

Considerable Value of Cerebrospinal Fluid Adenosine Deaminase Activity in Early Diagnosis for Tuberculous Meningitis Patients in Ratchaburi Hospital

Katawut Nakhaiem¹, Wijit Wonglumsom² and Kanyanath Piumngam^{3*}

¹Graduate Program in Medical Technology, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (Rangsit Center), Pathum Thani Province, Thailand

²Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakorn Pathom Province, Thailand

³Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (Rangsit Center), Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

Tuberculous meningitis (TBM) causes high mortality and serious complications due to delayed early diagnosis. This study evaluated a diagnostic value of adenosine deaminase activity (ADA) in cerebrospinal fluid (CSF) as a rapid screening test for TBM. Totally 121 patients with suspected symptoms of meningitis were included with 55 cases of TBM and 66 cases of non-TBM. With good performance verification of Diazyme enzymatic method used, ADA activity at a cut off value of 4.35 U/L was able to differentiate TBM from non-TBM by exhibiting a sensitivity of 89.1%, specificity of 80.3%, positive predictive value (PPV) of 79.0% and negative predictive value (NPV) of 89.8%. The mean ADA value was significantly higher (p -value < 0.05) in TBM patients (9.65 ± 8.37 U/L; mean $\pm$ SD) than in non-TBM patients (4.08 ± 8.13 U/L; mean $\pm$ SD). The combination of ADA test and CSF examination increased the sensitivity to 96.3% and had a specificity of 63.6%. In conclusion, determination of cerebrospinal fluid, ADA can be useful for rapid screening in early diagnosis of TBM because the assay is simple, inexpensive and reliable.

Keywords: Tuberculous meningitis, Early diagnosis/Rapid screening, Adenosine deaminase activity

*Corresponding author E-mail address: kanyanath.p@allied.tu.ac.th

คุณค่าของระดับ adenosine deaminase activity ในน้ำไขสันหลังต่อการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรค เยื่อหุ้มสมองอักเสบอย่างรวดเร็วในโรงพยาบาลราชบุรี

คทาวิธ นาคเอี่ยม¹ วิจิตร วงศ์คำชา² และ กัญญาณัฐ เปี่ยมงาม^{3*}

¹บัณฑิตศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ศูนย์รังสิต) จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

วัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตได้สูงและก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง เนื่องจากความล่าช้าในการวินิจฉัยโรค การศึกษานี้เป็นการประเมินคุณค่าของระดับ adenosine deaminase activity (ADA) ในน้ำไขสันหลัง เพื่อการคัดกรองวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบรวดเร็ว โดยใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบทั้งหมด 121 ราย แบ่งเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 55 ราย และที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 66 ราย ใช้ชุดทดสอบ Diazyme ADA ที่มีผลการทำ performance verification ที่ดี ในการวัดระดับ ADA พบว่าที่ค่า cut off = 4.35 U/L ใช้แยกวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากผู้ป่วยที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ โดยมีความไวร้อยละ 89.1 ความจำเพาะร้อยละ 80.3 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 79.0 และ ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 89.8 ค่าเฉลี่ยของระดับ ADA ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (9.65 ± 8.37 U/L; mean $\pm$ SD) สูงกว่าค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (4.08 ± 8.13 U/L; mean $\pm$ SD) อย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$ เมื่อใช้สองการทดสอบร่วมกันทั้ง ADA และ การตรวจน้ำไขสันหลัง พบว่าความไวของการวินิจฉัยโรคสูงขึ้นร้อยละ 96.3 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 73.5 โดยสรุปการตรวจหา ADA ในน้ำไขสันหลังสามารถนำมาใช้คัดกรองเพื่อการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบรวดเร็วได้ เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีความน่าเชื่อถือ

คำสำคัญ: การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบอย่างรวดเร็ว เอนไซม์อะดีโนซีนดีอะมีเนส

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: kanyanath.p@allied.tu.ac.th

รับบทความ: 20 กุมภาพันธ์ 2561

แก้ไขบทความ: 1 เมษายน 2561

รับตีพิมพ์บทความ: 24 กรกฎาคม 2561

บทนำ

วัณโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ (tuberculous meningitis ; TBM) เป็นการติดเชื้อวัณโรคนอกปอดที่มีอัตราการตายและความพิการสูง โดยร้อยละ 50 มีสาเหตุจากได้รับการรักษาล่าช้า การวินิจฉัยที่ถูกต้องทำได้ยาก โดยเฉพาะในระยะแรกของการติดเชื้อเนื่องจากโรคนี้อาจมีอาการทางคลินิกไม่แตกต่างจากโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบอื่นและมีการดำเนินการของโรคช้า^(1, 2, 3) การวินิจฉัยในปัจจุบันอาศัยอาการทางคลินิก ผลการตรวจน้ำไขสันหลังร่วมกับการตรวจ CT scan การตรวจ MRI และประวัติสัมผัสใกล้ชิดผู้ป่วยวัณโรคระยะติดต่อ เป็นต้น การมีอาการแสดงทางคลินิกที่เข้าได้กับวัณโรคร่วมกับการตรวจวินิจฉัยยืนยันทางห้องปฏิบัติการตรวจพบเชื้อวัณโรคจากการย้อมสี acid fast bacilli (AFB) หรือจากการเพาะเชื้ออย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง ถือเป็น definite TBM ส่วนการตรวจวินิจฉัยที่เป็น gold standard คือการตรวจพบเชื้อวัณโรคในน้ำไขสันหลังจากการเพาะเชื้อวัณโรคเท่านั้น แม้จะเป็นวิธีมาตรฐานแต่การเพาะเชื้อวัณโรคมีความไวร้อยละ 25-75 และใช้เวลานาน 4-8 สัปดาห์⁽¹⁻⁵⁾ การย้อมสี AFB มีความไวในการตรวจพบร้อยละ 10-60 ส่วนการตรวจโดยวิธีทางอณูชีววิทยาให้ผลที่รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเชื้อ มีความไวร้อยละ 31-100 และมีความจำเพาะสูงร้อยละ 80-100 ขึ้นกับ primer ที่ใช้⁽⁶⁾ แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป การส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการภายนอกใช้เวลารอผลทดสอบนาน^(5, 6)

Adenosine deaminase (ADA) เป็นเอนไซม์ในกระบวนการสลาย (catabolism) purine base โดยเร่งปฏิกิริยา deamination ของ adenosine และ deoxyadenosine ให้เป็น inosine และ deoxyinosine ตามลำดับ ซึ่งจำเป็นต่อการแบ่งตัวของลิมโฟไซต์ชนิด T cell, B cell และแมคโครฟาจ

