

การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิม และวิธี Line Probe Assay (LPA)

วราพร ยิ้มแย้ม, วท.ม. ปัทมา กล่อมพร, วท.ม.

ภิญญดา สมศรี, ป.พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์.

ธนกร โพธิ์วงศ์, วท.บ.

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 พิษณุโลก

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อสำคัญที่ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศต่างๆทั่วโลก ประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม 30 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาสูง มาตรการการเร่งรัดค้นหาผู้ป่วยวัณโรคให้ครอบคลุมและได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีการตรวจที่รวดเร็ว จึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่สำคัญในแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ.2560 – 2564 ที่ประเทศไทยจัดทำขึ้นเพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (End TB strategy) ขององค์การอนามัยโลก การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยามีด้วยกันหลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวต่อยาซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ข้อเสียของวิธีนี้คือใช้เวลานานในการรายงานผล ปัจจุบันมีเทคนิควิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งสามารถรายงานผลได้รวดเร็วกว่าและถูกนำมาใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line Probe Assay (LPA) โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 กับวิธีทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิม (Conventional DST) จากตัวอย่างเสมหะที่เก็บจากโรงพยาบาลต่างๆ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ผลการศึกษาพบว่า การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA มีค่าความไวร้อยละ 80 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 97.9 ในการตรวจพบเชื้อวัณโรคแบบ RIF resistance ส่วนการตรวจพบเชื้อวัณโรคแบบ INH resistance มีค่าความไวร้อยละ 81.3 และค่าความจำเพาะร้อยละ 100 และมีค่าความไวในการตรวจพบวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ร้อยละ 64.7 นอกจากนี้ พบว่า รูปแบบการดื้อยาแบบ RIF resistance ส่วนใหญ่เกิดจากการ mutation ของยีน *rpoB* ตำแหน่ง MUT3 คิดเป็นร้อยละ 33.3 ส่วนรูปแบบการดื้อยาแบบ INH resistance ส่วนใหญ่เกิดจากการ mutation ของยีน *katG* ตำแหน่ง MUT1 คิดเป็นร้อยละ 65.4 จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 มีความไวและความจำเพาะสูงเหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรค

คำสำคัญ: วัณโรค วัณโรคดื้อยาหลายขนาน ภาคเหนือตอนล่าง

Comparative of MDR-TB detection between Conventional DST and Line Probe Assay (LPA)

Waraporn Yimyam, M.Sc, Patthama Klomporn, M.Sc,

Phinyada Somsri, M.L.T, Thanakorn Powong, B.Sc.

The Office of Disease Prevention and Control Region 2 Phitsanulok

Abstract

Tuberculosis (TB) is one of the serious problems of the worldwide. Thailand is listed in the 30 high TB burden and high Multidrug resistance tuberculosis (MDR-TB) burden countries. The screening and rapid diagnosis of TB/MDR-TB are the important goal of Thailand that leading to the End TB strategy according World Health Organization (WHO). For laboratory diagnosis of TB, culture and drug susceptibility test (DST) as gold standard it results still take a several weeks. The rapid molecular diagnosis tests e.g. Line Probe Assay (LPA) that has been recommended by the WHO to the reduced turnaround time of drug resistance tuberculosis detection. LPA was used for MDR-TB detection in many setting of Thailand. Thus, the aim of this study is comparative of MDR-TB detection rifampicin (RIF) resistance and isoniazid (INH) resistance between LPA (by using Genotype® MTBDR*plus* assay) and DST in the lower north of Thailand. The efficacy of the LPA by Genotype® MTBDR*plus* assay showed 80.0% of sensitivity and 97.9% of specificity for the detection of RIF resistance whereas sensitivity and specificity of INH resistance detection was found to be 81.3% and 100.0% respectively. The sensitivity of MDR-TB detection was found to be 64.7%. Moreover, the predominantly mutation of RIF resistance was found 33.3 % at MUT3 mutation of *rpoB* gene whereas the predominantly mutation of INH resistance was found 65.4% at MUT1 mutation of *katG* gene. This study demonstrated that LPA by using Genotype® MTBDR*plus* assay is a rapid and high efficacy method to detection of MDR-TB.

