

การตรวจ NAT2-diplootyping ด้วยวิธี Real-time PCR

ทิพย์รัตน์ โพธิพิทักษ์¹ นวลจันทร์ วิจักขณ์จินดา² ปติดา ประครองทรัพย์¹ วิมาลา อินอุ่นโชติ¹
สุริศเมธ มหาศิริมงคล³ และ สุกัญญา วัฒนาโกคยกิจ¹

¹สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

²สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

³สำนักโครงการพระราชดำริ โครงการเฉลิมพระเกียรติ และกิจกรรมพิเศษ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ เอนไซม์ N-acetyltransferase 2 (NAT2) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อย Isoniazid ซึ่งเป็นยารักษาวัณโรค ผู้ที่มียีน NAT2 ที่มีการย่อยยาช้า (slow acetylator) มีโอกาสเกิดภาวะตับอักเสบจากการใช้ยาวัณโรคสูงกว่าผู้ที่มียีน NAT2 ในอัตราปกติ (intermediate acetylator) และย่อยยาเร็ว (rapid acetylator) ถึง 8.8 เท่า โดยความสามารถในการย่อยยาของยีน NAT2 นี้สามารถแปลผลได้จากการตรวจ NAT2-diplootyping และแพทย์สามารถใช้ผลเพื่อพิจารณาปรับขนาดยา Isoniazid การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ NAT2-diplootyping จากวิธี PCR ที่เปิดให้บริการอยู่เป็นวิธี Real-time PCR คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะเหมาะสมในการทำปฏิกิริยา (optimization) ได้แก่ ความเข้มข้นไพรเมอร์และไพรเมอร์ อุณหภูมิ และเวลาการทำปฏิกิริยา โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผล NAT2-diplootyping จากการทำ phase analysis จนได้วิธีการที่มีช่วงการตรวจดีเอ็นเอ (detection range) เท่ากับ 5–150 ng/μL ผลการเปรียบเทียบกับวิธี PCR โดยตรวจตัวอย่าง จำนวน 138 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรวจชนิดของ NAT2 haplotypes ในตัวอย่างทั้งหมด สอดคล้องกันร้อยละ 100 ดังนั้นการตรวจ NAT2-diplootyping ด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้ทดแทนการตรวจด้วยวิธี PCR ได้ ทำให้ได้ผลการตรวจที่รวดเร็ว และสะดวกกับผู้ปฏิบัติงานมากขึ้น

คำสำคัญ: NAT2-diplootyping, ไอโซไนอาซิด, Real-time PCR, PCR, Acetylator

Corresponding author E-mail: tiparat.p@dmsc.mail.go.th

Received: 20 February 2026

Revised: 16 June 2026

Accepted: 22 June 2026

บทนำ

วัณโรคยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก⁽¹⁾ โดยยาไอโซไนอาซิด (Isoniazid: INH) ซึ่งเป็นยาหลักในการรักษาวัณโรค มีการเมแทบอลิซึมผ่านเอนไซม์ N-acetyltransferase 2 (NAT2) ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีความถี่แตกต่างกันในแต่ละประชากร⁽¹⁾ ความแปรผันทางพันธุกรรมของ NAT2 ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความสามารถในการกำจัดยาแตกต่างกัน โดยแบ่งเป็นกลุ่มกำจัดยาช้า (slow acetylator: SA) กลุ่มกำจัดปานกลาง (intermediate acetylator: IA) และกลุ่มกำจัดยาเร็ว (rapid acetylator: RA)⁽²⁾ ผู้ป่วยกลุ่ม SA มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดภาวะตับอักเสบจากการใช้ยา (anti-tuberculosis drug-induced liver injury: AT-DILI) ขณะที่กลุ่ม RA อาจเสี่ยงต่อความล้มเหลวในการรักษาเนื่องจากระดับยาในเลือดไม่เพียงพอ^(3,4) ดังนั้นการตรวจหา NAT2-diplootype เพื่อใช้ประกอบการปรับขนาดยาแบบจำเพาะบุคคล (personalized medicine)⁽⁴⁾ จึงมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิผลของการรักษาและลดอาการไม่พึงประสงค์⁽⁵⁾

ในปัจจุบันการตรวจจีโนไทป์ NAT2 มักใช้วิธีการทำนาย haplotype จากข้อมูล SNP ด้วยวิธีการทางสถิติ (indirect method) หรือใช้วิธีการหาลำดับเบส (sequencing) มีต้นทุนสูงและขั้นตอนซับซ้อนและต้องใช้ software ในการแยก haplotype ให้เป็น 2 ชุด⁽⁶⁾ ก่อนหน้านี้ Wichukchinda N และคณะ ได้พัฒนาวิธี Haplotype-specific PCR (HS-PCR) ซึ่งสามารถระบุ NAT2-diplootype ได้โดยตรงโดยไม่ต้องอาศัยการทำนายทางสถิติและให้ความแม่นยำสูงถึง 99.23% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี sequencing⁽⁷⁾ วิธีดังกล่าวต้องอาศัยการวิเคราะห์ผลด้วย gel electrophoresis ซึ่งเป็นขั้นตอนหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (post-PCR processing) ที่ใช้เวลานานต้องใช้แรงงานและมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) จากการเปิดหลอดปฏิกิริยาอาจเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ในงานประจำทางคลินิกที่ต้องการความรวดเร็วและรองรับตัวอย่างจำนวนมาก⁽⁸⁾

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและต่อยอดวิธีตรวจ NAT2-diplootype จากระบบดั้งเดิมไปสู่วิธีตรวจ Real-time PCR โดยอาศัยชุด primer ของ Haplotype-specific PCR ที่ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค Real-time PCR ช่วยให้อ่านผลได้ทันทีผ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) โดยไม่ต้องใช้ gel electrophoresis ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจ ลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน และลดระยะเวลาในการรายงานผล (turnaround time)⁽⁹⁾ เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจชีวโมเลกุลทางเภสัชพันธุศาสตร์ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁰⁾

วัสดุและวิธีการ

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ (Probe-primer design)