แต่พบในลิมโฟไซต์ชนิด T cell มากกว่า โดยเฉพาะ T cell ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อ ถ้าขาดจะทำให้มีลิมโฟไซต์ต่ำ ภูมิคุ้มกันลดลง ADA ประกอบด้วย 2 isoforms คือ ADA1 และ ADA2 โดย ADA1 สามารถพบได้ในทุกเซลล์แต่จะมีปริมาณสูงใน lymphoid tissues ส่วน ADA2 พบได้มากในโมโนไซต์ และแมคโครฟาจ มีการตรวจวัดระดับ ADA เพื่อวินิจฉัยวัณโรคนอกปอด (extrapulmonary tuberculosis) เพราะสามารถตรวจพบ ADA ได้ใน pleural, ascites, peritoneal, pericardial และ cerebrospinal fluid ระดับของ ADA ที่สูงขึ้นเนื่องมาจากการที่แอนติเจนของเชื้อ mycobacteria ในน้ำไขสันหลังกระตุ้น T cell ซึ่งระดับ ADA จะสูงขึ้นได้ในภาวะ active cellular immunity และภาวะอื่นๆ เช่น rheumatoid arthritis, hematologic malignancy, lymphoma เป็นต้น⁽⁷⁻⁹⁾ การวิเคราะห์ระดับ ADA ในน้ำไขสันหลังมีรายงานค่าความไวร้อยละ 55.9-98.46 และความจำเพาะร้อยละ 83.33-97.65⁽¹⁰⁻²¹⁾ โดยมีความแตกต่างของวิธีที่ใช้ทดสอบและค่า cut off เพื่อการวินิจฉัยซึ่งมีค่าตั้งแต่ 5.0-15.5 U/L^(2, 7, 9, 24) การศึกษาส่วนใหญ่ทำในเอเชีย ได้แก่ อินเดีย เนปาล และบังกลาเทศ ในประเทศไทยมีการศึกษาของ Chotmongkol และคณะ ในปี พ.ศ. 2549 รายงานค่าความไวร้อยละ 75 และความจำเพาะร้อยละ 93 โดยใช้หลักการของ Guisti ในการทดสอบ⁽²⁰⁾ ซึ่งมีข้อจำกัดคือเป็นการวัดแอมโมเนีย ดังนั้นในผู้ป่วยที่มีภาวะแอมโมเนียในเลือดสูง เช่น มีความผิดปกติที่เป็นโรคตับ หรือโรคติดเชื้อ แอมโมเนียสามารถผ่าน blood-brain barrier เข้าสู่สมองได้ ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้^(22, 23) จากการทำ meta-analysis โดย Xu และคณะ ในปี พ.ศ. 2553, Turon และคณะ ในปี พ.ศ. 2553 และ Pormohammad และคณะ ในปี พ.ศ. 2560 สนับสนุนให้ใช้ ADA เป็นตัวบ่งชี้สำหรับ

วินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมอง โดยมีความไวร้อยละ 79, 84, 89 และความจำเพาะร้อยละ 91, 84, 91 ตามลำดับ^(9, 16, 39) ปัจจุบันมีชุดตรวจ Diazyme ADA สำหรับใช้กับเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งน้ำยามีความคงตัวสูง มีการเทียบมาตรฐาน (standardization) ราคาไม่แพง และไม่มีการรบกวนจากแอมโมเนียในตัวอย่าง^(23, 26-27) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการใช้ระดับ ADA ในน้ำไขสันหลังเพื่อการตรวจคัดกรองวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบอย่างรวดเร็ว ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Diazyme ADA โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างน้ำไขสันหลังที่เหลือจากการส่งตรวจประจำวัน จำนวน 121 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบโดยการวินิจฉัยของแพทย์^(4, 25, 30, 31) ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2560 น้ำไขสันหลังเก็บแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C สามารถเก็บได้นาน 3 เดือน⁽²⁸⁻²⁹⁾ ตรวจวิเคราะห์ adenosine deaminase (ADA) activity ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป Diazyme ADA (Diazyme laboratories, USA) ใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Architect ci 8200 Abbott diagnostics, USA.) โดยมีเกณฑ์การคัดออก (exclusion criteria) ได้แก่ น้ำไขสันหลังที่มีเม็ดเลือดแดงปนเปื้อนหรือพบลักษณะเป็นก้อน (clot) ตัวอย่างมีปริมาตรน้อยกว่า 1 มิลลิลิตร และเก็บไว้นานเกิน 24 ชั่วโมงโดยไม่แช่เย็นหรือแช่แข็ง

การศึกษานี้ได้รับอนุมัติรับรองการยกเว้นการพิจารณาจริยธรรม โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (COE No. 022/2559) และได้รับอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลราชบุรี (COA-RBHEC 011/2016)

2. การจำแนกกลุ่มผู้ป่วย

2.1 กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (TBM) จำนวน 55 ราย

เกณฑ์วินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) definite TBM มีการตรวจพบ AFB ในน้ำไขสันหลังหรือเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังพบเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) หรือการทดสอบ PCR สำหรับ *M. tuberculosis* ให้ผลบวกจำนวน 7 ราย 2) probable TBM มีการตรวจพบ AFB ในสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำไขสันหลัง หรือมีการติดเชื้อวัณโรคที่อวัยวะอื่นจำนวน 15 ราย 3) possible TBM มีลักษณะทางคลินิก และผลการตรวจน้ำไขสันหลังทางห้องปฏิบัติการเข้าได้กับโรค แต่ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค^(30, 31) จำนวน 33 ราย

2.2 ตัวอย่างผู้ป่วยที่สงสัยโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากสาเหตุอื่น (non-TBM) จำนวน 66 ราย

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคจากอาการทางคลินิกร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ 1) bacterial meningitis (BM) จำนวน 9 ราย โดยการเพาะเลี้ยงน้ำไขสันหลังพบแบคทีเรียทุกราย 2) cryptococcal meningitis (CM) จำนวน 18 ราย โดยการทำ India ink และการตรวจ cryptococcal antigen ให้ผลบวก และการเพาะเลี้ยงน้ำไขสันหลังพบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทุกราย 3) viral meningitis (VM) จำนวน 23 ราย โดยผลการเพาะเชื้อจากน้ำไขสันหลังไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย รา และ mycobacteria ผลการทดสอบ CSF-PCR สำหรับ *M. tuberculosis* ให้ผลลบ การตรวจ cryptococcal antigen ให้ผลลบ การตรวจหาไวรัสด้วยวิธี PCR หรือการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะตรวจหาให้ผลบวก 4) non-infective meningitis (NFM) เป็นกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ว่าเป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบไม่ติดเชื้อ จำนวน 16 ราย