Key words: Tuberculosis, Multidrug-resistance Tuberculosis (MDR-TB), lower north, Line Probe Assay (LPA)

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อสำคัญที่ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศต่างๆทั่วโลก ข้อมูลในปี พ.ศ.2560 องค์การอนามัยโลกรายงานว่าพบผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 10 ล้านรายทั่วโลก (133 รายต่อแสนประชากร) และจัดให้ประเทศไทยอยู่ในกลุ่ม 30 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูง ค่าประมาณอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับมาเป็นซ้ำในประเทศไทยจำนวน 108,000 ราย (156 รายต่อแสนประชากร) และผู้ป่วยวัณโรคคือยาหลายขนาน (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) หรือคือต่อยาไรแฟมพิซิน (Rifampicin resistance tuberculosis, RR-TB) ประมาณ 3,900 ราย (5.7 รายต่อแสนประชากร) (1)

สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลจากการเฝ้าระวังโรค ปี พ.ศ.2561 โดยสำนักระบาด กรมควบคุมโรค รายงานว่าพบผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 9,130 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 13.95 ต่อแสนประชากร เสียชีวิตจำนวน 22 ราย คิดเป็นอัตรามรณะ 0.03 ต่อแสนประชากร (2) นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีปัญหาวัณโรคคือยาหลายขนาน (MDR-TB) โดยสำนักวัณโรค รายงานผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2559 พบผู้ป่วยวัณโรคคือยาหลายขนาน 955 รายและวัณโรคคือยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensively drugs-resistant tuberculosis, XDR-TB) 13 ราย การเร่งรัดค้นหาผู้ป่วยวัณโรคให้ครอบคลุมและได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีการตรวจที่รวดเร็ว รวมทั้งการเข้าถึงการดูแลรักษาที่เป็นมาตรฐานมีการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อที่ดี จึงเป็นหนึ่งในเป้าหมายที่สำคัญในแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ.2560 – 2564 ที่ประเทศไทย

จัดทำขึ้นเพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (End TB strategy) ขององค์การอนามัยโลก⁽³⁾

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคมีหลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) มีความไวและความจำเพาะสูง โดยทั่วไปสามารถทำได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งอาหารแข็ง (Solid media) และอาหารเหลว (Liquid media) (4) โดยใช้เวลานาน 6-8 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโต การเพาะเลี้ยงเชื่อนอกจากจะทดสอบการมีชีวิตของเชื้อแล้ว ยังสามารถนำเชื้อที่เพาะขึ้นไปพิสูจน์ชนิดและทดสอบความไวต่อยาของเชื้อต่อไปได้อีก การทดสอบความไวต่อเชื้อวัณโรคเป็นการทดสอบดูการเจริญของเชื้อในหลอดอาหารที่มียาผสมอยู่เทียบกับหลอดอาหารที่ไม่มียาผสม โดยวิธีที่นิยมใช้คือ การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MGIT (mycobacteria growth indicator tube) โดยเลี้ยงในเครื่องอัตโนมัติ BACTEC 960 system การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค แบบดั้งเดิม (Conventional DST Method) ทำการทดสอบความไวของยา 4 ชนิด คือ Streptomycin Rifampicin Isoniazid และ Ethambutol ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลานานในการทดสอบ ทำให้ทราบผลการตรวจวิเคราะห์ช้า นอกจากนี้ยังมีวิธีทางอณูชีววิทยาสามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคและตรวจการคือยาของเชื้อวัณโรคได้รวดเร็วกว่า เช่น วิธี Line Probe Assay (LPA) ซึ่งเป็นหลักการตรวจวิเคราะห์หาวัณโรคคือยาที่ได้รับการยอมรับโดยองค์การอนามัยโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ให้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในผู้ป่วยได้ (5) โดยหลักการเป็นการทดสอบหาวัณโรคที่คือกับยาสองชนิดคือ Rifampicin (RIF) และ Isoniazid (INH) สามารถรายงานผลได้ ภายใน 5-14 วัน

หลังจากได้รับตัวอย่าง ในประเทศไทยได้มีการนำวิธี LPA มาใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาในหลายพื้นที่ (6-8) การศึกษาก่อนหน้านี้ของรพีพรรณและคณะ ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาจากตัวอย่างที่เก็บได้ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ฯ โดยใช้ชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} assay ซึ่งใช้หลักการ LPA เปรียบเทียบกับวิธี Conventional DST พบว่าชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} assay มีค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 95.3 และร้อยละ 100 ในการตรวจหาINH resistance และ RIF resistance ตามลำดับ และมีค่าความไวร้อยละ 94.4 ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) มีค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 100 ในทุกรูปแบบของการดื้อยา (6) เช่นเดียวกับการศึกษาของปีทมาและคณะ ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี LPA ในตัวอย่างเสมหะที่มีผลเสมียร์พบเชื้อ ในโรงพยาบาลแห่งหนึ่งของจังหวัดนนทบุรี พบว่าชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} assay มีค่าความไวร้อยละ 100 ในการตรวจหา INH และ RIF resistance ค่าความจำเพาะร้อยละ 92.1 และ 86.5 ในการตรวจ INH และ RIF resistance ตามลำดับ (7)

