

Preliminary Study of AFB Smear, Tuberculosis Cultivation and Drug Susceptibility Testing of Hypertonic Saline-Sodium Hydroxide-Treated Sputum Specimens

Anugoon Bunkhong^{1, 2}, Wjit Wonglumsom³ and Duangnate Pipatsatitpong^{1*}

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

²*The Office of Disease Prevention and Control No.3, Nakhon Sawan Province, Thailand*

³*Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand*

Abstract

Diagnosis and drug susceptibility testing (DST) of tuberculosis (TB) is necessary for proper treatment of TB patients. Preparation of sputum samples are important for performing concentrated acid-fast bacilli (AFB) smear, culture and both genotypic and phenotypic DST. Hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) has recently been developed for preparation of concentrated sputum smear and culture but no reports have yet been found on the use of this method for genotypic DST. This study was a preliminary study on concentrated AFB smear, culture, genotypic line probe assay (LPA) DST and phenotypic BACTEC MGIT 960 System DST of sputum specimens treated by hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method. Of 227 sputa, each sample was divided into two equal portions. The paired samples underwent preparation by the HS-SH and N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) methods. AFB smear, culture and DST were performed. The results revealed that AFB smear and culture between HS-SH and NALC-NaOH were in 100% agreement (Kappa=1.00) and 94.3% agreement (Kappa=0.76), respectively. Most DST results obtained from each LPA and BACTEC MGIT 960 System methods were pan-susceptible pattern in 82.9% and 75.0% of all patterns, respectively, while multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) patterns were 7.9% and 5.7%, respectively. Both DST methods yielded an excellent concordance of isoniazid (INH), rifampicin (RMP) and

*Corresponding author E-mail address: duangnat@tu.ac.th, duangnate_pipat@hotmail.com

MDR-TB results. The percent agreement values of susceptibility for INH, RMP and MDR-TB were 95.1%, 97.6% and 97.6%, respectively and the kappa statistic values were 0.88, 0.91 and 0.91, respectively. This preliminary study showed that AFB smear, culture, genotypic line probe assay (LPA) DST and phenotypic BACTEC MGIT 960 System DST can be performed on sputum specimens prepared by HS-SH method.

Keywords: Hypertonic saline-sodium hydroxide, Drug susceptibility testing (DST), Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)

การศึกษาขั้นต้นการทำเอเอฟบีสเมียร์ การเพาะเชื้อวัณโรค และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของตัวอย่างเสมหะที่เตรียมด้วยวิธี Hypertonic Saline-Sodium Hydroxide

อนุกุล บุญคง^{1, 2} วิจิตร วงศ์ล้ำชา³ และ ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์^{1*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์

³ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

การวินิจฉัยและการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคมีความจำเป็นต่อการรักษาผู้ป่วย การเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นมีความสำคัญในการทำเอเอฟบีสเมียร์ (AFB smear) การเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทั้งวิธีจีโนไทป์และวิธีฟีโนไทป์ โดยวิธี hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นสำหรับการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อ แต่ยังไม่มีการนำไปใช้ในการเตรียมตัวอย่างทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีจีโนไทป์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำ เอเอฟบีสเมียร์ การเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีจีโนไทป์ line probe assay (LPA) และวิธีฟีโนไทป์ BACTEC MGIT 960 System ของตัวอย่างเสมหะที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH โดยเสมหะ 227 ตัวอย่าง ถูกแบ่งเป็นสองส่วนเท่ากันและผ่านการเตรียมตัวอย่างเสมหะด้วยวิธี HS-SH และวิธี N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) เพื่อทำ เอเอฟบีสเมียร์ เพาะเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ผลการศึกษาพบว่าการทำ เอเอฟบีสเมียร์ ให้ผลตรงกันร้อยละ 100 ($Kappa = 1.00$) และการเพาะเชื้อให้ผลตรงกันร้อยละ 94.3 ($Kappa = 0.76$) ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทั้งวิธี LPA และ BACTEC MGIT 960 System พบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ให้ผลไวต่อยาร้อยละ 82.9 และ 75.0 ตามลำดับ โดยพบวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB) ร้อยละ 7.9 และ 5.7 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่ทดสอบด้วยวิธีทั้งสองร่วมกันพบว่าผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค isoniazid

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: duangnat@tu.ac.th, duangnate_pipat@hotmail.com

รับบทความ: 8 มกราคม 2562

แก้ไขบทความ: 21 กุมภาพันธ์ 2562

รับตีพิมพ์บทความ: 11 ธันวาคม 2562

(INH), rifampicin (RMP) และการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานมีความสอดคล้องกันในระดับดีเยี่ยม (excellent) โดยค่า % agreement เท่ากับ 95.1, 97.6 และ 97.6 ตามลำดับ Kappa = 0.88, 0.91 และ 0.91 ตามลำดับ การศึกษาขั้นต้นนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี HS-SH สามารถใช้เตรียมตัวอย่างเหมาะสมสำหรับการทำ เอเอฟบีสเมียร์ การเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยตรงด้วยวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System ได้

คำสำคัญ: Hypertonic saline-sodium hydroxide การทดสอบความไวต่อยา วัณโรคดื้อยาหลายขนาน