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ (Bio Basic, Canada) อ้างอิงจากลำดับเบสของยีน NAT2 (NG_012246.1) บนโครโมโซมคู่ที่ 8 โดยเน้นตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ใน exon 2 ที่สำคัญ ได้แก่ ตำแหน่ง 282, 341, 481, 590, 803 และ 857 ซึ่งครอบคลุม haplotype หลักที่พบเป็นส่วนใหญ่ในประชากรไทย และมีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, และ *13A โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Wichukchinda N และคณะ⁽⁷⁾ และได้รับสิทธิบัตรเลขที่ 92597⁽¹¹⁾ ซึ่งใช้หลักการ Haplotype-specific PCR (HS-PCR) โดยออกแบบให้เบสตัวสุดท้ายที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง SNP ของแต่ละ haplotype เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเฉพาะเมื่อพบ haplotype เป้าหมายเท่านั้น และเพื่อให้สามารถตรวจสอบผลได้ในระบบ Real-time PCR คณะผู้วิจัยได้ออกแบบโพรบชนิด TaqMan (hydrolysis probe) เพิ่มเติม โดยพิจารณาตำแหน่งการจับของโพรบ (probe binding site) ให้สอดคล้องกับบริเวณที่เกิด

ผลิตภัณฑ์ PCR (amplicon) จากคู่ไพรเมอร์จำเพาะแต่ละคู่ โดยแบ่งการออกแบบเป็น 2 ส่วน เพื่อให้ครอบคลุมทุก haplotype ดังนี้

ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ออกแบบให้จับบริเวณรอยต่อระหว่าง SNP 282 และ 341 เพื่อใช้ตรวจจับผลิตภัณฑ์ PCR ของกลุ่ม haplotype *NAT2*4* และ *NAT2*13A*

ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ออกแบบให้จับบริเวณใกล้เคียง SNP 481 เพื่อใช้ตรวจจับผลิตภัณฑ์ PCR ของกลุ่ม

haplotype *NAT2*5B*, *NAT2*6A*, *NAT2*7B* และ *NAT2*12A*

ไพรเมอร์ทั้งสองชนิดถูกติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ FAM เพื่อให้สามารถอ่านสัญญาณได้ในช่องสัญญาณเดียวกันเมื่อเกิดปฏิกิริยาจำเพาะในแต่ละหลอดทดลอง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยนี้อยู่ระหว่างยื่นขออนุสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 2503001353 รายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์และไพรบ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับเบสของไพรเมอร์และไพรบสำหรับ *NAT2* haplotype และ internal control

Target Haplotype	Primer/probe Name	Sequence (5' to 3')
<i>NAT2*4</i>	4F-282C 4R-803A	ggT TTT CAg ACC ACA ATg TTA ggA ggg TAT TTT gAC gg CAC gAg ATT TCT CCC CAA ggA AAT CTT AAA TAT ATg TT
<i>NAT2*5B</i>	5F-341C 5R-857g	CAT ggT TCA CCT TCT CCT gCA ggT gAC AAC TTT ATT TTg TTC CTT ATT CTA AAT AgT AAg ggC TC
<i>NAT2*6A</i>	6F-341T 6R-590A	ACC TTC TCC TgC Agg TgA CAA T TTC ATA gAC TCA AAA TCT TCA ATT ggT T
<i>NAT2*7B</i>	7F-481C 7R-857A	TT gAC AgA AgA gAg Agg AAT CTg gTC CC TTT ATT TTg TTC CTT ATT CTA AAT AgT AAg ggC TT
<i>NAT2*12A</i>	12F-481C 12R-803g	gAC AgA AgA gAg Agg AAT CTg gTC CC CAC gAg ATT TCT CCC CAA ggA AAT CTT AAA TAT ATg TC
<i>NAT2*13A-1</i> (หลอดที่ 1)	13F-282T 13R1-590g	AgA CCA CAA TgT TA gAg ggT ATT TTg AT TTC ATA gAC TCA AAA TCT TCA ATT ggT C
<i>NAT2*13A-2</i> (หลอดที่ 2)	13F-282T 13R2-857g	AgA CCA CAA TgT TA gAg ggT ATT TTg AT ggTT TAT TTT gTT CCT TAT TCT AAA TA gTAA ggg CTC
internal control	RT- <i>TIMP1</i> -Fw RT- <i>TIMP1</i> -Rv	gCC ATg gAg AgT gTC TgC ggA TAC TT ggT gCC TCA CCA gCA ATg AgA AA
real-time probe	<i>NAT2</i> Fw1 p-FAM <i>NAT2</i> Fw2 p-FAM	ACC AAA TCA ggA gAg AgC AgT ATA TTA CAA ACA AAT ACA gCA CTg gCA Tgg TTC AC
internal control probe	<i>TIMP1</i> p-CY5	ACA ggT CCC ACA ACC gCA gCg A

ตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ ตัวอย่างสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอที่เหลือจากการวิเคราะห์ ได้แก่ ตัวอย่างจากโครงการสำรวจสุขภาพประชากรไทยครั้งที่ 3 (Third Thailand National Health Examination Survey Program) ซึ่งเป็นตัวอย่างของคนทั่วไป และตัวอย่างผู้ป่วยวัณโรคที่เหลือจากงานบริการตรวจวิเคราะห์ NAT2-diplootypes ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (leftover DNA sample) ในช่วงปี พ.ศ. 2559–2564

ตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวสกัดมาจากตัวอย่างเลือด EDTA ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ด้วยชุดสกัด QuickGene DNA whole blood kit S (Kurabo, Japan) โดยใช้เครื่องสกัดกึ่งอัตโนมัติ (รุ่น QuickGene-Mini80, Kurabo, Japan) ตามขั้นตอนมาตรฐานที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณสารพันธุกรรมด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers, Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนนำไปปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Haier Biomedical, Qingdao Haier Biomedical, China)

การหาค่าเหมาะสมของปฏิกิริยา (Optimization)

ดำเนินการหาค่าเหมาะสมของสภาวะต่างๆ ในปฏิกิริยา Real-time PCR ดังนี้

การหาค่าเหมาะสมของสภาวะปฏิกิริยา PCR (PCR condition optimization)

ทดสอบช่วงอุณหภูมิในการเกาะของไพรเมอร์ (annealing temperature) เพื่อให้ไพรเมอร์มีความจำเพาะต่ออัลลีสสูงที่สุดและลดการเกิดปฏิกิริยาข้าม และทดสอบระยะเวลาในขั้นตอน annealing/extension เพื่อให้เหมาะสมกับ PCR product ที่มีความยาวต่างกันในแต่ละหลอด และสามารถดำเนินปฏิกิริยาพร้อมกันทั้ง 7 หลอด ภายใต้สภาวะเดียวกันได้

สภาวะการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย ขั้นตอน initial denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที (จำนวน 1 รอบ) ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 20 วินาที และขั้นตอน annealing/extension โดยทำ

gradient ที่อุณหภูมิ 58.0–68.0°C นาน 60–80 วินาที จำนวน 35 รอบ โดยใช้น้ำยา KAPA PROBE FAST qPCR master mix (2×) (Kapa Biosystems, Cape Town, South Africa) เครื่อง Real-time PCR (รุ่น Bio-RAD CFX Opus 96 System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