เนื่องจากมีความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาระหว่างวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) กับวิธีทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิม (Conventional DST) จากตัวอย่างเสมหะที่เก็บจากโรงพยาบาลต่างๆ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย โดยการเปรียบเทียบจะใช้ค่าทางสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรง ได้แก่ การ

หาค่าความไวและค่าความจำเพาะ ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาต่อยา RIF และ INH

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ศึกษา ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย จากโรงพยาบาลต่างๆ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย (เขตสุขภาพที่ 2) ได้แก่ 5 จังหวัด ประกอบด้วย พิชณุโลก อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ สุโขทัย และตาก ที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก เพื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี LPA ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 จำนวนทั้งหมด 423 ตัวอย่าง

2. ขั้นตอนการศึกษา

2.1 ขั้นตอนการลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ (Decontamination process) นำตัวอย่างเสมหะมาลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ด้วยสารละลาย 2% NALC/NaOH ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:2 ขึ้นอยู่กับความเหนียวข้นของเสมหะ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย Phosphate Buffer pH 6.8 (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาเทส่วนใสด้านบนทิ้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย PBS pH 6.8 ปริมาตร 1-1.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดและผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปต สารละลายที่ได้ใช้เป็นตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์ โดยหยดตัวอย่างจำนวน 1-2 หยดลงบนสไลด์ (Concentrate smear) เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีการย้อมสี acid fast bacilli (Ziehl-Neelsen stain) แบ่งตัวอย่างจำนวน 4 หยดนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารแข็ง (LJ media)

และดูดตัวอย่างจำนวน 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหารเหลว (MGIT media) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 ตัวอย่างที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA

2.2 การพิสูจน์แยกชนิดเชื้อด้วยวิธี Immunochromatographic assay (ICA) ตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจะถูกนำมาทดสอบหาแอนติเจน MPT64 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างเฉพาะในเชื้อกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ด้วยชุดทดสอบ TB Ag MPT64 Rapid (SD, Korea) ซึ่งสามารถใช้วินิจฉัยแยกเชื้อกลุ่ม MTBC ออกจากเชื้อกลุ่ม NTM ได้

2.3 การทดสอบความไวต่อยา Drug Susceptibility Test ตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตจากการเพาะเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ MGIT 960 และผ่านการทดสอบว่าเป็น *Mycobacterium tuberculosis* Complex ด้วยชุดทดสอบ TB Ag MPT64 Rapid (SD, Korea) จะถูกนำไปทำการเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง (LJ media) เชื้อวัณโรคที่บริสุทธิ์ (Purify Colony) อายุประมาณ 2 สัปดาห์ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยมีเชื้อวัณโรคเจริญเติบโตอยู่ไม่น้อยกว่า 20 colonies จะนำมาทดสอบความไวต่อยาวัณโรคชนิด Liquid-AST โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ประมาณ 1 loop full เขี่ยใส่ใน Sterile screw tube ที่มี glass beads เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ประมาณ 7-8 เม็ด นำไปปั่นบนเครื่อง Vortex ให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นานประมาณ 30 วินาที จน colony ของเชื้อแตกกระจายตัวดี เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 3-7 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อที่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่มตกตะกอน หลังจากครบเวลาดูดสารละลาย

แขวนตะกอนส่วนบนมาปรับความเข้มข้นเป็น 0.5 McFarland ด้วยเครื่อง Densitometer หลังจากนั้นจึงจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็นอัตราส่วน 1: 5 และดูดสารละลายดังกล่าว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเหลว MGIT ที่มียาผสมอยู่ โดยจะเติมยา Streptomycin (S), Isoniazid (H), Rifampicin (R) และ Ethambutol (E) ลงใน MGIT tube โดยมีความเข้มข้นของยาต่างๆ ดังนี้ 1.0 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml และ 5 µg/ml ตามลำดับ จากนั้นจึงจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็นอัตราส่วน 1: 100 และดูดสารละลายนี้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเหลว MGIT ที่ไม่มียาผสมอยู่ (growth control) ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไป - มา นำหลอด MGIT ทั้งหมดบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 เครื่องจะทำการตรวจวัดสารเรืองแสงของหลอดที่มียาเทียบกับหลอดที่ไม่มียา แปลงค่าการเรืองแสงออกมาในรูปการเจริญของเชื้อเป็น Growth unit (GU) และแปลผลการทดสอบเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา (resistance) และเชื้อไวต่อยา (susceptible)