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis; TB) เป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (mycobacteria) กลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) โดยเชื้อสำคัญที่พบก่อโรคในคนมากที่สุด คือ *Mycobacterium tuberculosis*⁽¹⁻³⁾ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้คาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2560 มีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลกประมาณ 10 ล้านราย โดยมีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาริฟัมปีซิน ซึ่งเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในกลุ่มยาต้านวัณโรคแนวที่ 1 (first-line drug) ประมาณ 558,000 ราย ซึ่งร้อยละ 82 ของผู้ป่วยที่ดื้อยาริฟัมปีซิน เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (multi-drug-resistant tuberculosis: MDR-TB) และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรค 1.3 ล้านราย สำหรับประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้จัดให้เป็น 1 ใน 14 ประเทศที่พบปัญหาของวัณโรค ได้แก่ วัณโรคดื้อยาหลายขนาน และวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) และพบอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ในปี พ.ศ. 2560 ถึง 108,000 ราย หรือคิดเป็นอัตรา 156 รายต่อแสนประชากร โดยมีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาริฟัมปีซิน และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน จำนวน 2,700 ราย ซึ่งพบเป็นร้อยละ 2.2 ของกลุ่มผู้ป่วยใหม่ (new cases) และร้อยละ 24 ของกลุ่มผู้ป่วยที่เคยรักษาวัณโรคมาก่อน (previously treated cases)⁽⁴⁾

วิธีดั้งเดิมในการวินิจฉัยวัณโรคคือ การสเมียร์เสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทนกรด (AFB smear; เอเอฟบีสมียร์) ซึ่งทำได้ทั้งการสเมียร์จากตัวอย่างโดยตรง (direct smear) และการสเมียร์ตัวอย่างแบบเข้มข้น (concentrated smear) ซึ่งช่วยเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการเพาะเชื้อซึ่งปัจจุบันยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน

(gold standard) ในการวินิจฉัยวัณโรค และด้วยสถานการณ์ปัจจุบันที่มีการดื้อยาของเชื้อวัณโรคเพิ่มมากขึ้น การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค โดยเฉพาะยาต้านวัณโรคแนวที่ 1 จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้การรักษารักษาผู้ป่วยมีความถูกต้องเหมาะสม โดยวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคสามารถแบ่งเป็น 2 แบบ ตามหลักการทดสอบ ได้แก่ การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคแบบฟีโนไทป์ (phenotypic drug susceptibility testing) และแบบจีโนไทป์ (genotypic drug susceptibility testing) สำหรับการทดสอบแบบฟีโนไทป์สามารถทำได้ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยดูการแสดงออกของเชื้อในอาหารที่มียาเทียบกับในอาหารที่ไม่มียา ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค⁽⁵⁾ การทดสอบแบบฟีโนไทป์ต้องใช้เชื้อมีชีวิตที่เพาะในอาหาร จึงใช้เวลานานมากกว่าหนึ่งเดือนจึงจะทราบผล ส่วนการทดสอบในอาหารเหลวมีการพัฒนาเครื่องทดสอบอัตโนมัติ โดยวิธีมาตรฐาน คือ BACTEC MGIT 960 System (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) ซึ่งใช้ยาผสมลงในอาหารเหลวแล้วดูการเจริญของเชื้อวัณโรคเปรียบเทียบระหว่างหลอดอาหารที่มียากับหลอดที่ไม่มียา เครื่องจะตรวจวัดปริมาณเชื้อที่เจริญแล้วรายงานผลเป็นไอ (susceptible) หรือดื้อ (resistant) ต่อยา สามารถรายงานผลได้เร็วกว่าการทดสอบในอาหารแข็ง 2-3 สัปดาห์ และทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคแนวที่ 1 ได้ครบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampicin (RMP), ethambutol (EMB) และ pyrazinamide (PZA) สำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคแบบจีโนไทป์ซึ่งปัจจุบันได้รับการพัฒนาขึ้น โดยใช้หลักการทางอณูชีววิทยา (molecular biology) ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อวัณโรค วิธีนี้ช่วยให้ทราบผลการทดสอบความไวต่อยา

ด้านวัณโรคได้เร็วขึ้นภายใน 1-7 วัน วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ real-time PCR, GeneXpert และ line probe assay (LPA) เป็นต้น โดยวิธีมาตรฐานของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคแบบจีโนไทป์ คือ วิธี LPA และน้ำยาที่องค์การอนามัยโลกแนะนำ ได้แก่ GenoType MTBDR_{plus} (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) ซึ่งสามารถตรวจการดื้อยาต้านวัณโรคได้ 2 ชนิด คือ INH และ RMP⁽⁶⁾

ในการวินิจฉัยวัณโรคด้วยการตรวจ AFB การเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ตัวอย่างส่วนใหญ่มักเป็นเสมหะ เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่นิยมใช้วินิจฉัยวัณโรคปอด ซึ่งเป็นอวัยวะที่พบการติดเชื้อมากกว่าอวัยวะอื่น และมีความสำคัญต่อการป้องกันควบคุมโรคที่แพร่ผ่านทางเดินหายใจเป็นหลัก กระบวนการทดสอบจำเป็นต้องมีการเตรียมตัวอย่างก่อน โดยการย่อยและกำจัดเชื้อปนเปื้อน (digestion and decontamination) และทำให้เข้มข้นด้วยการปั่นตกตะกอน เพื่อใช้เตรียม เอเอฟบีเอสเมียร์ อีกส่วนหนึ่งใช้เพาะเชื้อ เพื่อนำไปทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคแบบพีโนไทป์ และส่วนที่เหลือนำไปทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีจีโนไทป์ วิธีมาตรฐานในการเตรียมตัวอย่างเสมหะ ได้แก่ วิธี N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH)^(7,8) ซึ่งมีกระบวนการเตรียมน้ำยาที่ค่อนข้างยุ่งยาก เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการคิดค้นวิธี hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) สำหรับใช้ในการย่อยและกำจัดเชื้อปนเปื้อนในเสมหะ⁽⁹⁾ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้น (concentrated sputum smear) และการเพาะเชื้อวัณโรค สามารถเตรียมได้ง่ายและราคาถูก^(10,11) แต่วิธีนี้ยังไม่ได้มีการนำมาใช้ในประเทศไทย รวมทั้งยังไม่มีมีการนำมาใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะสำหรับการตรวจ LPA จึงนำมาสู่การทำวิจัยในครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเบื้องต้นการเตรียม

เสมหะเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH เพื่อทำสเมียร์เข้มข้นสำหรับตรวจหาเชื้อ AFB การเพาะเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA และ BACTEC MGIT 960

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยจากโรงพยาบาลต่าง ๆ ในจังหวัดนครสวรรค์และจังหวัดใกล้เคียงที่ส่งมาตรวจวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 โดยคัดเลือกตัวอย่างเสมหะที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำวัน ที่เป็นตัวอย่างส่งตรวจวินิจฉัยวัณโรคและตัวอย่างติดตามการรักษาวัณโรค ซึ่งอยู่ระหว่างการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคแนวที่ 1 ที่พ้นการรักษาระยะเข้มข้น คือ ตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไป ตามขนาดตัวอย่าง จำนวน 227 ตัวอย่าง เพื่อนำมาเตรียมเสมหะสำหรับทำสเมียร์ตรวจหาเชื้อ AFB เพาะเชื้อวัณโรค และทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมในมนุษย์ โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 3 (ECSCTU 013/2558)

2. ขั้นตอนการศึกษา

2.1 การเปรียบเทียบการเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อระหว่างวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH

แบ่งเสมหะแต่ละตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน แล้วสุ่มอย่างง่ายเพื่อเลือกใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นและเพาะเชื้อด้วยวิธี HS-SH ส่วนหนึ่งและอีกส่วนหนึ่งดำเนินการด้วยวิธี NALC-NaOH

2.1.1 การเตรียมเสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อด้วยวิธี HS-SH⁽⁹⁻¹²⁾

เตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH ซึ่งดัดแปลงจากวิธีที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใส่น้ำยา HS-SH (ส่วนผสมของสารละลาย 4% NaOH และ 10% NaCl ในปริมาตรที่เท่ากัน) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรเสมหะ ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเมื่อผสมกับตัวอย่างเสมหะแล้วเท่ากับ 1.0% NaOH และ 2.5% NaCl จากนั้นผสมเสมหะและน้ำยาให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วเติมน้ำยา phosphate-buffered saline (PBS) pH 6.8 จนได้ปริมาตรรวม 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนแรงเหวี่ยงสูง ใช้ความเร็ว 3,000g (relative centrifugal force: RCF) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่ได้ผสมกับน้ำยา PBS pH 6.8 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ได้เป็นตัวอย่างเสมหะเข้มข้นโดยใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว MGIT และทำสมิเยร์เสมหะเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB ย้อมด้วยวิธี Ziehl–Neelsen ตัวอย่างที่เหลือเก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส

2.1.2 การเตรียมเสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อด้วยวิธี NALC-NaOH^(7, 8)

เตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยวิธี NALC-NaOH โดยเติมน้ำยา NALC-NaOH (ส่วนผสมของสารละลาย 4% NaOH และ 2.9% sodium citrate ในปริมาตรที่เท่ากัน) แล้วเติมน้ำยา NALC ให้ได้ความเข้มข้น 0.5%) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรเสมหะซึ่งทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเมื่อผสมกับตัวอย่างเสมหะแล้วเท่ากับ 1.0% NaOH, 0.725% sodium citrate และ 0.25% NALC จากนั้นผสมเสมหะและน้ำยาให้เข้ากันด้วย vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที โดยขั้นตอนหลังจากนี้ทำเช่นเดียวกับวิธี HS-SH

2.1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบผลสมิเยร์เสมหะเข้มข้น

(เอเอฟบีสมิเยร์) และการเพาะเชื้อระหว่างวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH วิเคราะห์ผลโดยใช้ค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) % agreement และค่า Kappa

2.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยใช้ตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH

2.2.1 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA⁽¹³⁾

การทดสอบ LPA ด้วยน้ำยา Geno-Type MTBDR_{plus} VER 2.0 เริ่มจากสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ด้วยน้ำยา Genolyse ตามเอกสารกำกับน้ำยา โดยใช้ตัวอย่างเสมหะเข้มข้น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สกัดโดยใช้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (amplification) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมในน้ำยา Master mix เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ด้วยเครื่อง GTQ-Cycler 24 จากนั้นนำ PCR product ไปทำ hybridization ด้วยเครื่อง GT-Blot 48 โดยเตรียมผสมน้ำยา denaturation (DEN) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของภาชนะทดสอบของเครื่อง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำภาชนะใส่ลงในตัวเครื่อง GT-Blot 48 แล้ววาง strip ลงในแต่ละหลุมของภาชนะตามลำดับตัวอย่าง เพื่อให้เครื่องทำ hybridization ด้วยหลักการ reverse hybridization เมื่อเสร็จกระบวนการนำ strip มาอ่านและแปลผล โดยบน strip มี probe ตรวจจับการดื้อยา RMP ซึ่งจำเพาะกับยีน *rpoB* ประกอบด้วย 8 wild-type probe และ 4 mutation probe ส่วนการดื้อยา INH มี probe ที่จำเพาะกับ 2 ยีน ได้แก่ ยีน *katG* ประกอบด้วย 1 wild-type probe และ 2