การหาค่าเหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบ (primer and probe optimization)

หาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไพรเมอร์และโพรบของปฏิกิริยา (probe/primer condition) เริ่มจากความเข้มข้นของไพรเมอร์คู่หน้า-คู่หลัง (forward-reverse primer) ที่ 10 μ M และโพรบที่ 4 μ M สำหรับแต่ละ haplotype รวมถึงไพรเมอร์และโพรบสำหรับ TIMP1 ซึ่งใช้เป็น internal control จากนั้นปรับความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบให้เหมาะสมสำหรับแต่ละ haplotype เพื่อให้ค่าสัญญาณเรืองแสง (relative fluorescence units: RFU) และค่า cycle threshold (Ct) ของทุกเป้าหมายมีความสอดคล้องกันและสามารถแยกจากสัญญาณรบกวน (background noise) ได้ชัดเจน

สำหรับยีน TIMP1 ทำการปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้ไปแย่งสารปฏิกิริยา (competition) กับยีนเป้าหมายหลัก แต่ยังสามารถให้สัญญาณที่เสถียรเพื่อยืนยันคุณภาพการทดสอบได้

การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation)

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบผล NAT2-diplootype มาทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ด้วยบัฟเฟอร์ TE (low EDTA) (AppliChem, Germany) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นรวม 10 ระดับ ได้แก่ 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5, 0.75 และ 0.375 ng/ μ L ทำการทดสอบแต่ละความเข้มข้นจำนวน 2 ซ้ำ (duplicate) และหาค่าเฉลี่ยจากทั้ง 2 ค่า

การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเตรียมปฏิกิริยา 7 หลอดต่อตัวอย่าง ในทุกปฏิกิริยา ปริมาตร 12 ไมโครลิตร

ประกอบด้วย 1X ready mix reagent (KAPA PROBE FAST qPCR master mix (2×), KAPA Biosystems, Cape Town, South Africa) ไพรเมอร์จำเพาะต่อ NAT2 ที่ 10–25 μM, โพรบที่จำเพาะต่อยีน NAT2 ที่ 6 μM, ยีนควบคุมคุณภาพภายใน (Internal control) ไพรเมอร์ของยีน TIMP1 ที่ 10 μM, โพรบที่จำเพาะต่อยีน TIMP1 ที่ 4 μM และ 10–50 ng ของดีเอ็นเอตัวอย่าง สภาวะการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย ขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยทำปฏิกิริยา ที่ 95°C นาน 20 วินาที และ 64.5°C นาน 80 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นอ่านค่าสัญญาณของยีน NAT2 แต่ละ haplotype คู่ควบกับยีน TIMP1

การตรวจสอบทางคลินิก (Clinical validation)

ดำเนินการทดสอบความแม่นยำกับตัวอย่างดีเอ็นเอ จำนวน 138 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างจากโครงการสำรวจสุขภาพประชากรไทยครั้งที่ 3 จำนวน 125 ตัวอย่าง และตัวอย่างผู้ป่วยโรคที่เลื้อจากงานบริการตรวจวิเคราะห์ NAT2-diplotype ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 13 ตัวอย่าง ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์และทราบผล NAT2-diplotype แล้วด้วยวิธี PCR และ sequencing ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาตรวจวิเคราะห์เพื่อระบุ NAT2-diplotype ด้วยวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นในสภาวะที่เหมาะสม

เกณฑ์การตัดสินและการแปลผล (Interpretation criteria)

กำหนดเกณฑ์ค่าจุดตัด (cut-off value) สำหรับการอ่านผลที่สมบูรณ์ คือ ค่า Ct ของยีน TIMP1 ในทุกหลอดต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 25 และผลบวกของ NAT2 haplotype เป้าหมาย มีค่า Ct น้อยกว่า 30 กรณีที่ค่า Ct อยู่ระหว่าง 30–35 หรือตรวจไม่พบสัญญาณ (not detected) จะพิจารณาว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่นอกช่วงการตรวจวัดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ (out of quantifiable/acceptable range)

ยีน NAT2 ถูกแบ่งกลุ่มตามการทำงานของเอนไซม์ออกเป็น 2 แบบหลัก คือ fast acetylator haplotype ได้แก่ NAT2*4, NAT2*12A, NAT2*13A และ slow acetylator haplotype ได้แก่ NAT2*5B, NAT2*6A, NAT2*7B เนื่องจากการแสดงออกของยีนในแต่ละบุคคล ประกอบด้วย 2 haplotypes (diplotypes) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ co-dominant การแปลผลฟีโนไทป์การย่อยสลายยา (acetylators phenotypes) จึงจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (rapid acetylators: RAs) กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (intermediate acetylators: IAs) และกลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (slow acetylators: SAs) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางการแปลผลฟีโนไทป์การย่อยสลายยา

กลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (RAs)	กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (IAs)	กลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (SAs)
NAT2*4/*4	NAT2*4/*5B	NAT2*5B/*5B
NAT2*4/*12A	NAT2*4/*6A	NAT2*5B/*6A
NAT2*4/*13A	NAT2*4/*7B	NAT2*5B/*7B
NAT2*12A/*12A	NAT2*5B/*12A	NAT2*6A/*6A
NAT2*12A/*13A	NAT2*5B/*13A	NAT2*6A/*7B
NAT2*13A/*13A	NAT2*6A/*12A	NAT2*7B/*7B
	NAT2*6A/*13A	
	NAT2*7B/*12A	
	NAT2*7B/*13A	

จริยธรรมการวิจัย

การใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอ ได้รับการรับรองจาก คณะกรรมการการศึกษาวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ รหัสโครงการวิจัย 10/2565 ลงวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2565