2.4 การตรวจวิเคราะห์หาวัณโรคด้วยวิธี Line Probe Assay (LPA) โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ตัวอย่างที่ทำการตรวจวิเคราะห์หาวัณโรคด้วยวิธี LPA เป็นตัวอย่างเสมหะที่พบเชื้อจาก Concentrate smear โดยนำตัวอย่างเสมหะที่ผ่านกระบวนการลดการปนเปื้อนเชื้อ (decontamination sample) ที่เก็บไว้ที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลาย ใช้ตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำมาสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา

GenoLyse® VER 1.0 ตามคู่มือการใช้งาน ซึ่งจะได้อาสาสมัครสารพันธุกรรมปริมาณ 150 ไมโครลิตรเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เตรียม PCR master mixture ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยน้ำยา AM-A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ AM-B ปริมาตร 35 ไมโครลิตร เติมหาสาสมัครสารพันธุกรรมที่ได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermocycler รุ่น GTQ-Cycler 24, HAIN, Germany ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน Denaturation ที่ 95°C นาน 15 นาที ตามด้วยขั้นตอน Annealing จำนวน 20 รอบ ที่ 95°C นาน 30 วินาที และ ที่ 65°C นาน 2 นาที จากนั้นเป็นปฏิกิริยาที่ 95°C นาน 30 วินาที, 50°C นาน 40 วินาที และ 70°C นาน 40 วินาที จำนวนละ 30 รอบ สุดท้ายคือขั้นตอน Extension ที่ 70°C นาน 8 นาที เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจะได้ PCR Product ที่พร้อมสำหรับนำไปทดสอบในขั้นตอนการทำ Reverse hybridization ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Rifampicin (RIF) และ Isoniazid (INH) โดยใช้เครื่อง Hybridization รุ่น GT-Blot 48, HAIN ซึ่งเป็นเครื่อง Semiautomated สำหรับขั้นตอน Washing และ Shaking โดยผสม 20 ไมโครลิตรของ PCR product กับ denaturation solution 20 ไมโครลิตรในถาดทดสอบ (Tray) ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีเมื่อครบเวลานำ tray เข้าเครื่อง Hybridization เครื่องจะทำการเติมน้ำยา Hybridization buffer ที่อุณหภูมิ 45 °C ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะใส่ MTBDRplus VER2.0 STRIPS ลงไปในหลุมที่ทดสอบ ขั้นตอนการ Hybridization ทำที่อุณหภูมิ 45°C นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาเครื่องจะเติมน้ำยา Stringent Wash

Solution ทำปฏิกิริยาที่ 45°C นาน 15 นาที หลังจากนั้นจะเป็นขั้นตอนการล้าง หลังจากนั้นสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการเติม Streptavidin- conjugated alkaline phosphatase ซึ่งจะไปจับกับ biotin-labeled amplicons เมื่อทำปฏิกิริยากับ substrate ทำให้เกิดแถบตะกอนสี ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตัวอย่างที่ตรวจพบ wild type band และไม่พบ mutant band แปลผลว่าเป็นเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา (Sensitive) แต่ถ้ามี wild type band ของยีนใดยีนหนึ่งขาดหายไปและตรวจพบ mutant band ขึ้นแสดงว่าเป็นเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา (Resistance) กรณีที่พบการดื้อยาเป็นแบบ Heteroresistance คือตรวจพบทั้ง wild type band และ mutant band

3. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยคำนวณหา ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าความถูกต้อง (accuracy) ของการตรวจวิเคราะห์

ผลการศึกษา

ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย จากโรงพยาบาลต่างๆ ในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง (เขตสุขภาพที่ 2) ได้แก่ 5 จังหวัด ประกอบด้วย พิชณุโลก อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ สุโขทัยและตาก ที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี LPA ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 จำนวนทั้งหมด 423 ตัวอย่าง ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างเสมหะทั้งหมด 423 ตัวอย่าง พบตัวอย่างเสมหะที่ให้ผล Concentrate smear เป็น Positive คือพบเชื้อ AFB เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จำนวน 379 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.6 และตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ AFB จำนวน 44 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.4 (ตารางที่ 1) ตัวอย่าง

เสมหะที่ให้ผล Concentrate smear เป็น Positive ทั้งหมด 379 ตัวอย่างนี้ถูกนำมาทดสอบหาวัณโรคคือ ยาด้วยเทคนิควิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) พบว่าให้ผลการทดสอบเป็น MTBC detected จำนวน 316 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 83.4 ผลการทดสอบเป็น MTBC not detected จำนวน 55 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.5 และให้ผลการทดสอบเป็น Invalid คือไม่สามารถแปลผลการทดสอบได้ จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.1

