplex real-time PCR นี้ เลือกใช้ตำแหน่งยีน *IS6110* ในการวินิจฉัยเชื้อ MTB เนื่องจากเป็นยีนที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อวัณโรคกลุ่ม MTB เท่านั้น กลุ่มยีน *insert sequence* (*IS*) มีลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ ภายในจีโนมมีขนาดสั้น และมีการเปลี่ยนแปลงต่ำ (conserved gene) จึงนิยมใช้เป็นยีนเป้าหมายการตรวจหาเชื้อวัณโรคในตัวอย่างทางคลินิก[5,9] การตรวจ *Mycobacterium* species ใช้ตำแหน่งยีน *16S rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย เนื่องจากมีจำนวน DNA copies มากและมีลำดับเบสที่สามารถแยกระหว่างเชื้อมัยโคแบคทีเรียกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ[12,13] วิธีการตรวจนี้ยังมีการควบคุมคุณภาพภายใน (internal control; IC) โดยใช้ Endogenous IC housekeeping gene คือ RNase P ทำให้สามารถตรวจสอบคุณภาพการตรวจได้ตั้งแต่ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง การสกัดสารพันธุกรรม การเติมตัวอย่าง จนถึงการทำปฏิกิริยา real-time PCR[10]

การทำ multiplex real-time PCR นอกจากการออกแบบ primer และ probe แล้ว ต้องมีการปรับสภาวะในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม โดยเฉพาะ annealing temperature (Ta) โดยทั่วไปจะมีค่าน้อยกว่า melting temperature (Tm) อยู่ที่ 5°C ในการวิจัยนี้พบว่า Ta ที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 63°C เปรียบเทียบกับการศึกษาของ Kim JU และคณะ[7] และ Rocchetti TT และคณะ[8] โดยใช้ Ta ที่อุณหภูมิ 63°C และ 60°C ตามลำดับ การปรับเปลี่ยน Ta ให้ต่ำกว่าค่า Tm ของ primer มากเกินไป อาจทำให้เกิด non-specific amplification (false positive) ได้ การปรับความเข้มข้นของ primer มีวัตถุประสงค์เพื่อสามารถตรวจเป้าหมายได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด แต่ความเข้มข้นต้องไม่มากเกินไปจนเกิด non-specific amplification ส่วนการปรับความเข้มข้นของ probe เพื่อจะได้ค่า relative fluorescent units (RFUs) โดยไม่มีผลต่อค่า Ct[14] นอกจากนี้การปรับจำนวนรอบการทำปฏิกิริยาและปริมาณ DNA เริ่มต้นที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาก็มีความสำคัญที่ต้องได้รับการปรับให้มีความเหมาะสม

เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ *M. tuberculosis* MTBC027 (MTB) อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized) เมื่อละลายด้วย DNase-RNase free water ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 3.2×10^4 copies/mL เชื้อมาตรฐาน *M. avium* ATCC25291 (bacterial cells) (NTM) อยู่ในรูปผงแห้ง ละลายกับ DNase-RNase free water ได้ความเข้มข้นตั้งต้น 1.1×10^8 CFU/mL เห็นได้ว่าหน่วยวัดความเข้มข้นของเชื้อมาตรฐานตามที่ผู้ผลิตกำหนดนั้นแตกต่างกัน ซึ่งหน่วยความเข้มข้น CFU/mL เป็นการนับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ส่วนหน่วยวัด copy/mL คือ การวัดปริมาณของสารพันธุกรรมของเชื้อ ซึ่งรวมถึงเชื้อที่มีชีวิตและเชื้อที่ตายแล้ว หน่วยดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการนำมาคำนวณปริมาณเชื้อในวิธีการตรวจแบบ real-time PCR มากกว่า ผลการทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน MTB มีค่า LOD เท่ากับ 0.12 copies/reaction และ PAN

ทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน MTB และ NTM มีค่า LOD เท่ากับ 1.2 copies/reaction และ 0.12 CFU/reaction จากการศึกษานี้สามารถหาค่าความไวเชิงวิเคราะห์ที่แท้จริงได้โดยการตรวจวัดปริมาณแบบ digital PCR (dPCR)[15,16]

โดยทั่วไปวิธี real-time PCR มีความไวเชิงวิเคราะห์สูง เช่น การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Lee S และคณะ[17] ได้ประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป EZplex MTBC/NTM Real-Time PCR (Genetree Research Inc., สาธารณรัฐเกาหลี) การตรวจวิเคราะห์ พบค่า LOD ของชุดน้ำยาในการตรวจหาเชื้อ MTB คือ 0.584 copies/μL และ NTM คือ 47.836 copies/μL โดยทดสอบกับ MTB positive control (MTBC034) และ NTM positive control (Vircell Microbiologists, ประเทศสเปน) และการประเมินการใช้งานทางคลินิกจากตัวอย่างเสมหะ (sputum) น้ำล้างหลอดลม (bronchial washing) และตัวอย่างเพาะเชื้อ (culture specimens) รวมทั้งหมด 612 ตัวอย่าง พบค่าความไวและความจำเพาะของ MTB ร้อยละ 98.6 100.0 และ NTM ร้อยละ 98.8 100.0 ตามลำดับ การศึกษาของ Shin S และคณะ[18] ได้ประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำเร็จรูป GENEDIA MTB/NTM multiplex real-time PCR (Green Cross Medical Science Corp., สาธารณรัฐเกาหลี) พบค่า LOD ของชุดน้ำยาในการตรวจหาเชื้อ MTB, *M. avium* และ *M. abscessus* คือ 1 copy/μL, 953 copies/μL และ 27 copies/μL ตามลำดับ การประเมินการใช้งานทางคลินิกจากตัวอย่างเสมหะที่ส่งตรวจ AFB และการเพาะเชื้อ จำนวน 687 ตัวอย่าง พบค่าความไวและความจำเพาะของ MTB ร้อยละ 63.2, 100.0 และ NTM 23.2, 99.7 ตามลำดับ จากการศึกษาคำแนะนำการใช้งาน (instruction for use) ของชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0)[19] (Seegene Inc., สาธารณรัฐเกาหลี) โดยทดสอบกับ genomic DNA ของเชื้อที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10^4-10 copies/reaction พบค่า LOD ของชุดน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ MTB และ NTM คือ 100 copies/reaction กรณีที่ตัวอย่าง MTB มียีนเป้าหมาย *IS6110* อยู่มาก ความไวของชุดน้ำยาอาจสูงถึง 10 copies/reaction

วิธีการตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM ด้วยวิธี multiplex real-time PCR นี้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่ามีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) สูง ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Rocchetti TT และคณะ[8] คือ PAN ร้อยละ 89.7, 100.0, 100.0 และ 84.0 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้องกัน กรณีตรวจพบเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR แต่ตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ อาจเนื่องจากในตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยมีปริมาณของเชื้อวัณโรคที่น้อยมากหรือเชื้อที่ตายแล้ว กรณีที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวและตรวจไม่พบเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น คุณภาพของตัวอย่างเสมหะที่ใช้ทดสอบ ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสกัด DNA ก่อนนำมาทดสอบด้วยวิธี real-time PCR อาจมีสารยับยั้งกระบวนการทำ PCR (PCR inhibitor) การศึกษาก่อนหน้านี้ของ สมศักดิ์ สินธุไร และคณะ[20] สิทธิพจน์ ผลิตกุศลธัช และคณะ[21] ที่พบความไม่สอดคล้องกันของวิธีการตรวจเชื้อวัณโรคด้วยวิธี real-time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการพิสูจน์ข้อเท็จจริงด้านความไม่สอดคล้องกันของผลการตรวจวินิจฉัยนั้น อาจทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมด้วยการเก็บตัวอย่างเสมหะเพื่อตรวจซ้ำ