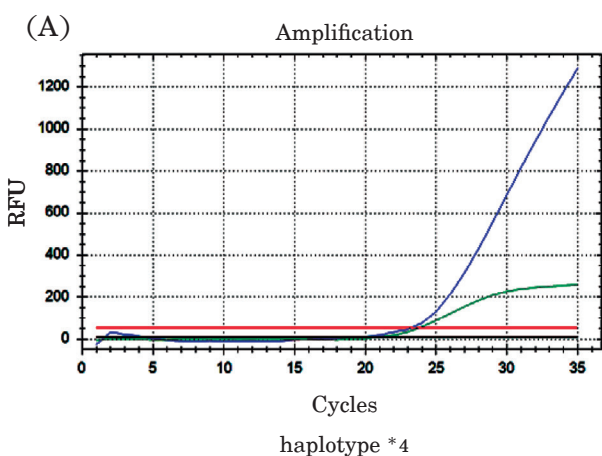
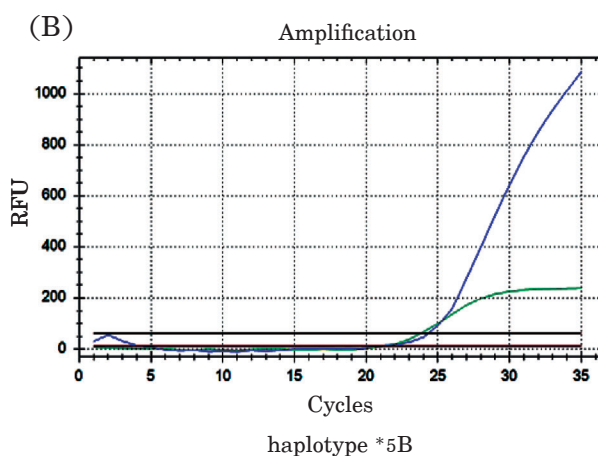
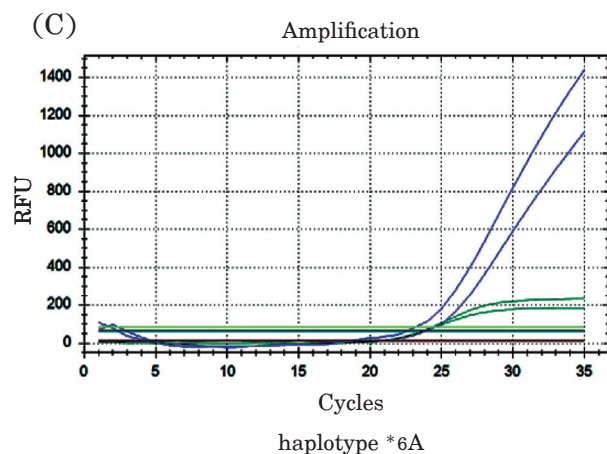
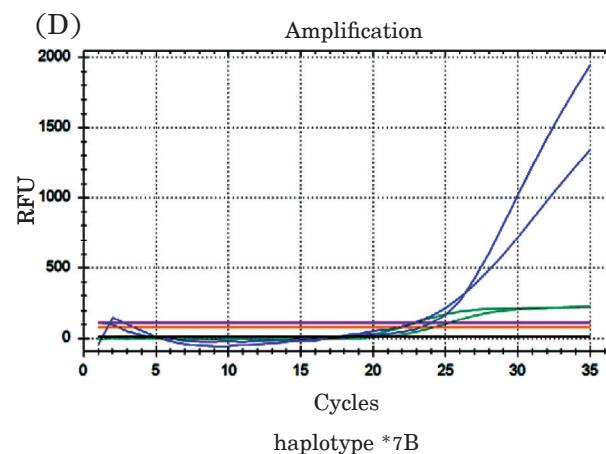
ผล

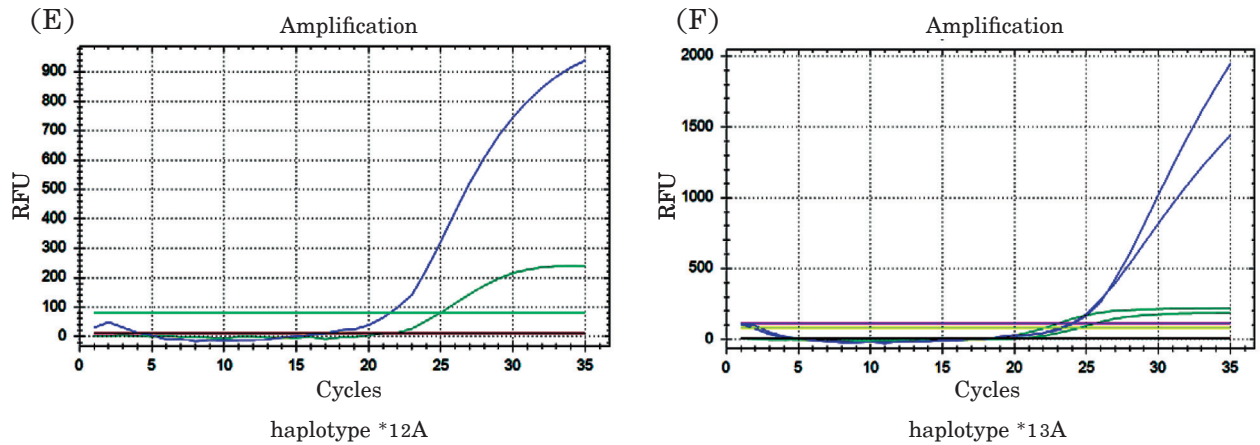
การหาค่าเหมาะสมของปฏิกิริยา (Optimization results)

จากการออกแบบและหาค่าสภาวะที่เหมาะสม สำหรับชุดไพรเมอร์และโพรบที่จำเพาะต่อ NAT2 haplotype ทั้ง 6 รูปแบบ 7 ปฏิกิริยา ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, *13A-1 และ *13A-2 พบว่าสามารถ

ดำเนินปฏิกิริยา Real-time PCR พร้อมกันได้ภายใต้ สภาวะเดียวกัน โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย ขั้นตอน Denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C นาน 20 วินาที และขั้นตอน annealing/extension ที่ 64.5°C นาน 80 วินาที จำนวน 35 รอบ

กราฟ amplification plot แสดงสัญญาณการ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย NAT2 (สีน้ำเงิน) และยีนควบคุมคุณภาพ TIMP1 (สีเขียว) ที่มีความชัดเจนและแยกออกจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (background noise) ได้อย่างเด่นชัด ภายใต้ความเข้มข้น และปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบที่ผ่านการปรับให้ เหมาะสมแล้ว ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 3