mutation probe และยีน *inhA* ประกอบด้วย 2 wild-type probe และ 4 mutation probe

2.2.2 การทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System⁽¹⁴⁾

นำเชื้อที่เจริญในอาหาร MGIT ซึ่งพิสูจน์ชนิดแล้วว่าเป็นเชื้อวัณโรคด้วยชุดตรวจแบบเร็ว SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Gyeonggi-do, Republic of Korea) มาทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรค 4 ชนิด ได้แก่ SM, INH, RMP และ EMB โดยเติมยาที่ละลายด้วยน้ำกลั่นลงในหลอดอาหาร MGIT ตามชนิดของยา หลอดละ 100 ไมโครลิตร หลอดสุดท้ายไม่เติมยา ใช้เป็น growth control แล้วดูดส่วนใส (supernatant) ของตัวอย่างเชื้อที่เพาะในอาหาร MGIT ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่หลอดอาหาร MGIT ที่มียา สำหรับหลอด growth control เติมเชื้อจากส่วนใสที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1:100 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าเครื่อง BACTEC MGIT 960 System ซึ่งมีโปรแกรม EpiCenter System แปลผลการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคได้ 2 แบบ คือ เชื้อไวต่อยาและเชื้อดื้อยา

2.2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสอดคล้องของผลการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรค ด้วยค่า % agreement และค่า Kappa ที่ใช้ระดับความสัมพันธ์ตามเกณฑ์ของ Landis และ Koch⁽¹⁵⁾ ระดับพอใช้ (poor) ค่า Kappa < 0.40, ระดับดี (good) ค่า Kappa = 0.40-0.70 และระดับดีเยี่ยม (excellent) ค่า Kappa > 0.75

ผลการวิจัย

ผลเปรียบเทียบการเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อระหว่างวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH

ตัวอย่างสเมียร์เสมหะเข้มข้นที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH และ วิธี NALC-NaOH อย่างละ 227 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรงกันทุกตัวอย่าง โดยให้ผลบวก 219 ตัวอย่าง (ร้อยละ 96.5) และให้ผลลบ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.5) สำหรับผลการเพาะเชื้อพบว่าวิธี HS-SH ให้ผลบวก 200 ตัวอย่าง (ร้อยละ 88.1) ผลลบ 23 ตัวอย่าง (ร้อยละ 10.1) และพบการปนเปื้อนเชื้ออื่น ๆ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.8) ในขณะที่วิธี NALC-NaOH ให้ผลบวก 193 ตัวอย่าง (ร้อยละ 85.0) ผลลบ 25 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.0) และพบการปนเปื้อนเชื้ออื่น 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.0) เมื่อวิเคราะห์ค่าความสอดคล้องของสองวิธีในการตรวจเอเอฟบีสเมียร์และการเพาะเชื้อ พบค่า % agreement = 100.0 และการเพาะเชื้อ พบค่า Kappa = 1.00 และ 0.76 ตามลำดับ (Table 1) ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบของวิธี HS-SH เมื่อใช้วิธี NALC-NaOH เป็นวิธีอ้างอิง พบว่าสำหรับการตรวจ AFB ได้ค่าเท่ากันทุกค่าเท่ากับร้อยละ 100 ส่วนการเพาะเชื้อพบว่าได้ค่าร้อยละ 99.0, 83.3, 97.9 และ 90.9 ตามลำดับ (Table 2)

ผลการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคด้วยวิธี LPA

ผลการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคด้วยวิธี LPA ของตัวอย่างเสมหะเข้มข้น 76 ตัวอย่าง พบส่วนใหญ่ 63 ตัวอย่าง (ร้อยละ 82.9) ไวต่อยา INH และ RMP แต่มี 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 9.2) ดื้อต่อยา INH และ 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.9) เป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ซึ่งดื้อต่อยา INH ร่วมกับ RMP (Table 3) โดยพบว่าตัวอย่างที่ดื้อต่อยาหลายขนานเป็นตัวอย่างของผู้ป่วยที่ผลการรักษาเดือนที่ 3 เสมหะยังตรวจพบเชื้อ AFB 3 ตัวอย่าง ผู้ป่วยกลับเป็นวัณโรคซ้ำ (relapse) 2 ตัวอย่าง และผู้ป่วยที่มีประวัติติดเชื้อ HIV 1 ตัวอย่าง

Table 1 Comparison of AFB microscopy and culture results between HS-SH and NALC-NaOH methods

AFB (N=227)			Culture (N=227)			
HS-SH	NALC-NaOH		HS-SH	NALC-NaOH		
	Positive	Negative		Positive	Negative	Contaminated
Positive	219	0	Positive	191	4	5
Negative	0	8	Negative	2	20	1
			Contaminated	0	1	3
% Agreement	100.0		% Agreement	94.3		
Kappa	1.00		Kappa	0.76		

Table 2 Sensitivity, specificity, positive predictive values and negative predictive values of AFB microscopy and culture of HS-SH method by using NALC-NaOH as the reference method

Values	AFB (N=227)	Culture (N=217)
Sensitivity (%)	100	99.0
Specificity (%)	100	83.3
Positive predictive value (%)	100	97.9
Negative predictive value (%)	100	90.9

Table 3 Results of drug susceptibility testing by LPA (N=76)

Drug-resistant patterns	Number of concentrated sputa N (%)
Susceptible to both INH + RMP	63 (82.9)
Resistant to only INH	7 (9.2)
Multidrug-resistant (Resistant to both INH + RMP)	6 (7.9)