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์จาก Direct smear และ Concentrate smear ของตัวอย่างเสมหะทั้งหมด

Direct smear result	Concentrate smear result		จำนวนรวม (ราย)
	Negative	Positive	
Not done	2	7	9
Negative	23	26	49
Positive Scanty (1-9 cells)	8	62	70
Positive 1+	10	180	190
Positive 2+	0	40	40
Positive 3+	1	64	65
จำนวนรวม (ราย)	44	379	423

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อของเสมหะจำนวนทั้งหมด 379 ตัวอย่าง พบว่าเสมหะจำนวน 152 ตัวอย่าง ที่มีเชื้อเจริญเติบโตและทดสอบพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อได้เป็น *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ในจำนวนนี้มีเสมหะจำนวน 34

ตัวอย่างที่ไม่สามารถทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาด้วยวิธี Conventional method ได้เนื่องจากเชื้อมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

ตัวอย่างเสมหะที่เพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อเป็น MTBC จำนวน 118 ตัวอย่างเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) พบว่ามีตัวอย่างเสมหะจำนวน 116 ตัวอย่างให้ผลการทดสอบเป็น MTBC detected คิดเป็นร้อยละ 98.3 และผลการทดสอบเป็น MTBC not detected จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.7 ดังนั้น การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือ ยาระหว่างวิธี LPA และวิธีทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิม จึงทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างเสมหะจำนวนทั้งหมด 116 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี Conventional DST ของตัวอย่างเสมหะจำนวนทั้งหมด 116 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเชื้อวัณโรคคือต่อยา RIF จำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.22 และคือต่อยา INH จำนวน 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 27.6 ในขณะที่วิธี LPA ให้ผลการทดสอบพบเชื้อวัณโรคคือต่อยา RIF จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.5 และคือต่อยา INH จำนวน 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 22.4 ในจำนวนนี้มีตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่างที่ตรวจพบว่าเป็นเชื้อวัณโรคคือต่อยา RIF ด้วยวิธี LPA แต่ให้ผลเป็นเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยา RIF จากวิธี Conventional DST (ตารางที่ 2) ซึ่งวิธี LPA มีค่าความไว (Sensitivity) ร้อยละ 80 ในการตรวจพบเชื้อวัณโรคแบบ RIF resistance เมื่อเทียบกับวิธี Conventional DST และมีค่าความจำเพาะ (Specificity) ร้อยละ 97.9 ส่วนการตรวจพบเชื้อวัณ

โรคแบบ INH resistance มีค่าความไวร้อยละ 81.3 และค่าความจำเพาะร้อยละ 100 สำหรับค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของวิธี LPA เมื่อเทียบกับวิธี Conventional DST ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาต่อยา RIF และ INH คิดเป็นร้อยละ 94.8 ทั้งคู่ นอกจากนี้ วิธี LPA มีความไวในตรวจพบวัณโรคคือยาหลายขนาน (MDR) จำนวน 11 ตัวอย่างจากจำนวน 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบด้วยวิธี Conventional DST คิดเป็นร้อยละ 64.7

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA และวิธี Conventional DST

Conventional DST				
LPA	Resistance	Susceptible	Sensitivity (%)	Specificity (%)
RIF			80	97.9
Resistance (<i>rpo B</i>)	16	2		
Susceptible	4	94		
INH			81.3	100
Resistance (<i>KatG/inhA</i>)	26	0		
Susceptible	6	84		

ตารางที่ 3 ผลที่ไม่สอดคล้องกันในการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี RIF และ INH จากวิธี LPA และวิธี Conventional DST

ตัวอย่าง	LPA		Conventional DST	
	RIF	INH	RIF	INH
ตัวอย่างที่ 1	Resistance	Susceptible	Resistance	Resistance
ตัวอย่างที่ 2	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Resistance
ตัวอย่างที่ 3	Susceptible	Resistance	Resistance	Resistance
ตัวอย่างที่ 4	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Resistance
ตัวอย่างที่ 5	Resistance	Susceptible	Resistance	Resistance
ตัวอย่างที่ 6	Resistance	Susceptible	Resistance	Resistance
ตัวอย่างที่ 7	Susceptible	Susceptible	Resistance	Susceptible
ตัวอย่างที่ 8	Susceptible	Susceptible	Susceptible	Resistance
ตัวอย่างที่ 9	Resistance	Resistance	Susceptible	Resistance
ตัวอย่างที่ 10	Resistance	Resistance	Susceptible	Resistance
ตัวอย่างที่ 11	Susceptible	Resistance	Resistance	Resistance
ตัวอย่างที่ 12	Susceptible	Resistance	Resistance	Resistance