ภาพที่ 1 (A)-(F) กราฟแสดง amplification plot ของผลบวกในแต่ละ haplotype ที่แสดงถึงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *NAT2* (ยีนเป้าหมาย, สีน้ำเงิน) และยีน *TIMP1* (ยีนควบคุมคุณภาพ, สีเขียว) ด้วยความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 โดยใช้ PCR condition ดังนี้ [95°C นาน 3 นาที] × 1 รอบ [95°C นาน 20 วินาที 64.5°C นาน 80 วินาที] × 35 รอบ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นและปริมาตรของไพรเมอร์และโพรบแต่ละคู่ของ *NAT2*-*4, *NAT2*-*5B, *NAT2*-*6A, *NAT2*-*7B, *NAT2*-*12A, *NAT2*-*13A-1 และ *NAT2*-*13A-2 ต่อ 1 ปฏิบัติการ

primer/probe name	*4 (μL)	*5B (μL)	*6A (μL)	*7B (μL)	*12 (μL)	*13A-1 (μL)	*13A-2 (μL)
10 μM RT- <i>TIMP1</i> Fw	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
10 μM RT- <i>TIMP1</i> Rv	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
10 μM <i>NAT2</i> -4 Fw	0.40						
10 μM <i>NAT2</i> -4 Rv	0.40						
10 μM <i>NAT2</i> -5B Fw		0.35					
10 μM <i>NAT2</i> -5B Rv		0.35					
10 μM <i>NAT2</i> -6A Fw			0.50				
10 μM <i>NAT2</i> -6A Rv			0.50				
25 μM <i>NAT2</i> -7B Fw				0.55			
25 μM <i>NAT2</i> -7B Rv				0.55			
10 μM <i>NAT2</i> -12A Fw					0.30		
10 μM <i>NAT2</i> -12A Rv					0.30		
25 μM <i>NAT2</i> -13A Fw						0.40	
25 μM <i>NAT2</i> -13A-1 Rv						0.40	
10 μM <i>NAT2</i> -13A Fw							0.60
10 μM <i>NAT2</i> -13A-2 Rv							0.60
6 μM FAM <i>NAT2</i> Fw1		0.20	0.35	0.45	0.20		
6 μM FAM <i>NAT2</i> Fw2	0.30					0.40	0.35
4 μM Cy5 <i>TIMP1</i> -P	0.08	0.08	0.10	0.10	0.08	0.08	0.10

ช่วงการตรวจจับและความไวเชิงวิเคราะห์ (Range of detection and sensitivity)

ผลการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอในช่วง 0.375–200 ng/ μ L จำนวน 10 ระดับความเข้มข้น พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบสัญญาณได้ในทุกระดับความเข้มข้น เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์การอ่านผล (C_t cut-off < 30) พบว่ามี 7 ระดับความเข้มข้น ในช่วง 3.125 – 200 ng/ μ L ที่ให้ผลบวกที่สมบูรณ์ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำ 0.375–1.5 ng/ μ L แม้จะปรากฏสัญญาณเรืองแสง แต่มีค่า C_t > 30 จึงแปลผลเป็นลบตามเกณฑ์ที่กำหนด

สำหรับ haplotype *4 และ *6A ที่ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ng/ μ L ซึ่งอาจเกิดจากผลของความเข้มข้นดีเอ็นเอที่สูงเกินไปต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยา (PCR inhibition) ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมในระดับความเข้มข้น 5, 125 และ 150 ng/ μ L เพื่อระบุช่วงการทำงานที่ให้ผลน่าเชื่อถือสูงสุด (working range) ผลพบว่าสามารถตรวจพบยีนเป้าหมาย NAT2 ได้ครบทุก haplotypes ผู้วิจัยจึงกำหนดช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ที่อยู่ในช่วง 5–150 ng/ μ L

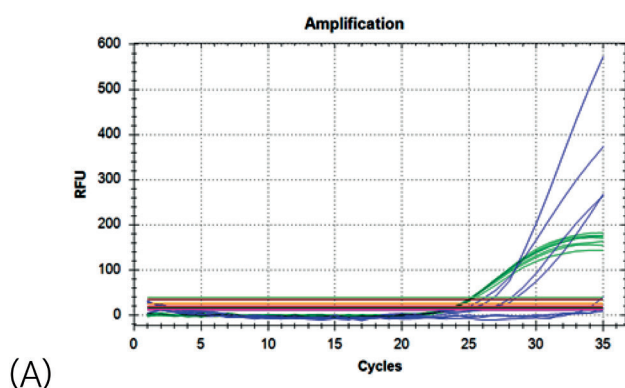
การตรวจ NAT2-diplootypes ด้วยวิธี Real-time PCR

ผลการตรวจ NAT2-diplotype ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและแสดงสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ กราฟแสดงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplifica-

tion plot) ยืนยันถึงความจำเพาะของปฏิกิริยา โดยเส้นกราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของสัญญาณแบบทวีคูณ (exponential phase) ที่ชัดเจนและแยกออกจากสัญญาณรบกวนพื้นฐาน (background noise) ได้อย่างเด่นชัด ดังแสดงในภาพที่ 2(A)

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลดิบของตัวอย่างทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 2(B) ผ่านตารางแสดงค่า C_t พบว่ายีน TIMP1 ซึ่งเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ที่ติดฉลากด้วยสี Cy5 ในทุกหลอดปฏิกิริยามีค่า C_t อยู่ระหว่าง 23.46–24.03 ซึ่งผ่านเกณฑ์คุณภาพที่กำหนดไว้ ($C_t \leq 25$) ยืนยันว่ากระบวนการสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยามีความสมบูรณ์ ไม่พบตัวยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibitors)

สำหรับการอ่านผลยีนเป้าหมาย NAT2 แต่ละ haplotype ที่ติดฉลากด้วยสี FAM จะใช้เกณฑ์ค่าจุดตัดที่ $C_t < 30$ ในการตัดสินผลบวก จากตัวอย่างทดสอบในภาพที่ 2(B) พบสัญญาณการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้ค่า C_t ต่ำกว่า 30 ในหลอดเป้าหมาย NAT2*6A ($C_t = 26.13$), NAT2*7B ($C_t = 26.41$), NAT2*13A-1 ($C_t = 26.83$) และ NAT2*13A-2 ($C_t = 24.05$) ในขณะที่เป้าหมาย NAT2*5B ให้ค่า C_t เท่ากับ 34.07 ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดจึงแปลผลเป็นลบ (Negative) และเป้าหมาย NAT2*4 กับ NAT2*12A ไม่ปรากฏสัญญาณ (N/A) ทำให้สามารถนำข้อมูลค่า C_t เหล่านี้ไปแปลผล NAT2-diplotype ของตัวอย่างดังกล่าว คือ NAT2*6A/*7B ได้อย่างแม่นยำตามตารางแสดงการอ่านผล NAT2 haplotype (ตารางที่ 5) ที่ได้กำหนดไว้