วิธีการตรวจเชื้อวัณโรคด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลอื่น เช่น Loop-mediated isothermal amplification (TB Lamp) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ *16S rRNA* gene ด้วยอุณหภูมิคงที่ สามารถอ่านผลด้วยตาเปล่าผ่านหลอด ultraviolet light[5] เป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้รวดเร็วและมีความไวเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีย้อม AFB การศึกษาก่อนหน้านี้ของนิรชา ทิมมี[22] พบว่าวิธี Lamp เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ที่ให้ความไวสูงกว่า AFB เปรียบเทียบกับวิธีทางอณูชีวโมเลกุลอย่าง Xpert MTB/RIF วิธี Lamp มีความไวร้อยละ 60.0 (95%CI: 26.2-87.8) ความจำเพาะ ร้อยละ

91.9 (95%CI: 85.3-96.3) ให้ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 40.0 (95%CI: 23.0-59.9) ให้ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 96.3 (95%CI: 92.3-98.2) ขณะที่ AFB มีความไว ร้อยละ 33.3 (95%CI: 7.5-70.1) ความจำเพาะ ร้อยละ 100.0 (95%CI: 96.1-100.0) ให้ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100.0 (95%CI: 29.2-100.0) ให้ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 94.0 (95%CI: 90.7-96.1) วิธี Lamp มีข้อจำกัดในการตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ขณะที่การตรวจด้วยวิธี real-time PCR สามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้

วิธีการตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM ที่พัฒนาขึ้นมีราคาต้นทุนประมาณ 170 บาท/ตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบกับราคาน้ำยาตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM จากการนำเข้าจากต่างประเทศนั้น มีราคาประมาณ 500-600 บาท ต่อ 1 ตัวอย่าง เห็นได้ว่าวิธีการตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM ที่พัฒนาขึ้น มีราคาต้นทุนถูกกว่าการนำเข้าน้ำยาจากต่างประเทศมาก แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องไม่สามารถตรวจหาวัณโรคดื้อยา ขณะที่น้ำยาสำเร็จรูปนำเข้าจากต่างประเทศที่ตรวจเชื้อวัณโรคชนิด MTB/NTM และเชื้อวัณโรคดื้อยา MTB/MDR หรือ MTB/XDR ได้ จึงควรมีการพัฒนาต่อยอดวิธีการตรวจเชื้อวัณโรคนี้ให้สามารถตรวจการดื้อยาได้ต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคชนิด MTB/NTM โดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR เมื่อทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* MTBC027 (MTB) มีความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจจับได้ 0.12 copies/reaction และเมื่อทดสอบกับเชื้อมาตรฐาน *M. avium* ATCC25291 (NTM) โดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเมื่อทดสอบกับกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ การประเมินการใช้งานทางคลินิกเทียบวิธีการเพาะเชื้อมีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ สำหรับ MTB ร้อยละ 88.9, 100.0, 100.0 และ 93.3 สำหรับ NTM ร้อยละ 84.0, 98.3, 93.3 และ 95.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้น (in-house method) มาใช้เพิ่มศักยภาพการตรวจคัดกรอง เพื่อค้นหาผู้ติดเชื้อวัณโรคให้ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น ลดการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคสู่ชุมชน ส่งเสริมการยุติวัณโรคได้อย่างยั่งยืน และสามารถนำไปต่อยอดใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของโรงพยาบาลได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวอมรรัตน์ ทัศนกิจ ผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก ดร.นวลจันทร์ วิจักษณ์จินดา ผู้ทรงคุณวุฒิด้านวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ภูมิคุ้มกันวิทยา) สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ นายชวลิต เกียรติวิชชุกุล ข้าราชการบำนาญ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 2 พิษณุโลก เจ้าหน้าที่ฝ่ายมัยโคแบคทีเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เจ้าหน้าที่โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป ในเขตสุขภาพที่ 2 เจ้าหน้าที่องค์การระหว่างประเทศเพื่อการโยกย้ายถิ่นฐาน (International Organization for Migration; IOM) อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิกและเทคนิคการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินโครงการ

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. [online]. 2022; [cited 2023 Dec 10]; [68 screens]. Available from: URL: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363752/9789240061729-eng.pdf?sequence=1.
2. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค ระยะที่ 2 (พ.ศ.2566-2570). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2566.
3. Pennington KM, Vu A, Challener D, Rivera CG, Shweta FNU, Zeuli JD, et al. Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease.

J Clin Tuberc Other Mycobact Dis 2021; 24: 100244. (16 pages).

4. เพลินจันทร์ เชษฐ์โชติศักดิ์. การประชุมใหญ่วิชาการประจำปี ครั้งที่ 48 ภายใต้หัวข้อ Moving forward beyond a pandemic. Management of difficult-to-treat NTM infection. วันที่ 13–16 ตุลาคม 2565. กรุงเทพฯ: สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย; 2565.
5. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ.2564 National tuberculosis control program guidelines, Thailand, 2021. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2564.
6. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางบริหารจัดการและการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการด้านวัณโรค Management and practice guideline for tuberculosis laboratory. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2562.
7. Kim JU, Cha CH, An HK. Direct identification of mycobacteria from clinical specimen by multiplex real-time PCR. J Appl Microbiol 2015; 118: 1498-1506.
8. Rocchetti TT, Silbert S, Gostnell A, Kubasek C, Widen R. Validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium tuberculosis* complex, and *Mycobacterium avium* complex directly from clinical samples by use of the BD max open system. J Clin Microbiol 2016; 54(6): 1644-7.
9. Singh HB, Singh P, Jadaun GP, Srivastava K, Sharma VD, Chauhan DS, et al. Simultaneous use of two PCR systems targeting IS6110 and MPB6 4 for confirmation of diagnosis of tuberculous lymphadenitis. J Commun Dis 2006; 38(3): 274-9.
10. Boddicker JD, Rota PA, Kreman T, Wangeman A, Lowe L, Hummel KB, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for detection of mumps virus RNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2902–8.
11. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. หลักเกณฑ์การคัดเลือกและประเมินชุดทดสอบและน้ำยาทางห้องปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์. [ออนไลน์]. 2561; [สืบค้น 15 ม.ค. 2566]; [14 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL:https://www.plandmsc.com/images/Download/DMSc2018/หลักเกณฑ์การประเมินชุดทดสอบและน้ำยาฉบับอนุมัติ_12_มย_2561.pdf.
12. Choi Y, Hong SR, Jeon BY, Wang HY, Lee GS, Cho SN, et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Int J Tuberc Lung Dis 2015; 19(9): 1102-8.
13. Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, Kabani A. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3637-48.
14. Standish I, Leis E, Schmitz N, Credico J, Erickson S, Bailey J, et al. Optimizing, validating, and field testing a multiplex qPCR for the detection of amphibian pathogens. Dis Aquat Organ 2018; 129(1): 1-13.
15. Pecoraro S, Berben G, Burns M, Corbisier P, De GM, De LM, et al. Overview and recommendations for the application of digital PCR. [online]. 2019; [cited 2024 Oct 31]; [60 screens]. Available from: URL: https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/WG-dPCR-Report.pdf.