ตารางที่ 4 ผลทดสอบการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA เปรียบเทียบกับวิธี Conventional DST ในตัวอย่างเสมหะจำนวน 31 ตัวอย่าง

No.	Band missing /Mutation band : LPA			Conventional DST	
	<i>rpoB</i>	<i>KatG</i>	<i>inhA</i>	RIF	INH
1	WT8 missing/-		<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	R	R
2	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
3	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3			R	S
4		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		S	R
5		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		S	R
6	WT2 และ 3 missing/-			R	R
7			<i>inhA</i> WT2/ <i>inhA</i> MUT3B	S	R
8			<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	S	R
9			<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	S	R
10		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		R	R
11	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3			R	R
12	-/ <i>rpoB</i> MUT2A	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		R	R
13	WT8/ <i>rpoB</i> MUT2A	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
14	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3			R	R
15		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		S	R
16	WT7/ <i>rpoB</i> MUT2A	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
17	WT7/ <i>rpoB</i> MUT2A	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
18	-/ <i>rpoB</i> MUT2A	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		R	R
19		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		S	R
20	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
21	WT3 และ 4/ <i>rpoB</i> MUT1	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
22	WT8 missing/-			R	S
23			<i>inhA</i> WT2/ <i>inhA</i> MUT3B	S	R
24	WT8/ <i>rpoB</i> MUT3	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
25	WT3 และ 4/ <i>rpoB</i> MUT1	-/ <i>katG</i> MUT1		R	R
26	WT8 missing/-		<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	S	R
27			<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	S	R

ตารางที่ 4 (ต่อ)

No.	Band missing /Mutation band : LPA			Conventional DST	
	<i>rpoB</i>	<i>KatG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	<i>KatG</i>
28	WT8 missing/-	-/ <i>katG</i> MUT1		S	R
29		<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1		R	R
30			<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	S	R
31			<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	R	R

การตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาต่อยา RIF และ INH ด้วยวิธี LPA และวิธี Conventional DST ของตัวอย่างเสมหะทั้งหมด 116 ตัวอย่างผลการทดสอบพบว่า ตัวอย่างเสมหะจำนวน 12 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการทดสอบไม่สอดคล้องกัน (ตารางที่ 3) คือ เสมหะจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อเป็น Mono RIF resistance ด้วยวิธี LPA แต่วิธี Conventional DST ให้ผลว่าเป็นเชื้อ MDR เสมหะจำนวน 4 ตัวอย่างตรวจไม่พบการคือยาใดๆ ด้วยวิธี LPA แต่ให้ผลเป็น Mono RIF resistance จำนวน 1 ตัวอย่าง และ Mono INH resistance จำนวน 3 ตัวอย่าง จากวิธี Conventional DST เสมหะที่ตรวจพบเชื้อเป็น Mono INH resistance จำนวน 3 ตัวอย่างด้วยวิธี LPA แต่วิธี Conventional DST ให้ผลว่าเป็นเชื้อ MDR นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างจำนวน 2 ตัวอย่างที่ตรวจพบว่าเป็นเชื้อ MDR ด้วยวิธี LPA แต่วิธี Conventional DST ให้ผลเป็น Mono INH resistance

ผลการทดสอบการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาต่อยา RIF และ INH ที่ตรวจพบด้วยวิธี LPA ทั้งหมด 31 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) พบว่า เชื้อในกลุ่มที่คือต่อยา RIF นั้นส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่ง MUT3 คิดเป็นร้อยละ 33.3 รองลงมาคือมีการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ตำแหน่ง MUT2A ร้อยละ 27.8 และยีน *rpoB* wild type band 8

หาย ร้อยละ 22.2 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มเชื้อที่คือต่อยา INH ส่วนใหญ่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ตำแหน่ง MUT1 คิดเป็นร้อยละ 65.4 รองลงมาคือมีการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ตำแหน่ง MUT1 ร้อยละ 26.9 และตำแหน่ง MUT3B ร้อยละ 7.7 ตามลำดับ

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ตลอด 10 ปี ที่ผ่านมา ประเทศไทยได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้เพื่อช่วยในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคคือยารวมถึงวิธี LPA นำมาใช้ในหลายพื้นที่ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคในแต่ละพื้นที่ ดังนั้น การศึกษานี้จึงศึกษาการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาระหว่างวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDR_{plus} Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) กับวิธีทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิม (Conventional DST) จากตัวอย่างเสมหะที่เก็บจากโรงพยาบาลต่างๆ ภายในเขตสุขภาพที่ 2