Well	Fluor	Target	Content	Sample	C _t
A06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.72
B06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.63
C06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.69
D06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.46
E06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.71
F06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	24.03
G06	Cy5	TIMP1	Unkn	6/7	23.68
A06	FAM	*4-NAT2	Unkn	6/7	N/A
B06	FAM	*5-NAT2	Unkn	6/7	34.07
C06	FAM	*6-NAT2	Unkn	6/7	26.13
D06	FAM	*7-NAT2	Unkn	6/7	26.41
E06	FAM	*12-NAT2	Unkn	6/7	N/A
F06	FAM	*13.1-NAT2	Unkn	6/7	26.83
G06	FAM	*13.2-NAT2	Unkn	6/7	24.05

ภาพที่ 2 (A) กราฟ amplification plot ของปฏิกิริยา Real-time PCR แสดงการเพิ่มสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของยีนเป้าหมาย NAT2 แต่ละ haplotype (สีน้ำเงิน) คู่ขนานไปกับยีนควบคุมภายใน TIMP1 (สีเขียว) (B) ตารางแสดงข้อมูลค่า cycle threshold (C_t) ของตัวอย่างทดสอบจำแนกตามหลอดปฏิกิริยา (well) ชนิดของสารเรืองแสง (fluor) และยีนเป้าหมาย (target)

ผลการตรวจสอบทางคลินิก (Clinical validation results)

จากการประเมินประสิทธิภาพด้วยตัวอย่างทางคลินิก จำนวน 138 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100 โดยผลการตรวจชนิด haplotype ในทุกตัวอย่างมีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ ดังแสดงในตารางที่ 4

เมื่อนำผลไดโพลไทป์ (diplotype) แปลผลเป็นฟีโนไทป์ (phenotype) การย่อยสลายยา (acetylator phenotypes) พบว่ามีความสอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 โดยจำแนกเป็นกลุ่มผู้ที่ย่อยยาเร็ว (rapid acetylator) 28 ราย กลุ่มผู้ที่ย่อยยาปานกลาง (intermediate acetylator) 58 ราย และกลุ่มผู้ที่ย่อยยาช้า (slow acetylator) 52 ราย ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยสามารถอ่านผลของ haplotype ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ตารางเปรียบเทียบผล NAT2 diplotype ระหว่างวิธี PCR กับวิธี Real-time PCR

NAT2-diplotype	PCR (No. of sample)	Real-time PCR (No. of sample)	NAT2-diplotype	PCR (No. of sample)	Real-time PCR (No. of sample)
*4/*4	18	18	*5B/*13A	1	1
*4/*5B	6	6	*6A/*6A	5	5
*4/*6A	23	23	*6A/*7B	14	14
*4/*7B	20	20	*6A/*12A	2	2
*4/*12A	6	6	*6A/*13A	2	2
*4/*13A	3	3	*7B/*7B	9	9
*5B/*5B	1	1	*7B/*12A	3	3
*5B/*6A	18	18	*7B/*13A	1	1
*5B/*7B	5	5	*12A/*13A	1	1

ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบผล NAT2 Acetylator ระหว่างวิธี PCR กับวิธี Real-time PCR

การตรวจ NAT2-diplotypes ด้วยวิธี Real-time PCR	Acetylator	การตรวจ NAT2-diplotypes ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์			
		Rapid	Intermediate	Slow	รวม
	Rapid	28	0	0	28
	Intermediate	0	58	0	58
	Slow	0	0	52	52
	รวม	28	58	52	138

ตารางที่ 6 ตารางแสดงการอ่านผล NAT2 haplotype

NAT2 haplotype reaction								
*4 (Ct)	*5B (Ct)	*6A (Ct)	*7B (Ct)	*12A (Ct)	*13A		TIMP1 (Ct)	NAT2 haplotype interpreted
					*13A-1(Ct)	*13A-2(Ct)		
< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	≤ 25	*4
Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	≤ 25	*5B
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	≤ 25	*6A
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	≤ 25	*7B
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	≤ 25	*12A
Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	Not detected หรือ Ct > 30	< 30	< 30	≤ 25	*13A

วิจารณ์

การพัฒนาวิธีการตรวจ NAT2-diployping ด้วย Real-time PCR ในการศึกษาี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการเพิ่มประสิทธิภาพและความสะดวกในการตรวจวิเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการ PCR แบบเดิม โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหา NAT2 haplotypes สำคัญได้ครอบคลุม 6 รูปแบบหลัก ผ่านปฏิกิริยาย่อย 7 ปฏิกิริยา ได้แก่ *4, *5B, *6A, *7B, *12A, *13A-1 และ *13A-2 ภายใต้สภาวะปฏิกิริยาร่วมกัน ส่งผลให้ลดความซับซ้อนของกระบวนการทดสอบ ลดขั้นตอนหลังการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และลดระยะเวลาในการรายงานผลได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹²⁾ ประเด็นสำคัญที่ส่งผลต่อความแม่นยำของการทดสอบ คือ ปริมาณสารพันธุกรรมเริ่มต้น (input DNA concentration) จากการทดสอบช่วงการตรวจจับ (detection range) พบว่าช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมและให้ผลแม่นยำที่สุดอยู่ที่ 5–150 ng/μL อย่างไรก็ตามการใช้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นของสูงเกินไป เช่น 200 ng/μL อาจก่อให้เกิดปรากฏการณ์ยับยั้งปฏิกิริยา (PCR inhibition) หรือเกิดสัญญาณรบกวน (background noise) จนบดบังสัญญาณจริง โดยเฉพาะใน Haplotype *4 และ *6A ดังนั้นการควบคุมคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอให้อยู่ในช่วงที่กำหนดจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อป้องกันผลลบปลอม (false negative) และรับประกันความถูกต้องของการรายงานผล⁽⁹⁾ ในด้านการนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการอื่นจำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยด้านเครื่องมือ (instrumentation variability) เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสม (optimized condition) ในการศึกษาี้ถูกกำหนดโดยใช้เครื่อง Bio-RAD CFX Opus 96 System การเปลี่ยนไปใช้เครื่อง Real-time PCR รุ่นหรือยี่ห้ออื่นที่มีคุณสมบัติทางกายภาพต่างกัน เช่น อัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ramp rate) หรือระบบตรวจวัดสัญญาณแสง (optical system) อาจส่งผลกระทบต่อค่า Ct และรูปร่างของกราฟเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมได้⁽¹³⁾ ดังนั้นห้องปฏิบัติการปลายทางควรตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method verification/ method validation) หรือปรับสภาวะการทดลอง (re-optimization) เล็กน้อย

โดยเฉพาะอุณหภูมิและเวลาในขั้นตอน annealing เพื่อให้ได้สัญญาณที่มีคุณภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำและมีประสิทธิภาพ⁽¹⁴⁾

อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดใน เรื่อง ความครอบคลุมของสายพันธุ์พันธุกรรม (genetic coverage) เนื่องจากไพรเมอร์ถูกออกแบบมาให้จำเพาะต่อ haplotypes ที่พบบ่อยในประชากรไทย 6 รูปแบบหลักเท่านั้น หากตัวอย่างทดสอบมี haplotypes ที่พบน้อย (uncommon haplotypes) หรืออยู่นอกเหนือขอบเขตการตรวจ เช่น NAT2*5C, *7C หรือ *11A ซึ่งมีรายงานพบในประชากรไทย⁽¹⁵⁾ อาจส่งผลให้ชุดตรวจไม่สามารถระบุชนิดได้หรือเกิดการจับกับดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (mispriming/non-specific binding) นำไปสู่ความคลาดเคลื่อนในการแปลผล (discrepancy) ดังที่เคยมีรายงานโดย Wichukchinda N และคณะ⁽⁷⁾ กรณีที่พบผลการทดสอบที่มีรูปแบบสัญญาณกำกวมหรือไม่สามารถสรุปผลได้ (indeterminate result) ควรพิจารณาส่งตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐาน DNA sequencing⁽⁷⁾ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น Long-read sequencing วิธีการ Real-time PCR นี้ยังมีข้อจำกัดทางเทคนิคที่ต้องใช้หลายปฏิกิริยาต่อหนึ่งตัวอย่าง และในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการใช้งานในอนาคต ควรคำนึงถึงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่อาจอยู่ใกล้กับจุดจับของไพรเมอร์ ซึ่งอาจรบกวนการอ่านผลยืนยันด้วยวิธี Sanger sequencing⁽¹⁶⁾ ได้นอกเหนือจากประสิทธิภาพทางเทคนิคแล้ว การพิจารณาความคุ้มค่าของการตรวจยืนยัน NAT2 ในบริบทระบบสาธารณสุขถือเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ข้อมูลจากการศึกษาของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการประชุมคณะทำงานกำหนดอัตราค่าใช้จ่ายเพื่อบริการสาธารณสุขสำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ เมื่อวันที่ 29 มกราคม พ.ศ. 2569 ชี้ให้เห็นว่าการนำการตรวจยืนยัน NAT2 ไปใช้ทางคลินิกมีผลลัพธ์ที่จับต้องได้และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์อย่างชัดเจน โดยพบว่าในผู้ป่วยวัณโรค 10,000 ราย การตรวจยืนยันนี้สามารถป้องกันการเกิดภาวะดื้อยาได้ถึง 1,157 ราย และลดจำนวนผู้เสียชีวิตลงได้ 95 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่มีการตรวจ ยิ่งกว่านั้นการประเมินความคุ้มค่าซึ่งพิจารณา

ถึงความเต็มใจจ่ายที่ 160,000 บาทต่อปีสุขภาพ ยืนยันว่า การตรวจยีน NAT2 มีความคุ้มค่าในมุมมองของ สังคมและรัฐบาลไทย โดยมีค่า ICER (Incremental Cost-Effectiveness Ratio) อยู่ที่ 6,720 บาทต่อปี สุขภาพเท่านั้น ความคุ้มค่านี้ยังคงชัดเจนแม้จะมีการ วิเคราะห์ภายใต้สถานการณ์ความเสี่ยงต่างๆ (scenario analysis) เช่น ปัจจัยร่วมอื่นที่ทำให้ตับอักเสบ ต้นทุน ค่ายารักษาโรค หรือสัดส่วนการปรับยาไอโซไนอาซิด

จากข้อมูลเชิงประจักษ์จากการประชุมการแลกเปลี่ยน เรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน NAT2 ประกอบการรักษา ผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid^(17,18) เมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2568 สะท้อนให้เห็นถึงประโยชน์และ ผลกระทบเชิงบวกของการนำผลตรวจ NAT2 ไปประยุกต์ ใช้จริงในสถานพยาบาลหลายระดับ การรายงานผล ที่รวดเร็วช่วยให้บุคลากรทางการแพทย์สามารถเฝ้าระวัง และปรับลดขนาดยาไอโซไนอาซิด (ประมาณ 2.5–3.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) ในผู้ป่วยกลุ่ม SA ได้ตั้งแต่วินิจฉัยเริ่มต้น ช่วยลดอุบัติการณ์ตับอักเสบ (Anti-tuberculosis drug-induced liver injury: AT-DILI) ได้อย่างเป็นรูปธรรมโดยไม่กระทบต่อประสิทธิภาพ การรักษา⁽²⁾ นอกจากนี้การประเมินผล NAT2 ร่วมกับ ตัวทำนายทางคลินิก (clinical predictors)⁽¹⁷⁾ เช่น น้ำหนักตัวที่ลดลง ระดับอัลบูมิน ภาวะซีด หรือ การติดเชื้อร่วม ในรูปแบบคะแนนความเสี่ยง (clinical risk score) จะยิ่งเพิ่มความแม่นยำใน การคัดกรองผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงสูงที่ควรได้รับการปรับ ขนาดยาโดยเฉพาะในโรงพยาบาลที่มีข้อจำกัดจาก การใช้ยารักษาสูตรผสมเม็ดเดียว (fixed-dose combination)

อย่างไรก็ตามแม้ผลการวิจัยนี้จะสนับสนุน ศักยภาพของวิธี Real-time PCR ในการเป็นเครื่องมือ ตรวจคัดกรองที่รวดเร็วและเข้าถึงได้ง่าย แต่บริบท การทำงานและแนวทางการดูแลผู้ป่วยของแต่ละสถาน พยาบาลยังคงมีความแตกต่างกัน งานวิจัยและก้าวต่อไป ที่สำคัญ (future perspective) คือ การผลักดันข้อมูล เชิงประจักษ์ทางเภสัชพันธุศาสตร์เหล่านี้ เพื่อนำไปสู่ การจัดทำแนวทางปฏิบัติทางคลินิก (clinical practice

guideline) ระดับประเทศที่ชัดเจนว่าด้วยการนำผล ตรวจยีน NAT2 และปัจจัยเสี่ยงทางคลินิกไปประยุกต์ ใช้ในการปรับขนาดยาไอโซไนอาซิด โดยสรุปผลการ ศึกษาบ่งชี้ว่าวิธี Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความ สอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 สะท้อนให้เห็นถึง ศักยภาพและความพร้อมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็น งานประจำในห้องปฏิบัติการทางคลินิก เพื่อสนับสนุน การแพทย์แม่นยำ (precision medicine) ซึ่งเมื่อผนวก กับแนวทางปฏิบัติทางคลินิกที่ได้มาตรฐานจะช่วยเพิ่ม ความมั่นใจให้แก่แพทย์ผู้รักษา ลดความเสี่ยงต่อการ ไม่พึงประสงค์ และยกระดับประสิทธิภาพและ ความปลอดภัยในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคได้อย่างยั่งยืน