3. วิธีการ

3.1 Analytical performance verification

ประเมินประสิทธิภาพน้ำยา Diazyme ADA assay commercial kit โดยใช้ ADA control level 0 ที่มีค่า 9.8 U/L ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ cut off value ศึกษา accuracy และ precision เพื่อหาค่า % CV และ % bias สำหรับทำ QC planning

3.1.1 การทดสอบค่าความแม่นยำ (precision)

Within-run precision วิเคราะห์ control ภายในวันเดียว โดยวิเคราะห์อย่างน้อย 20 ครั้ง ($n = 26$), between-run precision วิเคราะห์ control วันละครั้งติดต่อกันเป็นเวลา 20 วัน คำนวณ ค่าเฉลี่ย ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความแปรปรวน เกณฑ์ที่ยอมรับค่า imprecision คือ within-run precision % CV ≤ 0.25 TEa และ between-run precision % CV ≤ 0.33 TEa, (TEa = 16.7)⁽³²⁾

3.1.2 การทดสอบค่าความถูกต้อง (accuracy)

จากการทดสอบ precision นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า inaccuracy ในรูป % bias

$$\% \text{ bias} = \frac{[\text{assayed value} - \text{certified value}]}{\text{certified value}} \times 100$$

3.1.3 การทำ QC planning

การวิจัยนี้ใช้ EZ rules 3 QC design software ในการคำนวณ sigma metrics, OPSpects chart และ power function graphs หา probability of error detection (P_{ed}) และ probability of false rejection (P_{fr}) ในการเลือก control rules เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ ADA⁽³³⁾

3.2 การทดสอบ ADA และการประเมินเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ ADA ในน้ำไขสันหลัง

ตรวจ ADA ในน้ำไขสันหลังสัปดาห์ละครั้ง โดยใช้เครื่องตรวจสอบเคมีอัตโนมัติ Architect ci8200 ประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพ ADA ดังนี้ 1) ใช้ตาราง 2×2 เปรียบเทียบผล ADA กับวิธีการวินิจฉัยจาก gold standard ซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อวัณโรคในน้ำไขสันหลังจากการเพาะเชื้อวัณโรค (TB culture) การตรวจชิ้นส่วน DNA ของเชื้อวัณโรค โดยใช้เทคนิค PCR (TB-DNA) และผลการสรุปเวชระเบียนผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรค เชื้อหุ้มสมองอักเสบ (ICD-10 รหัส A170) 2) หาค่า ADA cut off จาก receiver operating characteristics curve (ROC curve) 3) วิเคราะห์ความสัมพันธ์กันของค่า ADA cut off เปรียบเทียบกับ gold standard และ ICD-10 ด้วย Kappa statistics 4) ทดสอบ simultaneously testing ระหว่าง ADA ร่วมกับ CSF examination

3.3 สถิติที่ใช้วิเคราะห์

ใช้ค่าสถิติเชิงพรรณนาในการอธิบายบรรยายลักษณะทั่วไปของข้อมูล ค่าเฉลี่ย (mean) มัธยฐาน (median) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และแผนภาพกล่อง (box plot), Mann-Whitney U test และ Kruskal-Wallis test สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณเปรียบเทียบค่า ADA ในน้ำไขสันหลัง ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ ค่า p -value < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษา analytical performance verification อยู่ในเกณฑ์ที่ดี ดังนี้

ค่า % CV ที่ได้จากการทำ within-run precision และ between-run precision คือ 3.59 และ 2.82 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 4.18 (0.25 TEa) และ

5.51 (0.33TEa) ตามลำดับ ค่า % mean bias = 0.43 และค่า bias ≤ 0.05 ผลการทำ QC planning พบว่าได้ค่า sigma metric = 5.77 ใช้ control rule: 2.5s, N = 1, R = 1 ที่ $P_{ed} > 94\%$, $P_{fr} = 0.01$

2. ผลการทดสอบ ADA และการประเมินเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ ADA ในน้ำไขสันหลัง

2.1 ผลการทดสอบ ADA ในน้ำไขสันหลัง จากตัวอย่าง CSF ทั้งหมด 121 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ TBM 55 ราย เข้าเกณฑ์การวินิจฉัย definite TBM 7 ราย (TB-DNA positive) คิดเป็นร้อยละ 12.8, probable TBM 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 27.2, possible TBM 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 33 และ non-TBM 66 ราย (CM 18, VM 23, BM 9, NFM 16)

1) ค่า ADA ในกลุ่ม TBM มีค่า mean $\pm$ SD = 9.65 ± 8.73 U/L, median (min - max) = 6.80 (2.80 - 50.1) U/L (definite TBM, mean $\pm$ SD = 16.93 ± 16.15 U/L, median (min - max) = 10.0 (5.5 - 50.1) U/L, probable TBM, mean $\pm$ SD = 7.52 ± 2.83 U/L, median (min - max) = 6.2 (4.4 - 13.3) U/L, possible TBM, mean $\pm$ SD = 8.95 ± 7.25 U/L, median (min - max) = 6.8 (2.8 - 35.4) U/L) ดังแสดงใน Table 1 โดยมีการแจกแจงข้อมูลการกระจายตัวของค่า ADA ใน CSF และการเปรียบเทียบค่า median ในกลุ่ม TBM แสดงโดยใช้ box plot พบว่า definite TBM มีค่า median และการกระจายตัวของข้อมูลมากกว่า probable TBM และ possible TBM ดังแสดงใน Fig. 1