วิธี LPA เป็นเทคนิควิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาต่อยา RIF และ INH สามารถทดสอบได้เฉพาะกับตัวอย่างเสมหะที่พบเชื้อ (AFB positive) หรือจากตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่างเสมหะที่เพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบพิสูจน์แยกชนิดของเชื้อได้

เป็น MTBC จำนวน 118 ตัวอย่างเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี LPA ให้ผลการทดสอบเป็น MTBC detected จำนวน 116 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 98.3 และผลการทดสอบเป็น MTBC not detected จำนวน 2 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 1.7 ในจำนวนเสมหะ 2 ตัวอย่างนี้ ให้ผลการทดสอบความไวต่อยาจากวิธี Conventional DST เป็น Mono INH resistance จำนวน 1 ตัวอย่าง (ผล AFB smear เป็น positive 1+) และ ให้ผล Susceptible ต่อ RIF และ INH อีก 1 ตัวอย่าง (ผล AFB smear เป็น not done) ซึ่งเป็นไปได้ว่าตัวอย่างเสมหะทั้ง 2 ตัวอย่างดังกล่าวมีจำนวนเชื้อน้อยกว่าค่า Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบที่ใช้ คือ จำนวน 160 เซลล์ต่อมิลลิลิตร⁽⁹⁾

ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) มีค่าความไวร้อยละ 80 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 97.9 ในการตรวจพบเชื้อวัณโรคแบบ RIF resistance มีค่าความไวร้อยละ 81.3 และค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ในการตรวจพบเชื้อวัณโรคแบบ INH resistance และมีค่าความถูกต้องร้อยละ 94.8 ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยทั้งสองรูปแบบ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Conventional DST ซึ่งค่าความจำเพาะที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าสูงใกล้เคียงกับค่าความจำเพาะที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย⁽⁶⁻⁷⁾ อย่างไรก็ตาม ค่าความไวในการตรวจหาการดื้อยาของทั้งสองรูปแบบจากการศึกษานี้มีค่าน้อยกว่าค่าความไวที่ได้จากการศึกษาอื่น⁽⁶⁻⁷⁾ นอกจากนี้พบว่า วิธี LPA มีค่าความไวในการตรวจพบวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR) ร้อยละ 64.7 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของรพีพรรณและคณะ⁽⁷⁾

ผลการทดสอบการดื้อยาผลที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างวิธี LPA และวิธี Conventional DST พบในเสมหะ จำนวน 2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 9 และ 10 จากตารางที่ 3) คือตรวจพบการดื้อยาแบบ RIF resistance ด้วยวิธี LPA แต่ไม่พบการดื้อยาจากวิธี Conventional DST เป็นไปได้ว่าตรวจพบการกลายพันธุ์ (Mutation) ของลำดับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid sequence) ด้วยวิธี LPA แต่การกลายพันธุ์นั้นไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (Silent mutation) ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกในระดับฟีโนไทป์ (Phenotype) จึงตรวจไม่พบการดื้อยา ด้วยวิธี Conventional DST เช่นเดียวกับการศึกษาของปัทมาและคณะ⁽⁷⁾ สำหรับตัวอย่างเสมหะจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถตรวจพบการดื้อยาต่อยา RIF หรือ INH จากวิธี LPA แต่ตรวจพบการดื้อยาจากวิธี Conventional DST นั้นอาจเกิดจากการมีการ mutation ของยีนในตำแหน่งอื่น นอกเหนือไปจากตำแหน่งที่สามารถตรวจพบได้ด้วยชุดทดสอบ Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ซึ่งถือว่าเป็นข้อจำกัดของวิธี LPA

รูปแบบการดื้อยาที่ตรวจพบในการศึกษานี้พบว่า การดื้อยาแบบ RIF resistance จากตัวอย่างเสมหะส่วนใหญ่เกิดจากการ mutation ของยีน *rpoB* ตำแหน่ง MUT3 คิดเป็นร้อยละ 33.3 (6 ตัวอย่างจากตัวอย่าง RIF resistance ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ประเทศอินเดียของ Raizadac และคณะ⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้ เสมหะจำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) มียีน *rpoB* ตำแหน่ง wild type band 8 หายและไม่พบ mutation band ใดๆ จากวิธี LPA แต่ไม่พบการดื้อยา RIF จากวิธี Conventional DST ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาหนึ่งจากประเทศอินเดีย⁽¹⁰⁾ แต่พบจำนวนน้อยกว่าการศึกษา