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System ของตัวอย่างเชื้อวัณโรคทั้งสิ้น 192 ตัวอย่าง พบมีตัวอย่างที่ไวต่อยาทั้ง 4 ชนิดมากที่สุด คือ 144 ตัวอย่าง (ร้อยละ 75.0) พบการดื้อยาเพียงชนิดเดียว (mono-resistant) 32 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.7) โดยพบการดื้อยาเฉพาะ SM สูงสุดร้อยละ 7.8 รองลงมาเป็น INH ร้อยละ 7.3 และ RMP ร้อยละ 1.6 ตามลำดับ ส่วนการดื้อยาแบบหลายชนิดที่ไม่ใช่ MDR-TB (poly-resistant) พบเพียงรูปแบบเดียวคือดื้อต่อยา SM ร่วมกับ INH โดยพบ 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.6) ในขณะที่การดื้อยาแบบหลายขนาน (multidrug-resistant) ซึ่งเป็นการ

ดื้อต่อยาอย่างน้อย 2 ชนิด คือ INH และ RMP พบ 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 5.7) โดยพบรูปแบบการดื้อต่อยา SM ร่วมกับยา INH และ RMP มากที่สุด ร้อยละ 2.6 รองลงมาเป็นการดื้อต่อยา INH ร่วมกับ RMP ร้อยละ 2.1 ส่วนรูปแบบการดื้อยาอื่นๆ คือ ดื้อต่อยา INH ร่วมกับ RMP และ EMB กับรูปแบบที่ดื้อต่อยาทั้ง 4 ชนิด พบร้อยละ 0.5 เท่ากัน (Table 4) โดยตัวอย่างที่เป็น เชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนานพบว่า เป็นตัวอย่างของผู้ป่วยที่ผลการรักษาเดือนที่ 3 เสมหะยังตรวจพบเชื้อ AFB 4 ตัวอย่าง ผู้ป่วยกลับเป็นวัณโรคซ้ำ 3 ตัวอย่าง ผู้ป่วยขาดยา 1 ตัวอย่าง ผู้ป่วยที่สัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยติดเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนาน 1 ตัวอย่าง ผู้ป่วยที่มีประวัติติดเชื้อ HIV 1 ตัวอย่าง และผู้ป่วยในเรือนจำ 1 ตัวอย่าง

Table 4 Results of drug susceptibility testing by BACTEC MGIT 960 System (N=192)

Drug-resistant patterns	Number of MTBC isolates N (%)
Pan-susceptible (SM + INH + RMP + EMB)	144 (75.0)
Mono-resistant	
Only SM	15 (7.8)
Only INH	14 (7.3)
Only RMP	3 (1.6)
Poly-resistant	
SM + INH	5 (2.6)
Multidrug-resistant	
INH + RMP	4 (2.1)
SM + INH + RMP	5 (2.6)
INH + RMP + EMB	1 (0.5)
SM + INH + RMP + EMB	1 (0.5)

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค INH และ RMP ด้วยวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System

จากการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ทั้งด้วยวิธี LPA และ วิธี BACTEC MGIT 960 System ของเชื้อ 41 ตัวอย่าง พบผลการทดสอบยา INH ให้ผลตรงกัน 39 ตัวอย่าง (ร้อยละ 95.1) โดยให้ผลไวต่อยาตรงกัน 29 ตัวอย่าง และให้ผลดื้อต่อยาตรงกัน 10 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลต่างกัน 2 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ให้ผลไวต่อยาดด้วยวิธี LPA แต่วิธี BACTEC MGIT 960 System ให้ผลดื้อต่อยา 1 ตัวอย่าง และอีก 1 ตัวอย่าง ให้ผลดื้อต่อยาดด้วยวิธี LPA แต่วิธี BACTEC MGIT 960 System ให้ผลไวต่อยา โดยค่า Kappa ของการทดสอบยา INH ของทั้งสองวิธีเท่ากับ 0.88 ซึ่งมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีเยี่ยม สำหรับการทดสอบยา RMP พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลตรงกัน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 97.6) โดยให้ผลไวต่อยาตรงกัน 34 ตัวอย่าง และดื้อต่อยา

ตรงกัน 6 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างที่ให้ผลไม่ตรงกัน 1 ตัวอย่าง ให้ผลไวต่อยาดด้วยวิธี LPA แต่ให้ผลดื้อต่อยาดด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System และค่า Kappa ของการทดสอบยา RMP ของทั้งสองวิธีเท่ากับ 0.91 ซึ่งมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีเยี่ยมเช่นกัน (Table 5)

ผลการตรวจหา MDR-TB ด้วยวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System

ผลการทดสอบตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนาน (MDR-TB) และเชื้อที่ไม่ใช่ MDR-TB ของทั้งสองวิธีให้ผลตรงกัน 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97.6 โดยมี 1 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนานด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี LPA และค่า Kappa ของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนานของทั้งสองวิธีเท่ากับ 0.91 ซึ่งมีความสอดคล้องอยู่ในระดับดีเยี่ยม (Table 6)

Table 5 Comparison of drug susceptibility testing results of INH, RMP by LPA and BACTEC MGIT 960 System (N=41)

LPA	BACTEC MGIT 960 System		% Agreement	Kappa
	Susceptible	Resistant		
INH				
Susceptible	29	1	95.1	0.88
Resistant	1	10		
RMP				
Susceptible	34	1	97.6	0.91
Resistant	0	6		

Table 6 Comparison of LPA and BACTEC MGIT 960 System for detecting MDR-TB (N=41)

LPA	BACTEC MGIT 960 System		% Agreement	Kappa
	Non-MDR-TB	MDR-TB		
Non-MDR-TB	34	1	97.6	0.91
MDR-TB	0	6		