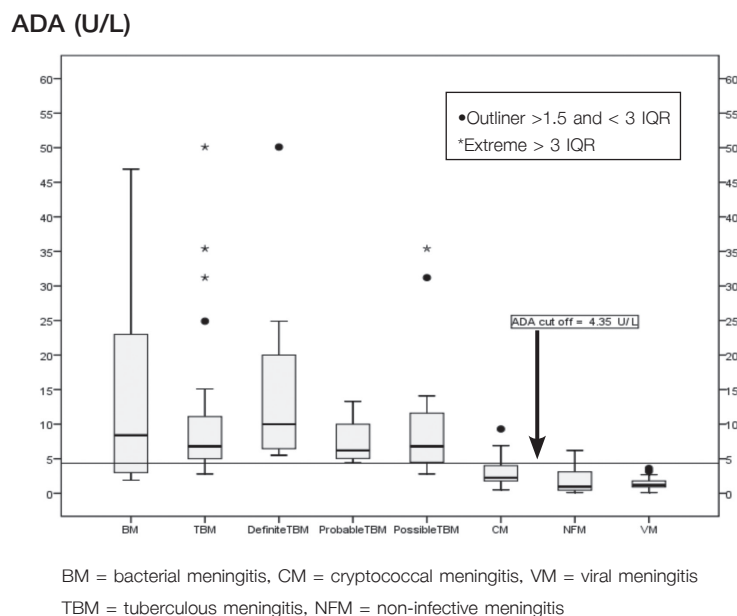


Fig. 1 Box plots of CSF-ADA activity (U/L) distribution in tuberculous and non-tuberculous meningitis. The plots show the 90th percentile (bars), 75th and 25th (box) and median (bar in box). Continuous line represents the best ADA cut off value.

2) ค่ำ ADA ในคูลุ่ม non-TBM โดย BM มีระดับค่ำ ADA < 4.35 U/L จ่ำนวน 3 รำย มีค่ำ mean $\pm$ SD = 16.91 $\pm$ 5.76 U/L, median (min - max) = 8.4 (1.9-46.9) U/L, CM มีระดับค่ำ ADA < 4.35 U/L จ่ำนวน 14 รำย มีค่ำ mean $\pm$ SD = 3.18 $\pm$ 2.31 U/L, median (min - max) = 2.25 (0.50-9.3) U/L, VM มีระดับค่ำ ADA <

4.35 U/L ทุกรำยมีค่ำ mean $\pm$ SD = 1.35 $\pm$ 0.94 U/L, median (min - max) = 1.20 (0.10-3.5) U/L, NFM มีระดับค่ำ ADA < 4.35 U/L จ่ำนวน 14 รำย มีค่ำ mean $\pm$ SD = 1.82 $\pm$ 1.91 U/L, median (min - max) = 0.95 (0.10-6.2) U/L ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Descriptive statistics and results for ADA activity in CSF between TBM and non-TBM group

Groups	Mean $\pm$ SD (U/L)	Median (min - max) (U/L)
TBM (n = 55)	9.65 $\pm$ 8.37	6.80 (2.8-50.1)
- Definite (7)	16.93 $\pm$ 16.15	10.0 (5.5-50.1)
- Probable (15)	7.52 $\pm$ 2.83	6.20 (4.4-13.3)
- Possible (33)	8.95 $\pm$ 7.25	6.80 (2.8-35.4)
Non-TBM (n = 66)	4.08 $\pm$ 8.13	1.85 (0.10-46.9)
- CM (n = 18)	3.18 $\pm$ 2.31	2.25 (0.50-9.30)
- VM (n = 23)	1.35 $\pm$ 0.94	1.20 (0.10-3.50)
- BM (n = 9)	16.91 $\pm$ 5.76	8.40 (1.90-46.9)
- NFM (n = 16)	1.82 $\pm$ 1.91	0.95 (0.10-6.20)

BM = bacterial meningitis, CM = cryptococcal meningitis, VM = viral meningitis

TBM = tuberculous meningitis, NFM = non-infective meningitis

Non-TBM = non tuberculous meningitis

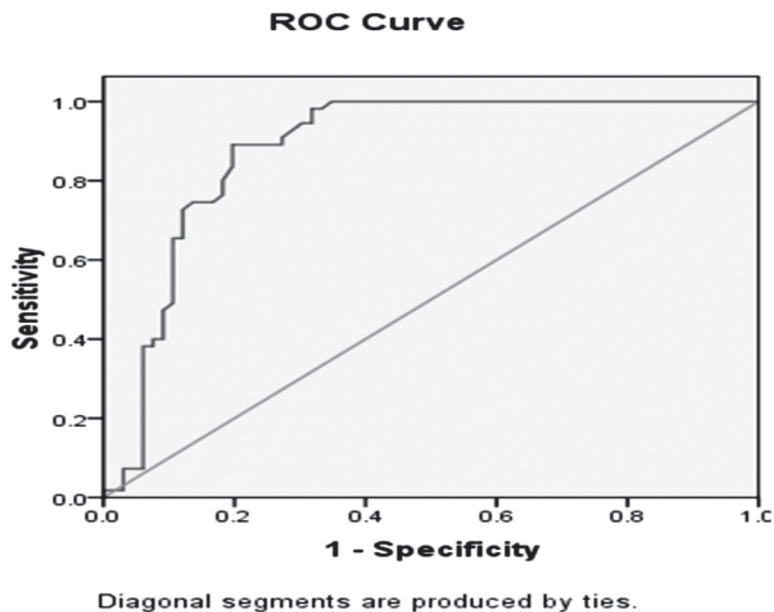
2.2 ผลการประเมินเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ ADA ในน้ำไขสันหลัง

1) การหาค่ำ ADA cut off

ผลการคำนวณหาค่ำ ADA cut off ที่เหมาะสมโดยใช้ ROC curve พบว่ำที่ค่ำ 4.35 U/L ค่ำที่ด่ำที่สุดสำหรับใช้ค้ดกรอง TBM เนื่องจ่ำมีความไวสูงสุด ร้อยละ 89.1 และคว่ำจำเพาะ ร้อยละ 80.3 ค่ำ area under curve (AUC)=0.881, ค่ำ 95% CI (0.792-0.932) ดังแสดงใน Table 2 แลละ Fig. 2

2) การเปรียบเทียบระดับ ADA

ผลการเปรียบเทียบระดับ ADA ใน CSF ทุ้หมดแลละระหว่างคูลุ่ม TBM แลละ non-TBM โดย ใช้สถิติ Kruskal-Wallis test แลละ Mann-Whitney U test ตามล่ำดับ พบว่ำมีความแตกต่างอย่ำงมีนัยสำคัญที่ $p = 0.001$ ($p < 0.05$) แลละมีค่ำ mean, median ที่แตกต่างกัน โดยคูลุ่ม VM, CM แลละ NFM มีค่ำ mean น้อยกว่ำ TBM ส่วนคูลุ่ม BM พบว่ำค่ำ mean แลละ median ม่ำกว่ำคูลุ่ม TBM ดังแสดงใน Table 1 แลละ Fig. 1



Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
0.881	0.035	0.001	0.792	0.930

Fig. 2 The receiver-operating characteristic (ROC) analysis curve for ADA in tuberculous meningitis and non-tuberculous meningitis; ADA cut off values = 4.35 U/L, AUC = 0.881

3) 2x2 Table เปรียบเทียบค่า ADA cut off กับ gold standard และ ICD-10

เมื่อใช้ค่า ADA ≥ 4.35 U/L จะสามารถคัดกรองผู้ป่วย TBM ได้ทั้งหมด 62 ราย เป็นผู้ป่วย TBM จริง 49 ราย และ non-TBM 13 ราย และเมื่อใช้ค่า ADA < 4.35 U/L จะสามารถคัดกรองผู้ป่วย non-TBM ได้จำนวนทั้งหมด 59 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วย non-TBM จริง 53 ราย และผู้ป่วย TBM 6 ราย คำนวณได้ค่าความไวร้อยละ 89.1 ความจำเพาะร้อยละ 80.3 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 79.0 และค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 89.8 ดังแสดงใน Table 3

4) การวิเคราะห์ความสอดคล้องด้วย Kappa statistics

ผลการทดสอบความสอดคล้องกันของค่า ADA cut off = 4.35 U/L กับ gold standard และ ICD-10 ด้วย Kappa statistic ได้ค่า Kappa = 0.66 ซึ่งอยู่ในระดับปานกลางถึงดี

5) Simultaneously testing

จาก Table 3 เมื่อใช้ CSF examination ได้แก่ การตรวจจุลดูโคส โปรตีน และการนับแยกชนิดของเซลล์ (differential cell count) ซึ่งเป็น screening test ในงานประจำวันเพียงอย่างเดียว

Table 2 The effect of different cut-off values of ADA activity on sensitivity and specificity by using ROC curves

ADA cut off value (U/L)	Sensitivity	Specificity	ADA cut off value	Sensitivity	Specificity
2.75	100.0	65.2	9.00	38.2	92.7
3.10	98.2	68.2	10.10	34.5	93.9
4.10	89.1	77.3	11.10	25.5	93.9
*4.35	*89.1	*80.3	12.10	20.0	93.9
4.65	80.0	81.8	12.90	18.2	93.9
5.10	74.5	86.4	14.20	10.9	93.9
5.60	69.1	87.9	21.40	7.3	95.5
6.10	60.0	89.4	28.10	5.5	97.0
7.00	47.3	90.9	33.30	3.6	97.0
7.95	41.8	90.9	44.30	1.8	98.2
8.80	38.2	92.4	48.50	1.8	100.0

* the best ADA cut off value

Table 3 Performance of the best ADA cut off and simultaneous testing for TBM

Test	TBM					Simultaneous testing (ADA + CSF examination)	
	Sens	Spec	PPV	NPV	Kappa	Net-Sens	Net-Spec
ADA cut off 4.35 U/L	89.1	80.3	79	89.8	0.66	96.3	63.6
CSF examination	67.2	66.6	62.7	70.9	0.32		

Sens = sensitivity, Spec= specificity, Net-Sens = net sensitivity, Net-Spec= net specificity

Kappa statistics (Landis & Koch,1997)

0.81-1.00 (excellent), 0.61-0.80 (good), 0.41-0.60 (moderate), 0.21-0.40 (fair)

จะมีค่าความไวร้อยละ 67.2 ความจำเพาะร้อยละ 66.7 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 60.6 ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 70.9 แต่เมื่อใช้ 2 การทดสอบร่วมกัน ทั้ง ADA cut off = 4.35 U/L และ CSF examination พบว่ามีความไวของการวินิจฉัยโรคสูงขึ้นเป็นร้อยละ 96.3 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 63.6 ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการวัดระดับ ADA activity ในน้ำไขสันหลังเพื่อการวินิจฉัยโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ โดยเป็นการศึกษาไปข้างหน้า (prospective study) พบว่าค่า cut off ที่เหมาะสม คือ 4.35 U/L เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบเพื่อการคัดกรองผู้ป่วยวัณโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบออกจากผู้ป่วยโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบจากการติดเชื้ออื่น โดยมีค่าความไวร้อยละ 89.1 และค่าความจำเพาะร้อยละ 80.1 ในขณะที่ค่า cut off = 5.10 U/L มีค่าความไวร้อยละ 74.5 และค่าความจำเพาะร้อยละ 86.4 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาที่ใช้หลักการ Guisti G ของ Donal และคณะ ปี พ.ศ. 2529 และ Mishra และคณะ ปี พ.ศ. 2538⁽³⁴⁻³⁵⁾ ที่ค่า cut off 5.0 U/L มีความไวร้อยละ 70 และ 89 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 99 และ 92 ตามลำดับ การศึกษาที่ Blake และคณะ ปี พ.ศ. 2525⁽³⁴⁻³⁵⁾ Ghosh และคณะ ปี พ.ศ. 2559⁽³⁶⁾ และ Solari และคณะ ปี พ.ศ. 2556⁽¹⁴⁾ เลือกใช้ค่า cut off = 6.0 U/L โดยมีความไวร้อยละ 92, 75 และ 56 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 98, 96 และ 95 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ศึกษาวิจัยโดยใช้น้ำยา Diazyme ADA และตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติ เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ แต่ไม่ได้หาค่า ADA cut off ด้วยตนเอง เป็นการหาค่า ADA cut off ที่อ้างอิงจากการทบทวนวรรณกรรม ได้แก่ การศึกษาของ

Feres และคณะ ปี พ.ศ. 2551 เป็นการเปรียบเทียบระหว่างหลักการ Guisti G และ Diazyme โดยใช้ค่า ADA cut off = 9.0 U/L⁽²⁶⁾ และ Shadia และคณะ ปี พ.ศ. 2558 ใช้ค่า ADA cut off = 10.0 U/L พบว่ามีความไวร้อยละ 79 และความจำเพาะร้อยละ 86⁽¹⁵⁾ แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งหากใช้ค่า ADA cut off = 10.10 U/L จะมีความไวเพียงร้อยละ 35 และมีค่าความจำเพาะร้อยละ 94 จากการพิจารณาพบว่ามีการศึกษาที่แตกต่างกัน โดย Shadia และคณะ ใช้ตัวอย่างน้อย (n = 25) และส่วนใหญ่เป็น definite TBM แต่การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบที่มีจำนวนมากกว่า (n = 55) และตัวอย่างที่ใช้ศึกษาส่วนใหญ่เป็น probable และ possible TBM

