

Comparison of Modified Fite-Faraco Staining, Auramine O Staining and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Standard Staining Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Slit-Skin Samples

Patisaya Tassanatailak¹, Thaval Rerksngarm² and Wimolpak Sriwai^{3*}

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

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Pathum Thani University, Pathum Thani Province, Thailand

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

Abstract

Detection of *Mycobacterium leprae* by modified Fite-Faraco (FF), fluorescent Auramine O (AO) method, real-time polymerase chain reaction (PCR) of *Pra* gene and the standard Ziehl Neelsen (ZN) staining were compared in slit-skin samples from 32 leprosy patients attending the Raj Pracha Samasai Institute. Scraped incision method was performed to collect tissue fluid and dermal tissue from the same 4 sites including two from both ear lobes and two from the active lesions. Slit-skin smears (SSS) were prepared and stained by ZN, FF and AO methods. The collected specimens were evaluated for the present of *Pra* gene using real-time PCR method. Fite-Faraco was modified by omitting the deparaffinization instead submerge the slide in soybean oil for 10 minutes. There was a very good correlation among all methods. Out of 32 samples, 7 showed organisms by ZN method, 9 showed organisms by FF method, 11 showed organisms by AO method and 9 showed organisms by real-time PCR method. FF and AO stains were found to be superior to ZN in detecting leprae bacilli in SSS. Moreover, sensitivity was identical for real-time PCR, FF, and AO methods for multibacillary (MB) cases suggesting that real-time PCR, FF and AO techniques on the SSS could replace ZN without any loss of sensitivity. FF procedure uses simple equipment, easy to carry out, and convenient procedure. Therefore, the

*Corresponding author E-mail address: swimol@yahoo.com, sriwai@tu.ac.th

Received: 14 June 2023

Revised: 22 July 2023

Accepted: 25 July 2023

modified Fite-Faraco method described here can be used for the confirmation of the clinical diagnosed case of leprosy in resource-limited hospitals.

Keywords: Slit-skin smear, Acid fast bacilli staining, Fluorescence, Leprosy, Modified Fite-Faraco, Real-time PCR

การเปรียบเทียบวิธีการย้อมสี Modified Fite-Faraco การย้อมสี Auramine O และวิธี Real-Time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium leprae* ในตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง

พธิศยา ทศนไตรลักษณ์¹ ถวัลย์ ฤกษ์งาม² และ วิมลพัทธ์ ศรีไวย์^{3*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี

³ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium leprae* โดยวิธีการย้อมสี modified Fite-Faraco (FF) วิธี fluorescent Auramine O (AO) และการตรวจหา *Pra* gene ด้วยวิธี real-time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน Ziehl Neelsen (ZN) ในผู้ป่วยโรคเรื้อน 32 ราย ที่เข้ารับบริการรักษาโรคเรื้อนที่สถาบันราชประชาสมาสัย โดยชุดเก็บตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อผิวหนังโดยการกรีดผิวหนังรายละ 4 ตำแหน่ง คือ ดึงหูทั้ง 2 ข้างและรอยโรคที่กำเริบมากที่สุดอีก 2 ตำแหน่ง เตรียมสไลด์จากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง (slit-skin smear: SSS) ย้อมสีด้วยวิธี ZN, FF และ AO และตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยวิธี real-time PCR เพื่อตรวจหา *Pra* gene การศึกษาครั้งนี้ได้ปรับวิธี FF ด้วยการลดขั้นตอน deparaffinization ไปเป็นการแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ผลการศึกษาพบว่าวิธี ZN, FF, AO และ real-time PCR มีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก โดยพบว่าวิธี ZN, FF และ AO ให้ผลบวกกับตัวอย่าง 7, 9 และ 11 ราย จากตัวอย่าง 32 ราย ตามลำดับ และเมื่อตรวจด้วยวิธี real-time PCR พบ *M. leprae* ใน 9 ตัวอย่าง และยังพบว่าวิธี FF และ AO มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธี ZN ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนจาก SSS นอกจากนี้ยังพบว่าวิธี FF, AO และ real-time PCR มีความไวเท่ากันในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยเชื้อมาก ผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า วิธี FF, AO และ real-time PCR สามารถใช้ทดแทนวิธี ZN ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนจากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนังโดยไม่สูญเสียความไวในการตรวจ วิธี FF ใช้เครื่องมือราคาถูกกว่า สะดวก และง่ายสำหรับการตรวจวัด ดังนั้นการย้อมสีด้วยวิธี FF จึงสามารถใช้เป็นวิธีการสำหรับช่วยยืนยันผู้มีอาการแสดงที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลที่มีทรัพยากรจำกัด

คำสำคัญ: การกรีดผิวหนัง การย้อมสีแบบที่เรียกรูปแท่งติดสีทนกรด ฟลูออเรสเซนซ์ โรคเรื้อน Modified Fite-Faraco, Real-time PCR

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: swimol@yahoo.com, sriwai@tu.ac.th

รับบทความ: 14 มิถุนายน 2566

แก้ไขบทความ: 22 กรกฎาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 25 กรกฎาคม 2566

บทนำ

โรคเรื้อนเป็นโรคติดต่อเรื้อรังเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) ทำให้เกิดรอยโรคที่ผิวหนังและเส้นประสาทส่วนปลาย อาการแสดงของผู้ป่วยโรคเรื้อนมีความรุนแรงแตกต่างกันขึ้นกับระดับภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคเรื้อนของแต่ละบุคคล หากมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ต่ออาการมักไม่รุนแรง ส่วนผู้ที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันไม่ดีมักแสดงอาการของโรคที่รุนแรง ผู้ป่วยกลุ่มนี้หากไม่ได้รับการรักษาหรือวินิจฉัยล่าช้าอาจนำไปสู่ความพิการทางร่างกายได้ในที่สุด⁽¹⁾ ดังนั้นการวินิจฉัยที่ถูกต้องและแม่นยำตั้งแต่เริ่มปรากฏอาการของโรคเรื้อนจึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการรักษา ซึ่งการวางแผนการรักษาโรคเรื้อนจะขึ้นกับอายุของผู้ป่วยและประเภทของโรคเรื้อนตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก^(2, 3) ซึ่งได้จำแนกประเภทผู้ป่วยโรคเรื้อนตามจำนวนของรอยโรคที่ผิวหนังเป็น 2 ประเภท คือ ผู้ป่วยเชื่อน้อย (paucibacillary: PB) และผู้ป่วยเชื้อมาก (multibacillary: MB) หากตรวจพบเชื้อโรคเรื้อนจากวิธี slit-skin smear (SSS) ผู้ป่วยจะถูกจำแนกเป็น MB โดยไม่คำนึงถึงจำนวนรอยโรคที่ผิวหนัง ผู้ป่วยเชื่อน้อย (PB) และผู้ป่วยเชื้อมาก (MB) จะได้รับการรักษาด้วยยาสูตรผสม (multi-drug therapy: MDT) ได้แก่ dapsone, rifampicin และ clofazimine นาน 6 เดือนและ 12 เดือน ตามลำดับ⁽⁴⁾

การตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนทางห้องปฏิบัติการยังมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนในรายที่ยังไม่ปรากฏอาการชัดเจนและใช้ในการติดตามการตอบสนองต่อการรักษา การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรคเรื้อนมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกัน (immunodiagnostic test) ตัวอย่างเช่น การทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะต่อ phenolic glycolipid-I (PGL-I)⁽⁵⁾ แต่เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันมีความไวและความ

จำเพาะต่ำ⁽⁶⁾ จึงมีการนำวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมจาก DNA ของเชื้อ *M. leprae* มาใช้ วิธี PCR-based system มีความไวและความจำเพาะสูง^(7, 8) สามารถจำแนก *M. leprae* ออกจากมัคโคแบคทีเรียชนิดอื่นได้และยังสามารถใช้วินิจฉัยโรคเรื้อนในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนระยะแรกที่มีการตรวจชิ้นเนื้อเป็นลบหรือที่สรุปไม่ได้ (inconclusive)⁽⁹⁾ แต่มีข้อจำกัด คือ การตรวจพบสารพันธุกรรมไม่ได้บ่งบอกการมีชีวิตของเชื้อ *M. leprae* การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันและวิธี PCR เป็นวิธีการที่มีความซับซ้อนต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ใช้ทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานเป็นอย่างดี ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติในโรงพยาบาลทั่วไป

การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งดัดสีทนกรด (acid fast bacilli: AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่าย และใช้เครื่องมือราคาแพงน้อยที่สุดสำหรับการวินิจฉัยโรคเรื้อนเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ ที่กล่าวมา การตรวจ AFB เป็นการตรวจหาเชื้อจากผิวหนังบริเวณรอยโรค (skin biopsy) และใช้เป็นวิธีสำหรับยืนยันโรคเรื้อนในผู้ป่วยที่มีอาการแสดงที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อน เนื่องจากการทำ biopsy มีความเสี่ยงในขั้นตอนการทำหัตถการทำให้เกิดรอยแผลเป็นได้ และยังต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บตัวอย่าง การตรึงตัวอย่าง การเตรียมและการแปลผล ดังนั้นในโรงพยาบาลส่วนใหญ่จึงนิยมใช้การตรวจด้วยวิธี SSS ที่มีเทคนิคที่ไม่ยุ่งยากและใช้วัสดุอุปกรณ์ไม่มาก เพื่อนำเนื้อเยื่อผิวหนังไปตรวจหาเชื้อ แทนการตัดชิ้นเนื้อ ตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS จะถูกนำไปย้อมด้วยเทคนิคต่าง ๆ เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. leprae* วิธีย้อมดั้งเดิมที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี Ziehl-Neelsen⁽¹⁰⁾ ใช้หลักการ acid fast stain โดยใช้ความร้อนช่วยให้สี carbol fuchsin สามารถแทรกซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อ *M. leprae* ได้⁽¹¹⁾ ซึ่งจะพบตัวเชื้อติดสีแดงบนพื้นหลังติดสีน้ำเงิน การย้อมด้วยวิธี

ZN นั้นสามารถใช้การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อนเชื้อมากได้และมีความจำเพาะสูง⁽¹²⁾ แต่มีข้อเสีย คือมีความไวน้อยกว่าวิธีการอื่นและให้ผลการทดสอบเป็นลบลงในผู้ป่วยโรคเรื้อนเชื่อน้อยได้^(12, 13) ในประเทศไทย ผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนทุกรายจะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมโดยวิธี SSS และย้อมสีด้วยวิธี ZN เพื่อช่วยในการวินิจฉัยแบ่งประเภท และวางแผนการรักษาต่อไป ส่วนการตรวจทางพยาธิวิทยาจาก biopsy จะทำในรายที่อาการแสดงไม่ชัดเจนเท่านั้น โดยสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำ biopsy มักนิยมใช้การย้อมสีด้วยวิธี Fite-Faraco ที่พัฒนามาจากวิธี Kinyoun⁽¹²⁾ เนื่องจากเชื้อ *M. leprae* มีความทนกรดและแอลกอฮอล์น้อยกว่า *M. tuberculosis* มากและมีแนวโน้มที่จะสูญเสียคุณสมบัติความทนกรด จึงทำให้มีโอกาสตรวจไม่พบเชื้อได้ง่าย ดังนั้นวิธี modified Fite-Faraco (FF) จึงได้ผสมน้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) กับสารทำลายพาราฟิน (deparaffinizing solvent) เพื่อช่วยเคลือบปกป้องผนังเซลล์ของแบคทีเรียและลดการสัมผัสกับสารละลายพาราฟิน ทำให้ยังคงคุณสมบัติความทนกรดไว้ได้ วิธีนี้จึงมีความไวสูงและสามารถตรวจพบเชื้อ *M. leprae* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อได้ดีกว่าวิธี ZN⁽⁸⁾ แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาย้อมนานและวิธีย้อมมีความซับซ้อนมากกว่า^(13, 14) ต่อมาได้มีการพัฒนาการย้อม AFB โดยใช้สารที่สามารถเรืองแสงได้ในการย้อม (fluorochrome) เช่น Auramine O ซึ่งสารฟลูออโรโครมจะเข้าไปจับกับกรดไขมันของตัวเชื้อ ทำให้ตรวจพบเชื้อมีลักษณะเป็นรูปแท่งเรืองแสงสีเหลืองบนพื้นหลังสีดำ การย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนัง ด้วยสียฟลูออโรโครมเป็นวิธีที่มีความไวสูงสุดเมื่อเทียบกับวิธี ZN⁽¹⁵⁾ และวิธี FF^(12, 16) แต่เนื่องจากวิธีนี้อาจทำให้เกิดผลบวกลวงได้ง่าย^(15, 17) จึงต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการอ่านผล รวมทั้งต้องใช้กล้อง

จุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ และต้องมีห้องมืดสำหรับอ่านผล ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีการวินิจฉัยโรคเรื้อนที่ใช้ได้ง่าย สะดวก ปลอดภัย และราคาถูก รวมทั้งมีความไวและความจำเพาะในระดับที่ดีพอที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยตามโรงพยาบาลทั่วไปได้

การตรวจหา AFB ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* ในหลายประเทศ อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* โดยเฉพาะในตัวอย่างที่เก็บจากวิธี SSS ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการย้อมสี modified Fite-Faraco การย้อมสี Auramine O และวิธี real-time PCR กับการย้อมสีด้วยวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen จากตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อที่ได้จากวิธี SSS เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae*

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. ประชากรที่ศึกษา

การศึกษาทำในอาสาสมัครที่ขึ้นทะเบียนเข้ารับบริการรักษาโรคเรื้อนที่สถาบันราชประชาสมาสัย ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2566 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2566 จำนวน 32 ราย โดยเป็นกลุ่มผู้ป่วยใหม่และกลุ่มที่ติดตามการรักษา

2. การพิทักษ์สิทธิของกลุ่มตัวอย่าง

โครงการวิจัยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยเกี่ยวกับคน สถาบันราชประชาสมาสัย ผู้วิจัยเคารพในการขอความยินยอมโดยให้ข้อมูลอย่างครบถ้วนและให้อาสาสมัครตัดสินใจอย่างอิสระ ไม่เปิดเผยข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครและนำเสนอเป็นข้อมูลวิชาการในภาพรวมเท่านั้น

3. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างส่งตรวจทำโดยการกรีดผิวหนังเพื่อตรวจหาตัวเชื้อโดยตรงตามแนววิธีปฏิบัติมาตรฐานของ WHO^(11, 18, 19) จากผู้ป่วยรายละ 4 ตำแหน่ง คือ บริเวณดั้งหูทั้ง 2 ข้างและรอยโรคที่กำเริบมากที่สุดอีก 2 ตำแหน่ง โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อได้ผิวหนัง สำหรับเตรียมตัวอย่างสไลด์ และชุดด้วยใบมีดจากตำแหน่งเดียวกันเพื่อนำไปทดสอบ real-time PCR โดยแบ่งสไลด์ SSS เป็น 3 ส่วนเพื่อนำไปย้อมด้วยวิธี ZN⁽²⁰⁾ วิธี FF และวิธี AO⁽²¹⁾ ส่วนตัวอย่างจากใบมีดนำไปตรวจวิเคราะห์โดยวิธี real-time PCR

เตรียมตัวอย่างที่จะนำไปย้อมสีโดยเกลี่ยเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตรบนสไลด์ ตำแหน่งละ 3 สไลด์ ปลดย้อมเมียร์ให้แห้งแล้ว fix โดยการผ่านความร้อน เก็บสไลด์ในกล่องที่แห้งและสะอาดเพื่อรอทำการทดสอบต่อไป ส่วนตัวอย่างที่ได้จากการชุดด้วยใบมีด สำหรับการทำ real-time PCR เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

4. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

การย้อมสีวิธี ZN มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายในคู่มือการตรวจเชื้อโรคเรื้อนโดยวิธีการกรีดผิวหนัง สถาบันราชประชาสมาสัย⁽²⁰⁾ โดยนำมาย้อมสีแรกด้วย 1% carbol fuchsin (Loba Chemie Pvt. Ltd., India) และลนไฟอ่อน ๆ นาน 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด จากนั้นล้างด้วย 3% HCl-alcohol 3 วินาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด แล้วย้อมด้วยสีย้อมที่สอง (counter stain) 1% methylene blue (RFCL Ltd., India) เป็นเวลา 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาจนสะอาด และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

การย้อมสีวิธี FF มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายโดย Girma และคณะ⁽²²⁾ ซึ่งได้ปรับขั้นตอนการย้อม ดังนี้ ปรับลดขั้นตอน deparaffinization ไปเป็นการแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพิ่มเวลาการย้อมด้วย 1% carbol fuchsin (Loba Chemie Pvt. Ltd., India) เป็น 30 นาที ปรับลดเวลาการล้างด้วย 25% HCl-alcohol เป็น 5 วินาที ปรับความเข้มข้นและเวลาในการย้อมสีย้อมที่สอง (counter stain) เป็น 1% methylene blue (RFCL Ltd., India) นาน 30 วินาที โดยล้างสไลด์ด้วยน้ำประปาระหว่างแต่ละขั้นตอน และเรียกวิธีนี้ว่า modified Fite-Faraco

การย้อมสีวิธี AO มีรายละเอียดขั้นตอนตามที่อธิบายโดย Truant และคณะ⁽²¹⁾ โดยได้ปรับขั้นตอนการย้อม ดังนี้ เพิ่มเวลาการย้อมด้วย 0.1% Auramine O (Becton Dickinson Ireland Ltd., USA) เป็น 20 นาที ปรับเวลาในการย้อมสีย้อมที่สอง (counter stain) ด้วย 0.5% potassium permanganate (Becton Dickinson Ireland Ltd., USA) เป็น 4 นาที และระหว่างแต่ละขั้นตอนล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา

สำหรับขั้นตอนการย้อมสีทั้งสามวิธี ให้จับสไลด์ให้แห้งหลังการล้างครั้งสุดท้าย ก่อน mount ด้วย mounting medium โดยไม่มีการ clearing ด้วยไซลีน แล้วตรวจหาตัวเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือกล้องฟลูออเรสเซนซ์ Primo Star iLED (Carl ZEISS, Germany) กำลังขยาย 100X จำนวน 100 วงกล้อง จากมุมทั้งสี่และกลางสไลด์ รายงานผลการทดสอบการย้อมสีทั้ง 3 วิธี เป็นเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative) เป็นค่าเฉลี่ย BI (Bacteriological Index: BI) ตาม Ridley's logarithmic scale⁽¹⁹⁾ กำหนดจำนวนเชื้อในสเมียร์เป็น 7 ระดับ จากระดับที่ 0 (ไม่พบแบคทีเรีย) ถึงระดับที่ 6+ (พบ AFB มากกว่า 1,000 โดยเฉลี่ยในหนึ่งวงกล้อง)