วิจารณ์

ผลการศึกษาการเตรียมตัวอย่างเสมหะ 227 ตัวอย่าง ด้วยวิธี HS-SH ในการใช้เตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB เปรียบเทียบกับการใช้วิธี NALC-NaOH พบว่าให้ผลตรงกันร้อยละ 100 ซึ่งทำให้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวกและค่าพยากรณ์ผลลบ เท่ากับร้อยละ 100 สอดคล้องกับการศึกษาของ Someshwaran และคณะ⁽¹⁶⁾ ที่เปรียบเทียบผล AFB ของสเมียร์เสมหะเข้มข้นที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH 143 ตัวอย่างพบว่าให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง โดยมีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวกและค่าพยากรณ์ผลลบเท่ากัน คือร้อยละ 100 สำหรับการเพาะเชื้อวิธี HS-SH ให้ค่าความไว ค่าพยากรณ์ผลบวกและค่าพยากรณ์ผลลบสูงร้อยละ 99.0, 97.9 และ 90.9 ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ได้ค่าเหล่านี้สูงเช่นกันคือร้อยละ 92.6, 100 และ 98.8 มีเพียงค่าความจำเพาะเท่านั้นที่ต่ำกว่าค่าอื่น คือร้อยละ 83.3

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System ตัวอย่างส่วนใหญ่ (192 ตัวอย่าง) ทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System ในขณะที่มีตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี LPA 76 ตัวอย่าง และทดสอบร่วมกันสองวิธี 41 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ทดสอบด้วยวิธี LPA พบว่าผลส่วนใหญ่ไวต่อยา INH และ RMP

(ร้อยละ 82.9) สอดคล้องกับผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System ที่พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ให้ผลไวต่อยา SM, INH, RMP และ EMB (ร้อยละ 75.0) การดื้อยาแบบ mono-resistant ที่พบจากการตรวจด้วยวิธี LPA พบเฉพาะการดื้อต่อยา INH โดยไม่พบการดื้อต่อยา RMP ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System พบการดื้อยาแบบ mono-resistant ต่อยา RMP ร้อยละ 1.6 แต่พบน้อยที่สุดโดยพบการดื้อยาแบบ mono-resistant ต่อยา SM สูงที่สุด รองลงมาคือ INH และการดื้อยาแบบ poly-resistant พบเฉพาะการดื้อต่อยา SM ร่วมกับ INH ทั้งนี้การพบรูปแบบการดื้อต่อยา SM หรือ INH หรือ SM ร่วมกับ INH สูงกว่าชนิดอื่นอาจเนื่องมาจากการที่ยาทั้งสองชนิด ได้ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ช่วงเริ่มแรกที่มีการรักษาวัณโรคด้วยยาปฏิชีวนะ โดย SM เป็นยาชนิดแรกที่ใช้รักษาวัณโรคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2487 ขณะที่ INH เริ่มนำมาใช้ในปี พ.ศ. 2494⁽¹⁷⁾ สำหรับการดื้อยาแบบหลายขนาน (MDR-TB) นั้น การทดสอบด้วยวิธี LPA พบร้อยละ 7.9 ส่วนวิธี BACTEC MGIT 960 System พบร้อยละ 5.7 โดยกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบ การดื้อยาแบบหลายขนานโดยทั้งสองวิธีล้วนเป็นผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงสูงต่อการเป็นวัณโรคดื้อยา⁽¹⁸⁾

ผลเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของตัวอย่างเสมหะที่เตรียมด้วยวิธี

HS-SH ที่ทดสอบด้วยวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System พบว่าให้ผลการทดสอบต่อยา INH ตรงกันร้อยละ 95.1 ผลทดสอบความไวต่อยา RMP ตรงกันร้อยละ 97.6 และผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาแบบหลายขนาน (MDR-TB) ตรงกันร้อยละ 97.6 โดยทั้งหมดมีความสอดคล้องกันในระดับดีเยี่ยม ($Kappa = 0.88, 0.91$ และ 0.91 ตามลำดับ) ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาวิจัยที่ใช้วิธี HS-SH เตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA หรือวิธีอื่น ๆ เปรียบเทียบกับวิธี BACTEC MGIT 960 System โดยที่ผ่านมามีเพียงการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วิธี HS-SH กับวิธีมาตรฐาน NALC-NaOH เตรียมตัวอย่างสำหรับทำสเมียร์เสมหะเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อเท่านั้น โดยจากการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าวิธี HS-SH สามารถใช้เตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้นสำหรับตรวจหาเชื้อ AFB และเพาะเชื้อในอาหาร Löwenstein—Jensen (L-J) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี NALC-NaOH แล้ว พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันอยู่ในระดับดีและดีเยี่ยม โดยค่า $Kappa$ สำหรับการตรวจ AFB จากสเมียร์เสมหะเข้มข้นและผลเพาะเชื้อเท่ากับ 0.63 และ 0.79 ตามลำดับ นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่าความไวและค่าความจำเพาะของวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH ทั้งในการตรวจ AFB และการเพาะเชื้อ โดยวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH มีค่าความไวและค่าความจำเพาะในการตรวจ AFB เท่ากับร้อยละ $71.4, 87.7$ และ ร้อยละ $66.7, 87.7$ ตามลำดับ ส่วนการเพาะเชื้อด้วยอาหาร L-J เท่ากับร้อยละ $95.2, 100$ และ $76.2, 100$ ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽¹¹⁾ ที่เปรียบเทียบระหว่างวิธี HS-SH กับวิธีมาตรฐาน NALC-NaOH ในการเตรียมสเมียร์เข้มข้นสำหรับตรวจ AFB การเพาะเชื้อด้วยอาหาร L-J และอาหาร MGIT ของ

สิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจ (respiratory specimen) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเสมหะร้อยละ 90.4 พบว่าให้ค่าความไวและค่าความจำเพาะที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH มีค่าความไวและค่าความจำเพาะในการตรวจ AFB เท่ากับร้อยละ $73.5, 99.5$ และ $75.0, 99.3$ ตามลำดับ ส่วนการเพาะเชื้อด้วยอาหาร L-J เท่ากับร้อยละ $88.4, 100$ และ $88.3, 99.8$ ตามลำดับ และในการเพาะเชื้อด้วยอาหาร MGIT เท่ากับร้อยละ $92.6, 100.0$ และ $91.5, 99.8$ ตามลำดับ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Chaudhary และคณะ⁽¹²⁾ ที่เปรียบเทียบผลการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้น ด้วยวิธี HS-SH กับวิธี Modified Petroff's สำหรับการเพาะเชื้อในอาหาร L-J พบว่าผลเพาะเชื้อไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.09$) จากการศึกษาวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH เพื่อทำสเมียร์เสมหะเข้มข้นสำหรับตรวจ AFB และเพื่อเพาะเชื้อในอาหาร L-J และ MGIT มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน NALC-NaOH

ในการศึกษานี้ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคระหว่างวิธี LPA และวิธี BACTEC MGIT 960 System จากตัวอย่างเสมหะที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH ส่วนใหญ่ให้ผลตรงกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี NALC-NaOH โดยจากการศึกษาของ Nikam และคณะ⁽¹⁹⁾ เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี LPA จากตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธี NALC-NaOH กับวิธี BACTEC MGIT 960 System จากตัวอย่างเดียวกันที่เพาะเชื้อด้วยวิธี NALC-NaOH พบว่าค่า % agreement ของยา INH และ RMP เท่ากับ 90.9 และ 93.3 ตามลำดับ ในขณะที่ผลเปรียบเทียบการใช้ทั้งสองวิธีทดสอบกับตัวอย่างเพาะเชื้อเดียวกันนั้นจากการศึกษาของ Maningi และคณะ⁽²⁰⁾ พบว่าค่า

% agreement และค่า Kappa จากการทดสอบตัวอย่างเพาะเชื้อวัณโรคของยา INH เท่ากับ 96.9 และ 0.93 ตามลำดับ และของยา RMP เท่ากับ 89.7 และ 0.68 ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Dantas และคณะ⁽²¹⁾ พบว่าค่า Kappa ของยา INH, RMP และการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนาน เท่ากับ 0.71, 0.88 และ 0.71 ตามลำดับ นอกจากนี้ในการเปรียบเทียบผลทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA กับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยอาหาร L-J โดยการศึกษาของ Jian และคณะ⁽²²⁾ พบว่า % agreement และค่า Kappa ของยา INH เท่ากับ 84.4 และ 0.60 ตามลำดับ ของยา RMP เท่ากับ 96.9 และ 0.90 ตามลำดับ และของการตรวจหา เชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนานเท่ากับ 84.4 และ 0.61 ตามลำดับ

ผลที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างวิธี LPA กับวิธี BACTEC MGIT 960 System ของการศึกษานี้ในการทดสอบยา INH, RMP และการตรวจหา การดื้อยาแบบหลายขนาน พบร้อยละ 4.9, 2.4 และ 2.4 ตามลำดับ สาเหตุความไม่สอดคล้องกันเนื่องมาจากทั้งสองวิธีใช้หลักการทดสอบที่ต่างกัน โดยวิธี LPA ซึ่งใช้น้ำยา GenoType MTBDRplus เป็นการทดสอบการดื้อยาแบบจีโนไทป์ ใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา ตรวจการกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดการดื้อยาต้านวัณโรคเพียง 3 ยีน ได้แก่ ยีน *inhA* และ *katG* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อต่อยา INH และยีน *rpoB* ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อต่อยา RMP โดยพบความชุกของเชื้อดื้อยา INH ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ประมาณร้อยละ 25 และเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ประมาณ ร้อยละ 40-60 สำหรับความชุกของเชื้อดื้อยา RMP ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* พบได้ประมาณร้อยละ 95⁽²³⁾ แสดงให้เห็นว่ามียีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา INH และ RMP ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยน้ำยา GenoType MT-

BDRplus โดยเฉพาะยา INH นั้นพบว่ามียีนที่หลากหลายนอกเหนือจาก *inhA* และ *katG* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น *oxyR-ahpC*, *ndh*, *furA*, *kasA*, *Rv0340*, *iniA*, *iniB*, *iniC* และ *efpA*⁽²⁴⁻²⁶⁾ จากยีนที่ไม่ครอบคลุมนี้ทำให้วิธี LPA ตรวจไม่พบการดื้อต่อยา INH และ RMP ของเชื้อวัณโรค อันเนื่องมาจากกลไกการดื้อยาจากการกลายพันธุ์ของยีนอื่นดังที่กล่าวมา ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยการทดสอบแบบพีโนไทป์ สำหรับผลทดสอบยา INH ที่วิธี LPA ตรวจพบการดื้อยา แต่วิธี BACTEC MGIT 960 System ให้ผลไวต่อยานั้น สาเหตุที่มีความเป็นไปได้ อาจเนื่องมาจากการกลายพันธุ์แบบ silent mutation ซึ่งมีการเปลี่ยนลำดับเบสแต่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโน และอีกสาเหตุหนึ่งคือการดื้อยาในระดับต่ำ (low level resistance) โดยการกลายพันธุ์ทั้ง 2 แบบนี้ สามารถตรวจพบได้โดยวิธี LPA ทำให้แปลผลเป็นดื้อยา ในขณะที่การทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 System ยังคงให้ผลไวต่อยา^(27, 28)