สรุป

การศึกษานี้พัฒนาและประเมินวิธีตรวจ NAT2-diplotype ด้วยเทคนิค Real-time PCR ซึ่งให้ผล สอดคล้องกับวิธี PCR ร้อยละ 100 วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถ ตรวจหา NAT2 haplotypes สำคัญ จำนวน 6 รูปแบบ ที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และมีช่วงความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์อยู่ที่ 5–150 ng/μL นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังช่วยลดระยะเวลา ในการวิเคราะห์และลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนใน ห้องปฏิบัติการ เนื่องจากไม่ต้องมีขั้นตอนหลังการเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรม (post-PCR handling) ข้อมูลที่ ได้จึงยืนยันว่าวิธี Real-time PCR มีศักยภาพ และความ พร้อมสำหรับนำไปใช้เป็นเครื่องมือทางเภสัชพันธุศาสตร์ ในการสนับสนุนการปรับขนาดยาไอโซไนอาซิดแบบ จำเพาะบุคคล เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและประสิทธิภาพ ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคในงานบริการทางคลินิกต่อไป

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

ผู้เขียนได้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Gemini pro เพื่อตรวจสอบภาษาในส่วนเนื้อเรื่อง และจัดรูปแบบ เอกสารอ้างอิง ทั้งนี้ผู้เขียนได้ตรวจสอบและรับรอง ความถูกต้องของเนื้อหาดังกล่าวแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนเงินยืม
จากการดำเนินงานวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และ
การสาธารณสุข ประจำปี พ.ศ. 2565 กรมวิทยาศาสตร์
การแพทย์

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023.
2. Azuma J, Ohno M, Kubota R, Yokota S, Nagai T, Tsuyuguchi K, et al. *NAT2* genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69(5): 1091-101.
3. Surarak T, Chumnumwat S, Nosoongnoen W, Tragulpiankit P. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of isoniazid affected by *NAT2* polymorphisms in patients with tuberculosis: a systematic review. *Clin Transl Sci* 2024; 17(4): e13795. (13 pages).
4. Schiuma M, Dinegro S, Battini V, Torre A, Covizzi A, Civati A, et al. *NAT2* acetylation status predicts hepatotoxicity during anti-tuberculosis therapy: cumulative risk analysis of a multiethnic cohort. *Int J Mol Sci* 2025; 26(8): 3881. (13 pages).
5. Thanyanuch S, Charoen C, Surakameth M, Sukanya W. *NAT2* genotype-guided INH dosage to reduce drug-induced liver injury in Thai patients. *Syst Rev Pharm* 2021; 12(9): 523-7.
6. Hein DW. N-acetyltransferase SNPs: emerging concepts serve as a paradigm for understanding complexities of personalized medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5(4): 353-66.
7. Wichukchinda N, Pakdee J, Kunhapan P, Imunchot W, Toyo-Oka L, Tokunaga K, et al. Haplotype-specific PCR for *NAT2* diplotyping. *Hum Genome Var* 2020; 7: 13. (6 pages).
8. Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol* 2009; 40(1): 1-11.
9. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004; 15(3): 155-66.
10. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol* 2017; 8: 108. (9 pages).
11. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ชุดไพรเมอร์ (Primer set) สำหรับการตรวจแทนทู-ไดโพลทัยป์ (*NAT2*-diplotypes). สิทธิบัตรการประดิษฐ์ไทย เลขที่ 92597; 2566.
12. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5(2): 209-19.
13. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
14. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3): 550-76.
15. Wattanapokayakit S, Mushiroda T, Yanai H, Wichukchinda N, Chuchottawon C, Nedsuwan S, et al. *NAT2* slow acetylator associated with anti-tuberculosis drug-induced liver injury in Thai patients. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2016; 20(10): 1364-9.

16. Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Steyn A, Mes TH, Schutten M. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Mol Diagn* 2010; 12(1): 109-17.
17. วีระวุฒิ มิ่งขวัญ. การบรรยายเรื่อง Usefulness of *NAT2* accompanied by clinical predictors among tuberculosis patients treatment. เอกสารการประชุมการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน *NAT2* ประกอบการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid; วันที่ 30 มกราคม 2568. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2568.
18. มิ่งขวัญ มงคลสินธุ์, อินทรา สิมะพิเชฐ, วนิดา แสนเมือง. การอภิปรายเรื่องรูปแบบ/แนวทางการใช้ผลตรวจยีน *NAT2* เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดดื้อยา และ การเสียชีวิตของผู้ป่วยวัณโรคจากการได้รับยา Isoniazid. เอกสารการประชุมการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ การใช้ผลตรวจยีน *NAT2* ประกอบการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยยา isoniazid; วันที่ 30 มกราคม 2568. กรุงเทพฯ: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2568.

NAT2-diplotyping by Real-time PCR

Tiparat Potipitak¹, Nuanjun Wichukchinda², Pathida Prakongsup¹, Wimala Inunchot¹, Surakameth Mahasirimongkol³, and Sukanya Wattanapokayakit¹

¹Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

²Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

³Bureau of Royal Initiative, Commemoration and Special Projects, Office of Permanent Secretary, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT N-acetyltransferase 2 enzyme (NAT2) plays an important role in the metabolizing of Isoniazid, an antituberculosis drug. Individuals having a slow acetylator phenotype were found 8.8 times more at risk to be TB drug-induced liver injury compared to intermediate and fast acetylator ones. The acetylator phenotype can be interpreted from NAT2-diplotyping and used for Isoniazid-dose adjustment. This study aimed to develop a Real-time PCR for NAT2-diplotyping to replace the previous PCR for routine service. Optimization of primer/probe concentration and temperature/time condition was done with known phase-analysis NAT2-diplotyping DNA samples. The DNA detection range of this new method was 5–150 ng/μL. Method verification of the Real-time PCR for NAT2-diplotyping by comparing it with the PCR method in 138 samples. The result has shown that NAT2-diplotype in all samples from both methods was 100% consistent. In conclusion, the novel real-time NAT2-diplotyping which provides faster results and is more convenient, can replace the previous PCR for clinical routine service.

Keywords: NAT2-diplotyping, Isoniazid, Real-time PCR, PCR, Acetylator