การประเมินผลได้กัลลึงจุลทรรศน์จะกระทำโดยนักเทคนิคการแพทย์ 3 คน โดยใช้มิติ 2 ใน 3 ซึ่งนักเทคนิคการแพทย์จะไม่ทราบผลการวินิจฉัยและหมายเลขสไลด์

การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี real-time PCR สกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างสารน้ำและเนื้อเยื่อผิวหนังจากตัวอย่างใบมีดด้วยเครื่องสกัด Zybion EXM3000 Nucleic Acid Isolation System (Zybion, China) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอของ *Mycobacterium leprae* *Pra* gene⁽²³⁾ ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป *Mycobacterium leprae* Real Time PCR Kit (Jiangsu Biopurfectus Technologies Co., Ltd., China) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ BIO-RAD CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, Singapore) ภายใต้สภาวะที่ผู้ผลิตกำหนดจำนวน 40 รอบ และวิเคราะห์ผลด้วยซอฟต์แวร์ CFX Maestro™ Software วิธี PCR มีความไวของวิธี (limit of detection) 5 copies/reaction รายงานผลเชิงคุณภาพโดยรายงานผลเป็นบวกเมื่อค่า cycle threshold (Ct) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 38

การควบคุมคุณภาพภายใน (internal QC) ทำโดยใช้ตัวอย่าง SSS ที่ทราบว่ามีหรือไม่มี *M. leprae* เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) และตัวควบคุมลบ (negative control) ในระหว่างขั้นตอนการย้อมสี ส่วนการทำ real-time PCR มีการทำ positive control และ negative control และใช้ human RNaseP เป็น internal control ควบคุม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการตรวจหาเชื้อของผู้ป่วย 32 ราย นำมาเปรียบเทียบค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value: PPV) และ

ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value: NPV) โดยเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี real-time PCR สถิติเชิงพรรณนานำเสนอในรูปความถี่และร้อยละ เปรียบเทียบระหว่างวิธีวิเคราะห์ด้วยสถิติ Chi-square หรือ Fisher's Exact test วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้สถิติ Phi coefficient วิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างผู้อ่านผลสเมียร์ด้วยสถิติ Krippendorff's alpha coefficient และวิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างวิธีตรวจด้วยสถิติ Cohen's Kappa coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 28.0.1.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) กำหนดระดับความมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 การแปลความหมายของค่าดัชนีความสอดคล้อง Kappa มีดังนี้ 0.80 - 1.00 หมายถึง ระดับดีมาก 0.60 - 0.80 หมายถึง ระดับดี 0.40 - 0.60 หมายถึง ระดับปานกลาง 0.20 - 0.40 หมายถึง ระดับพอใช้ 0.00 - 0.20 หมายถึง ระดับน้อย และน้อยกว่า 0.00 หมายถึง ไม่สอดคล้อง⁽²⁴⁾ การแปลความหมายของค่าดัชนีความสอดคล้อง Alpha มีดังนี้ ≥ 0.800 หมายถึง ระดับดี ≥ 0.667 หมายถึง ระดับไม่แน่นอน (tentative) และ < 0.667 หมายถึง ระดับต่ำ⁽²⁵⁾

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้มีผู้มีคุณสมบัติครบตามเกณฑ์เข้าร่วมวิจัยเบื้องต้นและได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเรื้อนจำนวน 32 ราย จากการมีอาการแสดงทางคลินิกของโรคเรื้อนอย่างน้อย 2 อย่าง ได้แก่ การตรวจพบอาการทางผิวหนังที่มีลักษณะเฉพาะของโรคเรื้อน การตรวจพบอาการขา ได้แก่ ขาที่รอยโรคผิวหนังหรือขาที่ผิวหนังบริเวณที่รับรู้ความรู้สึกจากเส้นประสาทส่วนปลายที่ถูกทำลาย หรือการตรวจพบเส้นประสาทโต ได้จำแนกประเภทผู้ป่วยได้เป็น ผู้ป่วยเขื่อน้อย (PB) หมายถึง ผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ตรวจพบ

รอยโรค 1-5 รอยโรค และผู้ป่วยเชื้อมาก (MB) หมายถึง
ผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ตรวจพบรอยโรคมกกว่า 5 รอยโรค^(2, 3)
ได้เป็นผู้ป่วยเชือน้อยจำนวน 17 ราย (ร้อยละ 53.1)
และผู้ป่วยเชื้อมากจำนวน 15 ราย (ร้อยละ 46.9)
(Table 1) จากการวิเคราะห์พบผู้ป่วยได้รับการยืนยัน
ว่าเป็นโรคเรื้อนจากการย้อมสีให้ผลบวกด้วยวิธี ZN
จำนวน 7 ราย และวิธี FF จำนวน 9 ราย โดย
ผู้ป่วยทั้ง 7 ราย ให้ผลบวกกับวิธีการตรวจทั้ง 4 วิธี
นอกจากนี้วิธี FF ให้ผลบวกเพิ่มมากขึ้นจากวิธี ZN
จำนวน 2 ราย ซึ่งเป็นผู้ป่วยรายเดียวกับที่ให้ผลบวก
กับการตรวจด้วยวิธี AO และ real-time PCR
ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่าผู้ป่วยเป็นโรคเรื้อนจริง
นอกจากนี้ยังพบว่ามี 2 ราย ที่ตรวจพบ AFB ด้วย
วิธี AO แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN วิธี FF และ
real-time PCR

2. ความสอดคล้องของผู้ประเมินตามวิธีการ วินิจฉัยด้วยการย้อมสี

ผลการประเมินผลความน่าเชื่อถือระหว่าง
ผู้ประเมินผลสเมียร์ (Inter-rater reliability) จำนวน
3 คนที่ได้อ่านผลจากการย้อมสีด้วยวิธี ZN โดยใช้
สถิติ Krippendorff's alpha พบว่าค่าดัชนีความ
สอดคล้องระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.914 แสดงว่ามี
ค่าความสอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดี
ส่วนการย้อมสีด้วยวิธี FF ได้ค่าดัชนีความสอดคล้อง
ระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.931 แสดงว่ามีค่าความ
สอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดีและการ
ย้อมสีด้วยวิธี Auramine O ได้ค่าดัชนีความสอดคล้อง
ระหว่างผู้ประเมินเท่ากับ 0.863 แสดงว่ามีค่าความ
สอดคล้องกันระหว่างผู้ประเมินอยู่ในระดับดี (Table
2) ดังนั้น ผู้ประเมินทั้ง 3 คน มีความเที่ยงใน
ผลการประเมิน

3. ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจวินิจฉัยในสิ่งส่ง ตรวจจากการกรีดผิวหนัง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง
ประเภทของโรคเรื้อนกับวิธีการตรวจวินิจฉัยด้วยสถิติ
Phi coefficient พบอัตราการให้ผลบวกกับวิธีการ
ตรวจทั้ง 4 ชนิดในผู้ป่วยเชื้อมากมีอัตราสูงกว่าอัตรา
การให้ผลบวกในผู้ป่วยเชือน้อย อย่างมีนัยสำคัญทาง
สถิติ ($p < 0.05$) (Table 3) และพบว่าวิธี
ZN มีอัตราการตรวจพบ AFB ในผู้ป่วยเชื้อมาก
ต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ ส่วนวิธี AO พบว่ามีอัตราการให้
ผลบวกในผู้ป่วยเชือน้อยร้อยละ 11.8

4. ความสอดคล้องของผลการตรวจหา AFB ใน สเมียร์ด้วยวิธี Ziehl-Neelsen วิธี modified Fite- Faraco และวิธี Auramine O โดยมีผลการ วิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง

จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับวิธี real-time
PCR ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ความ
สอดคล้องการวินิจฉัยด้วยวิธี ZN, FF และ AO กับ
วิธี real-time PCR โดยใช้ค่าสถิติ Kappa coefficient
พบว่าทั้ง 3 วิธี มีความสอดคล้องในระดับดีมากเมื่อ
เทียบกับวิธี real-time PCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
($p < 0.001$) โดยวิธี FF มีความสอดคล้องกับ
วิธี real-time PCR มากที่สุด เมื่อเทียบกับวิธี ZN
และ AO (Kappa = 1.000, $p < 0.001$) (Table 4)
วิธี ZN มีค่าทำนายผลบวก (PPV) ร้อยละ 100 ค่า
ทำนายผลลบ (NPV) ร้อยละ 92 วิธี FF มีค่าทำนาย
ผลบวกร้อยละ 100 ค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 100 และ
วิธี AO มีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 81.8 ค่าทำนาย
ผลลบร้อยละ 100

5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อน

จากการวิเคราะห์พบค่าความไว (sensitivity) ค่าความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจวินิจฉัยแต่ละวิธี โดยใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบว่ามีจำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี FF แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN และมีจำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22.2) ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี AO แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธี ZN (Table 4) ซึ่งเป็นตัวอย่างรายเดียวกัน และเมื่อแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเชื้อมาก จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 53.1) พบว่า มีจำนวน 2 ตัวอย่างที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี AO และผู้ป่วยเชื้อมาก จำนวน 15 ราย (ร้อยละ 46.9) พบว่า มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบ AFB ด้วยวิธี FF และ AO (Table 1) นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี ZN ในตัวอย่างที่ได้จากการกรีดผิวหนัง มีค่าความไวการตรวจ (ร้อยละ 77.8) น้อยกว่าค่าความ

ไวจากการตรวจด้วยวิธี FF หรือวิธี AO ที่มีค่าความไวเป็นร้อยละ 100 ทั้งสองวิธี ส่วนการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี AO มีค่าความจำเพาะน้อยที่สุด (ร้อยละ 91.3) เมื่อเทียบกับวิธี ZN และ FF (Table 5) ในการทดลองนี้ได้วัดประสิทธิภาพการตรวจโดยใช้พื้นที่ใต้กราฟ (area under the ROC curve : AUC) เมื่อใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบว่าวิธี FF (AUC = 1.000) และวิธี AO (AUC = 1.000) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธี ZN (AUC=0.884) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (Table 5)

ผลการวิเคราะห์ความสอดคล้องการวินิจฉัยวิธี FF และ AO โดยใช้วิธี ZN เป็นวิธีอ้างอิง ด้วยสถิติ Kappa coefficient พบว่าวิธี FF มีความสอดคล้องในระดับดีมากกับวิธี ZN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่วิธี AO มีความสอดคล้องกับวิธี ZN ในระดับดีเมื่อเทียบกับวิธี ZN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (Table 6)

Table 1 Number and repartition of positive samples according to clinical classification. (n = 32)

Result	Type of leprosy	
	MB	PB
ZN-FF-AO-PCR positive	7	0
ZN negative-FF-AO-PCR positive	2	0
AO positive-ZN-FF-PCR negative	0	2
ZN-FF-AO-PCR negative	6	15
Total	15	17

MB = multibacillary leprosy, PB = paucibacillary leprosy, ZN = Ziehl-Neelsen staining, FF = modified Fite-Faraco staining, AO = Auramine O staining and PCR = real-time PCR

Table 2 Inter-rater reliability scores for the reported validation studies of the Bacteriological Index grading system in the different staining methods, as measured by Krippendorff's alpha. (n = 32)

Staining technique	No. of raters	No. of patients	Krippendorff's alpha	95% CI
Ziehl-Neelsen	3	32	0.914	0.827-0.977
Modified Fite-Faraco	3	32	0.931	0.868-0.979
Auramine O	3	32	0.863	0.796-0.926

Krippendorff's alpha value range from 0 to 1, where 0 indicates the absence of reliability and 1 indicates perfect reliability. An alpha value greater than 0.667 is the accepted lowest conceivable limit. An alpha of 0.800 or higher is considered a good reliability.⁽²⁵⁾

Table 3 Efficiencies of different detection systems with slit skin specimens from MB and PB patients. P-values were determined using Phi coefficient test. Significant comparisons are indicated by asterisks. (n = 32)

Clinical classification	Patients (%)	Number of positive results/total number (%)			
		ZN	FF	AO	Real-time PCR
MB	15 (46.9)	7/15 (46.7)***	9/15 (60)****	9/15 (60)**	9/15 (60)****
PB	17 (53.1)	0/17 (0)	0/17 (0)	2/17 (11.8)	0/17 (0)
Total	32 (100)	7/32 (21.9)	9/32 (28.1)	11/32 (34.4)	9/32 (28.1)

PB = paucibacillary, MB = multibacillary, **: $p = 0.004$, ***: $p = 0.001$, ****: $p < 0.001$

Table 4 Correlations of various staining techniques with real-time PCR. (n = 32)