สรุป

ตัวอย่างเสมหะที่ผ่านกระบวนการเตรียมด้วยวิธี HS-SH ทั้งในการตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อพบว่ามีความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ และค่าความสอดคล้องที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน NA-LC-NaOH สำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี LPA และ BACTEC MGIT 960 System ของตัวอย่างเสมหะที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH พบว่าผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค INH และ RMP รวมถึงการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาแบบหลายขนาน ของทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องตรงกันสูง แสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่าวิธี HS-SH สามารถใช้เตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคได้

โดยวิธี HS-SH มีขั้นตอนการเตรียมน้ำยาที่ง่าย ใช้สารเคมีในการเตรียมเพียง 2 ชนิด และมีต้นทุนถูก ในขณะที่วิธี NALC-NaOH มีการเตรียมน้ำยาที่ยุ่งยาก ใช้สารเคมีในการเตรียมถึง 3 ชนิด อีกทั้งสาร NALC มีราคาแพง และเมื่อเตรียมแล้วคุณสมบัติการย่อยเสมหะของสาร NALC จะเสื่อมลง จึงทำให้เก็บไว้ใช้ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง และต้องเตรียมใหม่ทุกวันก่อนใช้งาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

1. Addo K, Owusu-Darko K, Yeboah-Manu D, *et al.* Mycobacterial species causing pulmonary tuberculosis at the Korle Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana. *Ghana Med J* 2007; 41: 52-7.
2. Bayraktar B, Bulut E, Bariş AB, *et al.* Species distribution of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates from 2007 to 2010 in Turkey: a prospective study. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3837-41.
3. Bañuls AL, Sanou A, Anh NT, Godreuil S. *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *J Med Microbiol* 2015; 64: 1261-9.
4. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: WHO; 2018.
5. World Health Organization. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: WHO; 2018.
6. World Health Organization. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update. Geneva: WHO; 2016.
7. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control part II: culture. Geneva: WHO; 1998.
8. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1963; 87: 775-9.
9. Ricaldi JN, Guerra H. A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide (HS-SH) to concentrate and decontaminate sputum. *Trop Doct* 2008; 38: 97-9.
10. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J, *et al.* Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for *Mycobacterium tuberculosis* microscopy and culture. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1094-8.

11. Morcillo N, Imperiale B, Palomino JC. New simple decontamination method improves microscopic detection and culture of mycobacteria in clinical practice. *Infect Drug Resist* 2008; 1: 21-6.
12. Chaudhary SK, Mishra B. Comparison of hypertonic saline-sodium hydroxide method with modified Petroff's method for the decontamination and concentration of sputum samples. *Int J Infect Microbiol* 2013; 2: 78-81.
13. Hain Lifescience. Instructions for use: GenoType MTBDR*plus* Ver 2.0. 2015.
14. Global Laboratory Initiative. Mycobacteriology laboratory manual. Geneva: GLI; 2014.
15. Gordis L. Epidemiology. 5th ed. Philadelphia (PA): Elsevier Saunders; 2013.
16. Someshwaran R, Deshpande Shreeram A, Gnanaprakash K. Evaluation of sputum decontamination methods to facilitate the *Mycobacterium tuberculosis* detection in a tertiary care hospital. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2016; 5: 889-94.
17. Keshavjee S, Farmer PE. Tuberculosis, drug resistance and the history of modern medicine. *N Engl J Med* 2012; 367: 931-6.
18. Bureau of Tuberculosis. Department of Disease Control. National Tuberculosis control Programme Guidelines, Thailand, Aksorn Graphic and design. Bangkok, 2018.
19. Nikam C, Patel R, Sadani M, *et al.* Redefining MTBDR*plus* test results: What do indeterminate results actually mean? *Int J Tuberc Lung Dis* 2016; 20: 154-9.
20. Maningi NE, Malinga LA, Antiabong JF, Lekalakala RM, Mbelle NM. Comparison of line probe assay to BACTEC MGIT 960 system for susceptibility testing of first and second-line anti-tuberculosis drugs in a referral laboratory in South Africa. *BMC Infect Dis* 2017; 17: 795. doi: 10.1186/s12879-017-2898-3.
21. Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WDS, *et al.* Correlation between the BACTEC MGIT 960 culture system with GenoType MTBDR*plus* and TB-SPRINT in multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112: 769-74.
22. Jian J, Yang X, Yang J, Chen L. Evaluation of the GenoType MTBDR*plus* and MTBDR*sl* for the detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* on isolates from Beijing, China. *Infect Drug Resist* 2018; 11: 1627-34.
23. Richter E, Rüsch-Gerdes S, Hillemann D. Drug-susceptibility testing in TB: current status and future prospects. *Expert Rev Resp Med* 2009; 3: 497-510.

24. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Deretic V, Musser JM. Analysis of the *oxyR-ahpC* region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 600-6.
25. Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2157-9.
26. Zhang M, Yue J, Yang YP, *et al.* Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5477-82.
27. Maningi NE, Malinga LA, Antiabong JF, Lekalakala RM, Mbelle NM. Comparison of line probe assay to BACTEC MGIT 960 system for susceptibility testing of first and second-line anti-tuberculosis drugs in a referral laboratory in South Africa. *BMC Infect Dis* 2017 28; 17: 795. doi: 10.1186/s12879-017-2898-3.
28. Gupta R, Thakur R, Gupta P, *et al.* Evaluation of GenoType MTBDR_{plus} line probe assay for early detection of drug resistance in tuberculous meningitis patients in India. *J Glob Infect Dis* 2015; 7: 5-10.