การศึกษาของ Ekermans และคณะ ปี พ.ศ. 2560 ซึ่งใช้น้ำยา Diazyme ADA หาค่า cut off โดยใช้ ROC curve ได้ค่า ADA cut off = 2.0 U/L ความไวร้อยละ 85.9 และความจำเพาะร้อยละ 77.7 ถ้าใช้ค่า ADA cut off = 2.8 U/L ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันจะมีความไวร้อยละ 100 และมีความจำเพาะร้อยละ 65.2 แต่การศึกษาของ Ekermans มีข้อจำกัดที่มี selection bias จากการคัดเลือกตัวอย่าง คือมีสัดส่วน TBM ต่อ non-TBM ที่ไม่เหมาะสม คือ 1:38.5 และ inclusion criteria ไม่ชัดเจน ทำให้ได้ค่า ADA cut off ต่ำเกินไป จึงทำให้มี false positive สูงถึงร้อยละ 21⁽³⁷⁾

ส่วนการศึกษาของ Raviraj และคณะ ปี พ.ศ. 2560 ซึ่งใช้น้ำยา Diazyme ADA หาค่า cut off โดยใช้ ROC curve เช่นเดียวกัน ได้ค่า ADA cut off = 6.65 U/L ความไวร้อยละ 85.3 และความจำเพาะร้อยละ 84.3 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 78.3 ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 89.5⁽³⁸⁾ อย่างไรก็ตามค่า ADA cut off = 4.35 U/L เป็นค่าที่อยู่กึ่งกลางระหว่างของ Ekermans และ Raviraj (2.0-6.65

U/L) และเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือได้ค่า ADA cut off < 10.0 U/L การใช้ค่า ADA cut off ที่สูงจะทำให้เกิด false negative สูง แต่ในขณะเดียวกันถ้าใช้ค่า ADA cut off ที่ต่ำจะทำให้เกิด false positive สูงเช่นกัน

จากการศึกษาแบบ meta-analysis โดย Turon และคณะ ปี พ.ศ. 2553 ซึ่งได้เสนอ the ideal cut off สำหรับ TBM = 5.3 U/L ซึ่งมีความไวและความจำเพาะร้อยละ 84⁽⁹⁾ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้ และจากรายงานการศึกษา meta-analysis ของ Xu และคณะ ปี พ.ศ. 2553⁽¹⁶⁾ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ ADA สามารถนำมาใช้วินิจฉัย TBM ได้ที่มีความไวร้อยละ 79 และความจำเพาะร้อยละ 91 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาแบบ systematic review และ meta-analysis โดย Pormohammad และคณะ ปี พ.ศ. 2560 สนับสนุนให้ใช้ ADA ในการตรวจคัดกรองวัณโรคเชื้อหุ้มสมองที่ความไวร้อยละ 89 และความจำเพาะ ร้อยละ 91, AUC = 0.96, Kappa = 0.77⁽³⁹⁾

แม้ว่าหลายการศึกษาจะได้ค่า ADA cut off สูงกว่า โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 9 - 11 U/L แต่สามารถอธิบายได้ว่าน่าจะเกิดจากความแตกต่างกันของการออกแบบการศึกษาในการเลือกกลุ่มประชากรที่ใช้ศึกษา โดยในกลุ่มที่เป็น definite TBM จะมีค่า ADA ค่อนข้างสูง การศึกษาส่วนใหญ่ทำในประเทศที่มีความชุกของโรคสูง ดังนั้น จึงทำให้ได้ค่า cut off สูง การขาดการเทียบมาตรฐาน ของน้ำยา อุปกรณ์ และหลักการวิเคราะห์ที่ใช้ทำให้ขาดความน่าเชื่อถือ จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ADA มีความน่าสนใจสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองวัณโรคเชื้อหุ้มสมองเพื่อลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่ายที่ไม่จำเป็น และลดการสังเคราะห์ TB-DNA ได้ การตรวจ ADA ด้วยวิธีของ Guisti G และวิธีของ Diazyme ADA สามารถนำมาใช้คัดกรอง TBM ได้ แต่วิธีของ

Guisti G จะได้ค่า ADA cut off สูงกว่าวิธีของ Diazyme ADA เนื่องจากน้ำยาที่ใช้ตรวจจากการเทียบมาตรฐาน เกิด false positive จากแอมโมเนียได้ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะแอมโมเนียในเลือดสูง แม้ว่ามีราคาถูกกว่าวิธีของ Diazyme ADA ส่วนวิธีของ Diazyme ADA จะได้ค่า ADA cut off ต่ำกว่าวิธีของ Guisti G เนื่องจากน้ำยามีประสิทธิภาพดี มีการเทียบมาตรฐาน และไม่มี false positive จากแอมโมเนีย จึงทำให้มีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีของ Guisti G

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งมีประสิทธิภาพดี มีความไวสูง ราคาไม่แพง สะดวก รวดเร็ว น่าเชื่อถือ สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทุกระดับ สามารถตรวจได้โดยใช้เครื่องอัตโนมัติทางเคมีคลินิกทั่วไป Diazyme ADA เป็นน้ำยาสำเร็จรูปมีความคงตัวสูง มีอายุการใช้งานนาน มีการเทียบมาตรฐาน จากการศึกษาพบว่ามีประสิทธิภาพดี มีค่าความถูกต้องแม่นยำสูง ถึงแม้ว่าอาจยังมีความสับสนของค่า cut off ที่จะนำมาใช้ แต่จากการศึกษาแบบ meta-analysis โดย Turon และคณะ ปี พ.ศ. 2553 พบว่าระดับ ADA < 3.0 U/L สามารถแยก TBM ออกจาก viral meningitis และ aseptic meningitis⁽²¹⁾ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 89.8 และถ้าใช้ร่วมกับอาการทางคลินิกและผลการตรวจ CSF examination แล้วจะมีความไวมากขึ้น แต่ไม่สามารถใช้ ADA แยก bacterial meningitis ได้⁽⁴⁰⁾ ระดับของ ADA > 10.0 U/L สามารถใช้ช่วยยืนยัน TBM ได้ โดยเฉพาะเมื่อแยก bacterial meningitis และเมื่อนำ ADA มาใช้ตรวจร่วมกับ CSF examination จะทำให้มีความไวเพิ่มเป็นร้อยละ 96.36 ส่วน cryptococcal meningitis พบระดับของ ADA ทั้งสูงและต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ghosh และคณะ ปี พ.ศ. 2559⁽³³⁾ แต่ส่วนใหญ่มีค่า ADA < 4.0 U/L ในราย