16. Bio-rad Laboratories. Introduction to digital PCR. [online]. 2024; [cited 2024 Oct 31]; [1 screen]. Available from: URL: https://www.bio-rad.com/en-th/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr?ID=MDV300E8Z.
17. Lee S, Hwang KA, Ahn JH, Nam JH. Evaluation of EZplex MTBC/NTM Real-Time PCR kit: diagnostic accuracy and efficacy in vaccination. Clin Exp Vaccine Res 2018; 7(2): 111–8.
18. Shin S, Yoo IY, Shim HJ, Kang OK, Jhun BW, Koh WJ, et al. Diagnostic performance of the GENEDIA MTB/NTM Detection Kit for detecting *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria with sputum specimens. Ann Lab Med 2020; 40(2): 169–73.
19. Seegene Inc. Anyplex™ MTB/NTM Real-time Detection (V2.0). [online]. 2021; [cited 2024 Oct 31]; [55 screens]. Available from: URL: https://medista.cz/docs/Molekul%C3%A1rn%C3%AD%20diagnostika/Manu%C3%A1ly/MTB/Anyplex%20MTB_NTM_Detection/Anyplex%20MTB_NTM%20Real-time%20Detection%20(v2.0)_TB7200X_IFU_ENG.pdf.
20. สมศักดิ์ สินธุอุไร, กัญณภัทร เกษรสุคนธ์, ปัทมา กล่อมพร, ธนกร โพธิ์วงศ์, รัชณีพร คำมินทร์, สุวรรณี กีรติวาสี. การตรวจวินิจฉัยและการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Anyplex™ Real-time PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเชื้อ. ว เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(2): 218-26.
21. สิทธิพจน์ ผลิตกุศลธัช, สุมาลี สังฆพร. ศึกษาประสิทธิภาพการตรวจด้วยวิธี Real-time PCR เทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ที่โรงพยาบาลนครปฐม. ว หัวหินสุขใจไกลกังวล 2562; 4(3): 50-9.
22. นิรชา ทิมมี. เปรียบเทียบประสิทธิผลของการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธี AFB และ LAMP ในการตรวจคัดกรองผู้ป่วยวัณโรค โรงพยาบาลศรีสังวร สุโขทัย. ว นวัตกรรมทางการแพทย์และการวิจัยสาธารณสุข 2566; 1-17.

Development of *Mycobacterium tuberculosis* Diagnosis by Multiplex Real-time PCR

Wilawan Kantasorn, Natcha Panachamnong, Bundit Promraksa, and Dujdao Boonyod
Regional Medical Sciences Center 2 Phitsanulok, Muang District, Phitsanulok 65000, Thailand

Abstract Tuberculosis is a major public health concern in Thailand, primarily caused by bacteria in the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), of which *M. tuberculosis* (MTB) is the most common. Non-tuberculous mycobacteria (NTM) often cause opportunistic infections, and distinguishing between these two groups of bacteria is critical for planning effective patient treatment. Real-time PCR is a diagnostic method that provides rapid, sensitive, and specific results, and can be processed for large numbers of samples. In this study, a multiplex real-time PCR method for detecting MTB/NTM, using primers and a probe specific to the *IS6110* gene for MTC was developed, which could detect the standard MTB strain at a minimum concentration of 0.12 copies/reaction. Additionally, primers and a probe specific to the *16S rRNA* gene for *Mycobacterium* species (PAN) were tested on standard strains of MTB and NTM, resulting in detection limits of 1.2 copies/reaction and 0.12 CFU/reaction, respectively. Evaluation of this developed method showed no cross-reactivity with other respiratory pathogens. In comparison with the gold standard culture method on 230 sputum samples, of which 90 were MTB-positive and 50 were NTM-positive, the developed method detected 80 MTB-positive and 42 NTM-positive samples. Among 90 culture-negative samples, the developed method provided negative results for both MTB and NTM in 90 and 87 samples, respectively. Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value for MTB were 88.9%, 100.0%, 100.0%, and 93.3%, respectively, and for NTM were 84.0%, 98.3%, 93.3%, and 95.7%, respectively. This newly developed method is efficient for routine diagnostics, offering high sensitivity and specificity while reducing costs associated with importing reagents. It strengthens tuberculosis screening capabilities and supports the sustainable goal of ending tuberculosis in Thailand.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Non-tuberculous mycobacteria, Multiplex real-time PCR