Staining technique	Real-time PCR		Kappa	P-value	PPV (%)	NPV (%)
	Positive	Negative				
Ziehl-Neelsen						
Positive	7 (77.8)	0 (0.0)	0.834	< 0.001	100	92
Negative	2 (22.2)	23 (100)				
Modified Fite-Faraco						
Positive	9 (100)	0 (0.0)	1.000	< 0.001	100	100
Negative	0 (0.0)	23 (100)				
Auramine O						
Positive	9 (100)	2 (8.7)	0.855	< 0.001	81.8	100
Negative	0 (0.0)	21 (91.3)				

PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value

Table 5 Area under the receiver operating characteristic curve (AUC) and predictive value of three staining techniques as compared with real-time PCR in leprosy diagnosis. (n = 32)

Staining technique	Sensitivity	Specificity	AUC	95% CI	P-value
Ziehl-Neelsen	77.8	100	0.884	0.715-1.000	0.001
Modified Fite-Faraco	100	100	1.000	1.000-1.000	< 0.001
Auramine O	100	91.3	1.000	1.000-1.000	< 0.001

Table 6 Comparison of diagnostic performance of modified Fite-Faraco and Auramine O staining to Ziehl-Neelsen staining. (n = 32)

Staining technique	Ziehl-Neelsen		Kappa	P-value	PPV (%)	NPV (%)
	Positive	Negative				
Modified Fite-Faraco						
Positive	7 (100)	2 (8.0)	0.834	< 0.001	77.8	100
Negative	0 (0.0)	23 (92.0)				
Auramine O						
Positive	7 (100)	4 (16.0)	0.697	< 0.001	63.6	100
Negative	0 (0.0)	21 (84.0)				

PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value

วิจารณ์

เชื้อ *M. leprae* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสัตว์ทดลอง และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง⁽²⁶⁾ มาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนในปัจจุบันจึงอาศัยการพบรอยโรคที่ผิวหนังและอาการตามปลายประสาทเป็นหลัก การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อนในรายที่ยังไม่ปรากฏอาการชัดเจนยังทำได้ยาก^(12, 13) เนื่องจากโรคนี้อาจสับสนกับโรคผิวหนังอื่น ๆ ได้ง่าย ดังนั้นการตรวจพบ AFB และการพบลักษณะจำเพาะของโรคเรื้อน เช่น granulomas, epithelioid cells, foamy macrophages, giant cells, ชนิดของเซลล์ที่เกี่ยวข้อง (infiltration) และการอักเสบจากการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathological examination) ของผิวหนังบริเวณรอยโรคจึงเป็นการช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรคเรื้อนได้⁽¹⁸⁾ วิธีการตรวจทางพยาธิวิทยาจึงมักใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยและแยกประเภทของโรคเรื้อน^(18, 19) แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความเสี่ยงในขั้นตอนการทำหัตถการและทำให้

เกิดรอยแผลเป็นได้ และยังต้องใช้บุคลากรที่มีทักษะและความชำนาญในการเก็บ การตรึงตัวอย่างกับสไลด์ การเตรียมและการแปลผลตัวอย่างชิ้นเนื้อ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาวิธีการวินิจฉัยโรคเรื้อนที่ง่าย สะดวก ปลอดภัย และราคาถูก รวมทั้งมีความไวและความจำเพาะในระดับที่ดีพอที่จะสามารถนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยได้ตามโรงพยาบาลทั่วไป

การตรวจทางจุลชีววิทยาโดยการเพาะเชื้อโดยทั่วไปจะถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย แต่เนื่องจากเชื้อ *M. leprae* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้ ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอู้ง่ายหนู (Mouse Foot Pad assay) เป็นวิธีมาตรฐานซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลานานในการเพาะเลี้ยง⁽²⁶⁾ ดังนั้นการตรวจพบแบคทีเรียรูปแท่งดัดสีทึบกรดด้วยกล้องจุลทรรศน์จากสิ่งส่งตรวจจึงนิยมใช้เป็นเทคนิคการวินิจฉัยเชื้อ *M. leprae* แทน โดยมีการรายงานผลเป็นค่า BI ซึ่งแสดงถึงจำนวนเชื้อโรคเรื้อนที่พบ ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ศึกษาความเที่ยงตรงในการรายงานผลค่า BI ระหว่าง

ผู้ประเมิน พบว่าผู้ประเมินทั้ง 3 คน มีค่าดัชนีความสอดคล้อง alpha มากกว่า 0.8 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีความสอดคล้องในการประเมินอยู่ในระดับดีมาก แสดงให้เห็นว่ามีความสอดคล้องภายในของการรายงานผลค่า BI และมีความน่าเชื่อถือในการประเมินความสอดคล้องระหว่างการอ่านสไลด์ต่อการรายงานผลค่า BI ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากผู้เชี่ยวชาญที่ทำหน้าที่เป็นผู้ประเมินมีคุณสมบัติที่เหมาะสม และมีการฝึกปฏิบัติก่อนทำการประเมินจริง ดังนั้นจึงสามารถนำผลการรายงานค่า BI ไปวิเคราะห์ต่อได้

วิธี ZN เป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ราคาถูก และเป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจหา AFB โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสถานบริการสุขภาพที่มีทรัพยากรจำกัด ความไวของวิธี ZN มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 59 ถึง 75 ขึ้นอยู่กับการศึกษา^(8, 12, 22) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อใช้วิธี real-time PCR เป็นวิธีอ้างอิง พบค่าความไวของวิธี ZN มีค่าร้อยละ 77.8 โดยค่า PPV มีค่าสูง (ร้อยละ 100) แสดงว่าโอกาสการมีผลบวกปลอมจะน้อย ทางเลือกอีกวิธีสำหรับใช้ย้อมตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS คือวิธีการย้อมสี AO ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความไวและค่า NPV ของวิธี AO สูงกว่าวิธี ZN แต่ค่าความจำเพาะและค่า PPV ต่ำกว่าวิธี ZN โดยค่า PPV ที่มีค่าต่ำแสดงว่าโอกาสการมีผลบวกปลอมจะเกิดได้สูง ถึงแม้จะมีค่าความไวที่สูงขึ้น แต่หากมีผู้ป่วยจำนวนมากเข้ารับการตรวจวินิจฉัยอาจจะได้ผู้ที่มีผลบวกปลอมจำนวนมาก ทำให้สิ้นเปลืองทั้งเวลาและทรัพยากรในการตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมและผู้ป่วยอาจจะได้รับการรักษาเกินความจำเป็น สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า วิธี AO จะมีความไวมากกว่าวิธี ZN โดยมีค่าความไวเป็นร้อยละ 65.5 ค่า PPV ร้อยละ 100 และค่า NPV ร้อยละ 38.1⁽²²⁾ นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถยืนยันผลด้วยการตรวจทางพยาธิวิทยา (histopathological examination) แต่ละรายได้ ดังนั้น จึงยืนยันไม่ได้ว่าการพบ AO