ที่ค่าสูงพบว่ามีประวัติเป็นวัณโรคในอวัยวะอื่นที่ไม่ใช่
วัณโรคเยื่อหุ้มสมองร่วมด้วย จำเป็นต้องมีการศึกษา
เพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม bacterial meningitis และ
cryptococcal meningitis สามารถวินิจฉัยได้ง่ายและ
รวดเร็วกว่า TBM โดยใช้ผลยืนยันจากการย้อมสีแก
รม การเพาะเชื้อ (aerobic culture) และ latex
agglutination ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้สำหรับ
กลุ่ม bacterial meningitis เน้นศึกษาเฉพาะ aerobic
bacteria เท่านั้นไม่ครอบคลุมกลุ่ม anaerobic
bacteria และกลุ่มแบคทีเรียที่โตยาก (fastidious
bacteria) ส่วนผลการตรวจยืนยันด้วยวิธี nucleic
acid amplification test (NAAT) TB-DNA
rapid test ให้ผลบวก 7 ราย อาจเนื่องมาจากข้อจำกัด
ของตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยเกินไป < 0.5 มิลลิลิตร
วิธีที่ใช้ตรวจไม่ไวพอ เชื้อมีปริมาณน้อย และขั้นตอน
การเก็บรักษาตัวอย่างไม่ดี เนื่องจากต้องส่งต่อ
ภายนอก ส่วน AFB stain ให้ผล not found ทั้งหมด
ในส่วนของ TB culture แพทย์สั่งตรวจเพียง 12 ราย
ให้ผล no growth ทั้งหมดอาจเนื่องจากใช้เวลานาน
และความไวต่ำจึงไม่นิยมตรวจ ในการศึกษาจึงใช้การ
ยืนยัน TBM โดยการทบทวนเวชระเบียนผู้ป่วย
วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง ICD 10 รหัส A170 เป็นหลัก
สำหรับในประเทศไทยมีการนำการทดสอบ ADA
มาใช้ในการช่วยวินิจฉัยวัณโรคนอกปอดใน pleural
fluid, ascitic fluid และ pericardial fluid แต่การ
ทดสอบ ADA ใน CSF ยังไม่แพร่หลาย การศึกษา
เกี่ยวกับ ADA ใน CSF ยังมีน้อยผู้วิจัยจึงหวังว่า
ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์
ต่อไป อนึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่ครอบคลุมกลุ่ม non
tuberculous mycobacterial meningitis (NTM)
ซึ่งสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมองได้เช่น
เดียวกัน เนื่องจากพบได้น้อยแต่คาดการณ์ว่าน่าจะมี
ระดับของ ADA ที่สูงเช่นเดียวกันกับกลุ่ม TBM
จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

สรุป

วัณโรคเยื่อหุ้มสมองเป็นโรคติดเชื้อที่มีความ
รุนแรง ผู้ป่วยมีอัตราการตายและความพิการสูง แม้
จะเป็นโรคติดเชื้อที่มีความรุนแรงแต่สามารถรักษาให้
หายได้ โดยผู้ป่วยมีความจำเป็นต้องได้รับการรักษา
อย่างทันท่วงที การวินิจฉัยได้ถูกต้องตั้งแต่เริ่มแรก
ยังคงเป็นความท้าทายเพราะอาการทางคลินิกที่ไม่
จำเพาะและการมีเชื้อวัณโรคจำนวนน้อยใน CSF
ปัจจุบันยังไม่มี การทดสอบใดที่มีทั้งความไวและความ
จำเพาะสูงพอที่จะสามารถช่วยวินิจฉัยวัณโรคเยื่อ
หุ้มสมองได้ชัดเจนโดยตรงตั้งแต่เริ่มแรก ผลจากการ
ศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า Diazyme ADA มีความ
ไว และมีความจำเพาะสูง ไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว มีความ
คงตัวสูงและราคาไม่แพง สามารถนำมาใช้คัดกรอง
วัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากผู้ป่วยที่ไม่ใช่วัณโรค
เยื่อหุ้มสมองอักเสบได้ และเมื่อใช้พิจารณาร่วมกับ
ลักษณะอาการทางคลินิกและการตรวจ CSF
examination จะเพิ่มความแม่นยำและความถูกต้อง
มากขึ้น ซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการช่วยสนับสนุน
และยืนยันการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัท ไคไฟ ไอ-เทค จำกัด ที่ให้
ความอนุเคราะห์ให้น้ำยา Diazyme ADA commercial
kit, ADA calibrator และ ADA control ขอขอบคุณ
ท่านผู้อำนวยการ รพ.ราชบุรี ที่อนุญาตให้ทำการวิจัย
เจ้าหน้าที่งานสารสนเทศ รพ.ราชบุรีที่ช่วยสืบค้นข้อมูล
การทำวิจัย และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ
คำปรึกษาการวิเคราะห์สถิติจาก ผศ.ดร.ดวงเนตร
พิพัฒน์สถิตพงศ์ ซึ่งทำให้การวิจัยครั้งนี้ประสบ
ผลสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Nagarathna S, Venakumalee HB, Chandramuki A. Laboratory Diagnosis of Meningitis [Internet]. In: Brobby GW, editors. Meningitis. 2012 [cited 2016 Dec 30]; 186-205. Available from: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/34329.pdf>.
2. Brancusi F, Farrar J, Heemskerk D. Tuberculous meningitis in adult. *J Future Microbiol* 2012; 7: 1101-16.
3. Dejthevaporn J. Tuberculous meningitis. *Thai J Health Sys Res* 2008; 2: 305-18.
4. Boonluksiri P. Prognosis factors of tuberculous meningitis in children. *Songkla Med J* 2002; 20: 182-8.
5. Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control, Ministry of Public Health. National Tuberculosis Control Program Guideline Thailand, 2013. 2nd ed. The War Veterans Organization of Thailand under Royal Patronage of His Majesty the King, Office of Printing Mill September 2013: ISBN 978-616-11-1866-2. (in Thai)
6. Teruyuki T, Masato T, Toshiaki T. The PCR-based diagnosis of central nervous system tuberculosis: Up to date. *J Tuberc Res Treat* 2012; 1: 1-17.
7. Lakkana B, Sasisophon K. Use of adenosine deaminase for the diagnostic of tuberculosis. *J Infect Dis Antimicrob Agent* 2010; 27: 111-8.
8. Barrua R, Hossain MA. Adenosine deaminase in diagnosis of tuberculosis. *AKMMC J* 2014; 5: 43-8.
9. Tuon FF, Higashino HR, Lopes MIBF, *et al.* Adenosine deaminase and tuberculous meningitis; A systematic review with meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 198-207.
10. Gupta BK, Bharat A, Debapriya B, Baruah H. Adenosine deaminase levels in CSF of tuberculous meningitis patients. *J Clin Med Res* 2010; 2: 220-4.
11. Karsen H, Koruk ST, Karahocagil MK, Calisir C, Baran FC. Comparative analysis of cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in meningitis. *J Swiss Med Wkly* 2011; 141: 1-5.
12. Jasani JH, Bhuva KV, Vachhani AB, Patel VR, Sancheti SM, Patel M. Value of adenosine deaminase level for the differential diagnosis various meningitis. *Int J Biol Med Res* 2012; 2: 1644-7.
13. Ruiz JP, Ramos V, Dueñas C, *et al.* Rational application of adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid for the diagnosis of tuberculous meningitis. *J infect* [Internet]. 2015 [cited 2016 Dec 30]; 43: 531-5. Available from: [http://www/springer.com/content/pdf/10.1007/s15010-015-0777-7.pdf](http://www.springer.com/content/pdf/10.1007/s15010-015-0777-7.pdf).
14. Solari L, Soto A, Agapito JC, Acurio V, Vargas D, Battaglioli T. The validity of cerebrospinal fluid parameters for the diagnosis of tuberculous meningitis. *Int J Infec Dis* 2013; 17: 1111-5.