หนึ่งในประเทศไทย (ร้อยละ 53.8) ⁽⁷⁾ ดังนั้นถ้าพบผลการทดสอบ RIF resistance เป็นลักษณะดังกล่าวคือ wild type band 8 หายและไม่พบ mutation band ใดๆ ควรพิจารณาผลการทดสอบความไวต่อยาจากวิธี Conventional DST ร่วมด้วย ส่วนรูปแบบการดื้อยาแบบ INH resistance ส่วนใหญ่เกิดจากการมีการ mutation ของยีน *katG* ตำแหน่ง MUT1 คิดเป็นร้อยละ 65.4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของสุภาวดีและคณะ⁽¹¹⁾

จากการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า ชุดทดสอบ Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ซึ่งใช้หลักการของวิธี LPA สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อวัณโรคคือยาในตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยได้ ซึ่งระยะเวลาในการรายงานผลของวิธี LPA ที่รวดเร็วกว่าวิธีการทดสอบความไวต่อยาแบบดั้งเดิมนั้น จะนำไปสู่การรักษาที่ทันทั่วถึง และอาจส่งผลต่อการลดอัตราการแพร่ระบาดของวัณโรคคือยาได้หากได้รับการตรวจวินิจฉัยและการรักษาที่รวดเร็ว นอกจากนี้ การศึกษานี้ทำให้ทราบข้อมูลความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคที่พบในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ในขั้นตอนการตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์จาก Concentrate smear มีการรายงานผลการทดสอบเป็น Positive คือพบเชื้อ และ Negative คือไม่พบเชื้อ เท่านั้นซึ่งถ้ามีการรายงานผลเป็นแบบบอกระดับจำนวนเชื้อที่พบ (Grading) เช่น Scanty (จำนวนเชื้อที่พบ เช่น 1-9 cells), Positive 1+, 2+, 3+ อาจจะช่วยในการพิจารณาความสอดคล้องของผลการทดสอบและวิเคราะห์ข้อมูลได้มากยิ่งขึ้น เช่น ผลการพบเชื้อในระดับน้อยมาก จาก

Concentrate smear อาจสัมพันธ์หรือสอดคล้องกับค่า Limit of Detection (LOD) ของชุดทดสอบที่ใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงได้ ส่วนหนึ่งเนื่องจากผู้ศึกษาได้ความรู้จากการอบรมนักวิจัยรุ่นใหม่ (ลูกไก่) รุ่นที่ 11 กรมควบคุมโรค ผู้ศึกษาจึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [monograph on the internet]. Geneva: WHO; 2018 [cited 2019 May 29]. Available from: https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. Bureau of Epidemiology. National Disease Surveillance (Report 506). Thailand [cited 2019 May 29]. Available from: http://www.boe.moph.go.th/boedb/surdata/506wk/y61/d32_5261.pdf
3. Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control (2018). National Tuberculosis Control Programme Guideline Thailand 2018 (2nd ed). Bangkok: Department of Disease Control. pp 17-20.
4. Kelly W.S, Kathlew E, Susan K, et al (2014). GLI Mycobacteriology Laboratory Manual (1st ed). Geneva. pp 32-50.
5. World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients

- at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement [internet]. 2008 [cited 2019 July 26]. Available from: https://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf
6. Anek-vorapong R, Chalinthorn S, Podewils LJ, McCarthy K, Ngamlert K, Promsarin B, et al. Validation of the GenoType® MTBDR_{plus} assay for detection of MDR-TB in a public health laboratory in Thailand. BMC Infect Dis 2010; 10: 123.
 7. Suttha P, Panitantum N, Chathaisong P and Thawornwan U. Comparative Efficacy of Line Probe Assay with Conventional Culture for Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Assoc Thai 2018; 101 (7): 883-9.
 8. Suthum K, Tipkrua N, Komolsiri S and Phumpaung P. Efficiency comparison of AnyplexTM MTB/NTM Real-time Detection and AnyplexTM II MTB/MDR Detection with GenoType MTBDR_{plus} Ver2.0 for detection *Mycobacterium tuberculosis* and MDR-TB. J Disease Control 2018; 44 (3): 293-304.
 9. HAIN Lifescience. (2015). Instructions for Use GenoType MTBDR_{plus} VER 2.0 06/2015. [cited 2019 Aug 26]. Available from: <https://www.hain-lifescience.de/packungsbeilage/download>
 10. Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS Malhotra B, Reddy K, Dave P.V, et al. A Multi-Site Validation in India of the Line Probe Assay for the Rapid Diagnosis of Multi-Drug Resistant Tuberculosis Directly from Sputum Specimen. J plos 2014; 9(2).
 11. Boonaiam S, Chaiprasert A, Prammananan T and Leechawengwongs M. Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. Clin Microbiol Infect 2010; 16:396-39