ให้ผล BI เป็น 1+ จำนวนสองรายนั้นเป็นผลบวกจริงหรือเป็นผลบวกหลงจากการย้อมสี^(15, 16, 27) สาเหตุการเกิดผลบวกหลงจากการย้อมสีด้วยวิธี AO อาจเกิดจากการปนเปื้อนสิ่งแปลกปลอมในขั้นตอนการย้อม ปริมาณสาร fluorophore มีการกระจายตัวไม่ดีเห็นเป็นกลุ่มสี สารประกอบในตัวอย่างสามารถเรืองแสงได้เอง หรือการย้อมสีติดพื้นหลัง (background staining) เป็นต้น⁽²⁸⁾

ส่วนการย้อมสีเพื่อตรวจหา AFB อีกวิธีที่นิยมกัน คือ วิธี Fite-Faraco (FF) โดยมักนิยมใช้ย้อมสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อ (biopsy) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างที่ได้จากการทำ SSS และได้ปรับวิธีการย้อม FF โดยการตัดชิ้นตอน deparaffinization แล้วแช่สไลด์ในน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ก่อนย้อมตามวิธีปกติ ผลการศึกษาพบว่า วิธี FF มีค่าความไวสูงกว่าวิธี ZN รวมทั้งมีค่า PPV และค่า NPV เป็นร้อยละ 100 การมีความไวเพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากการปรับวิธีการย้อมในการศึกษาครั้งนี้ โดยการแช่ในน้ำมันถั่วเหลืองก่อนทำการย้อมปกติอาจช่วยเคลือบปกป้องผนังเซลล์ของแบคทีเรียและลดการสัมผัสกับสารละลาย acid-alcohol จนส่งผลให้ความไวของการทดสอบเพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ตรวจหา AFB ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นตัวอย่างชิ้นเนื้อ ที่พบว่าความไวของวิธี FF มีค่ามากกว่าค่าความไวของวิธี ZN โดยค่าความไวมีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 50 ถึง 77^(8, 16, 22) เนื่องจากวิธีการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นการย้อมสีวิธี FF กับตัวอย่างชิ้นเนื้อและใช้วิธี FF เป็นวิธีมาตรฐาน ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์ได้ค่าความไวแตกต่างจากการทดลองครั้งนี้ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการย้อมสีโดยใช้วิธี ZN เป็นวิธีอ้างอิง เนื่องจากการย้อมสี SSS เพื่อหา AFB จะใช้วิธี ZN เป็นวิธีมาตรฐาน จากผลการศึกษาพบวิธี FF และวิธี AO มีความไวเท่ากัน

(Table 5) แสดงว่าวิธี FF กับ วิธี AO สามารถใช้ทดแทนกันได้โดยความไวยังใกล้เคียงเดิม นอกจากนี้วิธี FF และ วิธี AO มีอัตราการตรวจพบเชื้อ AFB และมีความไวมากกว่าวิธี ZN บ่งชี้ว่าควรใช้การย้อมสีวิธี FF หรือวิธี AO ในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนแทนการใช้วิธี ZN

ปัจจุบันวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลที่รวดเร็วและมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *M. leprae* เช่น PCR ถูกนำมาใช้เพื่อเสริมกับวิธีการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกและการตรวจทางพยาธิวิทยา โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเรื้อนและเมื่อวิธีการตรวจทางคลินิกและการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่สามารถหาข้อสรุปได้ เนื่องจากวิธี PCR มีความจำเพาะสูง (ร้อยละ 100) และความไวร้อยละ 34 ถึง 80 ในผู้ป่วยเชื้อน้อยและมากกว่าร้อยละ 90 ในผู้ป่วยเชื้อมาก⁽²⁹⁾ ดังนั้นวิธี PCR จึงถูกนำมาใช้เป็นวิธีอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ โดยได้ตรวจหาเชื้อ *M. leprae* ด้วยวิธี real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป มียื่นเป้าหมายคือ *Pra* gene เนื่องจากยีนนี้มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. leprae* และมีอัตราการให้ผลบวกสูงถึงร้อยละ 74.8 ในผู้ป่วย PB ที่มีค่า BI เป็นลบ เมื่อเทียบกับการใช้ *M. leprae*-specific repetitive element (RLEP) เป็นยื่นเป้าหมาย⁽³⁰⁾ จากการศึกษาพบว่าอัตราการตรวจพบ *M. leprae* จากตัวอย่างการขูดรอยกรีดผิวหนังเป็นร้อยละ 60 ในผู้ป่วยเชื้อมาก และเป็นร้อยละ 0 ในผู้ป่วยเชื้อน้อย ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Martinez และคณะ⁽⁷⁾ ซึ่งมีอัตราการตรวจพบเชื้อจากชิ้นเนื้อเป็นร้อยละ 100 ในผู้ป่วยเชื้อมาก และอยู่ระหว่างร้อยละ 62.5-79.2 ในผู้ป่วยเชื้อน้อย ตามชนิดของวิธี PCR ที่ใช้ ที่เป็นเช่นนั้นอาจมีสาเหตุมาจากการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการขูดเนื้อเยื่อจากรอยกรีดผิวหนังอาจทำให้ได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อปริมาณน้อยกว่าการทำ biopsy เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างจากผู้ป่วยเชื้อน้อยมี

จำนวนเชื้ออยู่น้อย ทำให้โอกาสในการตรวจพบ AFB หรือ *Mycobacterium leprae* *Pra* gene ที่ได้จากตัวอย่างการกรีดผิวหนังของผู้ป่วยเชื้อน้อยจึงต่ำด้วย⁽⁷⁾ และการใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพต่างกัน ก็อาจทำให้อัตราการตรวจพบเชื้อต่างกันด้วย เนื่องจากเชื้อ *M. leprae* เป็นแบคทีเรียที่เจริญภายในเซลล์ รวมทั้งยังมีผนังเซลล์ที่สามารถทน acid-alcohol ได้ การใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพไม่ดีพอ อาจทำให้ไม่สามารถสกัด DNA ออกมาได้^(7, 22)

การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดคือ การเก็บตัวอย่าง slit-skin sample โดยการขูดด้วยใบมีดไม่สามารถควบคุมสภาวะของการขูดได้ เช่น แแรงกด ทิศทาง หรือจำนวนครั้งที่ขูด อาจทำให้ได้ตัวอย่างเนื้อเยื่อปริมาณไม่เท่ากันและส่งผลให้ได้ผลการตรวจในแต่ละวิธีแตกต่างกันได้ นอกจากนี้การศึกษานี้มีกลุ่มประชากรที่ศึกษามีขนาดเล็กเนื่องจากประเทศไทยมีความชุกของโรคเรื้อนลดน้อยลง รวมทั้งไม่มีผลตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อยืนยันและแยกชนิดของโรคเรื้อนซึ่งทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ความน่าจะเป็นของการใช้วิธีตรวจทั้ง 4 วิธีเพื่อนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยร่วมกับอาการทางคลินิกตามข้อบ่งชี้ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยแต่ละคนได้ จึงควรมีการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นเพื่อเพิ่มความแม่นยำทางสถิติ

สรุป

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพวิธี real-time PCR วิธี ZN วิธี FF และวิธี AO เพื่อหาเชื้อ *M. Leprae* จากตัวอย่างที่เก็บจากการกรีดผิวหนัง การศึกษาพบว่าการตรวจ SSS ในผู้ป่วยเชื้อมากด้วยวิธี real-time PCR การย้อมสีวิธี FF และวิธี AO มีอัตราการให้ผลบวกเท่าเทียมกันและมีความไวสูงกว่าวิธี ZN แต่เนื่องจากวิธี real-time PCR และการย้อมสีด้วยวิธี AO ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูงในการอ่านผลและต้องใช้อุปกรณ์เพิ่ม

ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการทั่วไป ดังนั้นเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการตรวจหา AFB จาก SSS ด้วยการย้อมสีวิธี FF ร่วมกับการประเมินอาการทางคลินิกสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยยืนยันโรคเรื้อนได้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. 2017 [cited 2023 April 30]:[106 p.]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290226383>.
2. World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec* 2022; 97: 429-50.
3. WHO Expert Committee on Leprosy & World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy [meeting held in Geneva from 17 to 24 November 1987] : sixth report. Geneva: World Health Organization; 1988.
4. WHO Expert Committee on leprosy & World Health Organization. WHO Expert Committee on leprosy: eighth report. WHO Technical Report Series [Internet]. 2012 [cited 2023 April 25]:[72 p.]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75151>.
5. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, *et al*. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1991-5.
6. Burgess PJ, Fine PE, Ponnighaus JM, Draper C. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the implications for their use in epidemiological studies. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 159-71.
7. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, *et al*. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3154-9.
8. Reja AH, Biswas N, Biswas S, *et al*. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2013; 79: 693-700.
9. Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1997; 65: 461-4.
10. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle* 1970; 51: 196-206.
11. Tharinjaroen CS. Review article: Tuberculosis diagnosis: From knowledge to innovation in public health. *JAMS* 2017; 50: 1-21. (in Thai)

12. Adiga DS, Hippargi SB, Rao G, Saha D, Yelikar BR, Karigoudar M. Evaluation of Fluorescent Staining for Diagnosis of Leprosy and its Impact on Grading of the Disease: Comparison with Conventional Staining. *J Clin Diagn Res* 2016; 10: EC23-EC6.
13. Ngamwachiraporn S, Chomean S, Rerksngarm T. Screening test of *Mycobacterium leprae* infection in paubacillary Leprosy patients by Rapid serological test. *TSTJ* 2018; 26: 1253-63. (in Thai)
14. Nayak SV, Shivarudrappa AS, Mukkamil AS. Role of fluorescent microscopy in detecting *Mycobacterium leprae* in tissue sections. *Ann Diagn Pathol* 2003; 7: 78-81.
15. Ulukanligil M, Aslan G, Tasci S. A comparative study on the different staining methods and number of specimens for the detection of acid fast bacilli. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95: 855-8.
16. Kalagarla S, Alluri R, Saka S, Godha V, Undavalli N, Kolalapudi SA. Efficacy of fluorescent microscopy versus modified Fite-Faraco stain in skin biopsy specimens of leprosy cases - a comparative study. *Int J Dermatol* 2022; 61: 595-9.
17. Swamy AKC, Patra AK. A Study on Comparison between Ziehl Neelsen Staining with Auramine Rhodamine Staining in Diagnosis of Paucibacillary Leprosy. *IJSR* 2019; 10: 177-81.
18. World Health Organization. Laboratory techniques for leprosy.: World Health Organization; 1987. 177 p.
19. Clapasson A, Canata S. Laboratory investigations in leprosy. In: Nunzi E, Massone C, Portaels F, editors. *Leprosy and buruli ulcer: a practical guide*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 61-70.
20. Rajapracha Samasai Institute. Guidelines for diagnosis of leprosy by slit-skin smear. 1st ed. Nonthaburi: National Buddhism Printing House; 2004. 73 p. (in Thai)
21. Truant JP, Brett WA, Thomas W, Jr. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull* 1962; 10: 287-96.
22. Girma S, Avanzi C, Bobosha K, *et al.* Evaluation of Auramine O staining and conventional PCR for leprosy diagnosis: A comparative cross-sectional study from Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12: e0006706.
23. Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawutisetee S, Sornprasit C, Kampirapap K, Peerapakorn S. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 45-9.
24. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977; 33: 363-74.

25. Hayes AF, Krippendorff K. Answering the Call for a Standard Reliability Measure for Coding Data. *Commun Methods Meas* 2007; 1: 77-89.
26. Pattyn SR. The problem of cultivation of *Mycobacterium leprae*. A review with criteria for evaluating recent experimental work. *Bulletin of the World Health Organization* 1973; 49: 403-10.
27. Jariwala HJ, Kelkar SS. Fluorescence microscopy for detection of *M. leprae* in tissue sections. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1979; 47: 33-6.
28. Pollock HM, Wieman EJ. Smear results in the diagnosis of mycobacterioses using blue light fluorescence microscopy. *J Clin Microbiol* 1977; 5: 329-31.
29. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2655.
30. Dehe BR, Coulibaly NgD, Kouakou H, *et al.* Comparative assessments of polymerase chain reaction (PCR) assay of repetitive sequence (RLEP) and proline rich antigen (PRA) gene targets for detection of *Mycobacterium leprae* DNA from paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients in Côte d'Ivoire. *GSCBPS* 2020; 11: 085-92.