15. Shadia K, Kamal SM, Saleh AA, Hossain MN, Gupta RD, Miah RA. Adenosine deaminase assay indifferent body fluids for the diagnosis of tubercular infection. *Am J Biomed Life Sci* 2015; 3: 49-54.
16. Xu H, Jiang R, Li L, Sha W, Xiao H. Diagnostic value of adenosine deaminase in CSF for tuberculous meningitis: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14: 1382-7.
17. Pan A, Biswas A, Chatterjee A, Kumar R. Evaluation of cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity as a complimentary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis in children. *J Coll Med Sciences-Nepal* 2012; 2, 17-23.
18. Agarwal AK, Bansal S, Nand V. A Hospital based study on estimation of adenosine deaminase activity (ADA) in CSF in various types of meningitis. *J Clin Diagnostic Res* 2014; 2: 73-6.
19. Baheti R, Laddha P, Gehlot RS. CSF-ADA activity in various type of meningitis. *J Indian Acad Clin Med* 2001; 2: 285-7.
20. Chotmongkol V, Teerajetgul Y, Yodwut C. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity for the diagnosis of tuberculous meningitis in adults. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 948-52.
21. Kashyap RS, Kainthla RP, Mudaliar AV, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity: A complementary tool in the early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Cerebrospinal Fluid Res* 2006; 3: 1-6.
22. Bergmeyer HU, Giusti G. Adenosine deaminase: Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, 1974: 1092-7.
23. Delacour H, Bousquet A, Fontan E, Ceppa F. Ammonia does not interfere with the diazyme adenosine deaminase test. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 225-6.
24. Cherian A, Thomas SV. Central nervous system tuberculosis. *J Afr Health Sci* 2011; 11: 116-27.
25. Sribussara P, Rusmeechan S. Bacterial meningitis in Buddhachinaraj Hospital during 1998-2003. *Buddhachin Med J* 2553; 2: 158-69.
26. Feres MC, De Martino MC, Maldijian S, Batista F, Gabriel JA, Tufik S. Laboratoria I validation of an automated assay for the determination of adenosine deaminase activity in pleural fluid and cerebrospinal fluid. *J Bras Pneumol* 2008; 34: 1033-9.
27. Delacour H, Sauvanet C, Ceppa F, Burnat P. Analytical performances of the Diazyme ADA assay on the Cobas® 6000 system. *J Clin Biochem* 2010; 43: 1468-71.

28. Gupta BK, Parul G, Haren B, Preeti S, Jas K. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase: its evaluation as a marker for diagnosing tuberculous meningitis in paediatric patients. *J Dent Med Sci* 2013; 4: 21-4.
29. Sutunya Srisaengkaew. Analysis of Body Fluid. In: Mana Rojanawit Nont, Editor. *Clinical Pathology*. 2nd ed. Bangkok: D-TRIO Publishing, 2556: 676-83. (in Thai)
30. Marais S, Thwaites G, Schoeman JF, *et al*. Tuberculous meningitis: a uniform case definition for use in clinical research. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 803-12.
31. Pleumpanupat P. Tuberculous Meningitis in Adult: Review of 178 cases. *Thai J Tuberc Chest Dis Crit Care* 2013; 34: 1-13.
32. Ricos C, Alvarez V, Cava F, *et al*. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 491-500.
33. Westgard JO. EZ rules 3 QC design software. Westgard QC Inc. copyright 2008-2013.
34. Rock RB, Olin M, Baker CA, Molitor TW, Peterson PK. Central nervous system: Pathogenesis and clinical aspects. *J Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 243-61.
35. Skarar D, Hossain I, Shoab A, Amin R. Adenosine deaminase in tuberculous meningitis. *Bangladesh J Med* 2014; 25: 61-71.
36. Ghosh GC, Sharma B, Gupta BB. CSF ADA determination in early diagnosis of tuberculous meningitis in HIV-infection patients. *J Scientifica* [Internet]. 2016 [cited 2016 March 20]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2016/5820823/>.
37. Ekermans P, Dusé A, George J. The dubious value of cerebrospinal fluid adenosine deaminase measurement for the diagnosis of tuberculous meningitis. *J BMC Infect Dis* 2017; 17: 104-14.
38. Raviraj, Henry RA, Rao GG. Determination and validation of a lower cut off value of cerebrospinal fluid adenosine deaminase (CSF-ADA) activity in diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Diag Res* 2017; 11: 22-4.
39. Pormohammad A, Riahi SM, Nasiri MJ, *et al*. Diagnostic test accuracy of adenosine deaminase for tuberculous meningitis: A systematic review and meta-analysis. *J Infect* 2017; 74: 545-54.
40. Torok ME. Tuberculous meningitis. *Advances in diagnosis and treatment. Br Med Bull* 2015; 113: 117-31.