การเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้านอณูชีววิทยา

ชนัฎตรี ก๋ำดี

กลุ่มวัณโรค สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์
กรมควบคุมโรค

คำย่อ (Abbreviation)

AFB	acid – fast bacilli
Ct	cycle Threshold
DCS	dry tube culture spot
FDCS	filter dry tube culture spot
ID	identification
INH	isoniazid
LPA	line probe assay
MDR –TB	multidrug resistant tuberculosis
MTB	*Mycobacterium Tuberculosis*
NTM	*Nontuberculous mycobacterium*
SPC	specimen probe check

สารบัญ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา 3
2. วัตถุประสงค์ของการศึกษา 3
3. สมมติฐานของการทดสอบ 3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
5. วิธีการดำเนินการศึกษา 4
6. ผลการศึกษาและการวิเคราะห์ข้อมูล 9
7. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 17
8. เอกสารอ้างอิง 19
9. ภาคผนวก 20

การเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้านอณูชีววิทยา

ชนัฎตรี ก่ำดี (วท.ม.), ธนิดา เหรียญทอง (วท.ม.) และ สมศักดิ์ เหรียญทอง (วท.ม.)

สำนักวัณโรค

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขของหลายประเทศทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทยที่พบวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) เพิ่มขึ้น การจะยุติปัญหาวัณโรคและป้องกันควบคุมวัณโรคดื้อยาต้องการรับการวินิจฉัยและรักษาที่รวดเร็ว ถูกต้อง ดังนั้นการตรวจทางอณูชีววิทยาที่ได้ผลที่ถูกต้อง รวดเร็วจึงมีความสำคัญยิ่ง การศึกษานี้ต้องการเตรียมตัวอย่างเพื่อควบคุมคุณการตรวจวัณโรควิธีอณูชีววิทยาโดยใช้วิธี Dry Tube Culture Spot (DCS) ทดสอบความปลอดภัยของตัวอย่างทีเตรียมได้ โดยเชื้อต้องตายนำไปเพาะเชื้อไม่เจริญ จำนวนเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่าง และคุณภาพของตัวอย่างในการทดสอบด้วยเทคนิค Line Probe Assay: GenoTypeMTBDRplus และเทคนิค Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF ผลการศึกษาพบว่าการเตรียมตัวอย่างนี้ปลอดภัยเชื้อไม่เจริญในอาหารเลี้ยง 100% ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมคือ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร (ค่า Cycle threshold, Ct ของการทดสอบของตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน (p = 0.481) และมีคุณภาพโดยให้ผลการทดสอบเทคนิค Line Probe Assay: GenoTypeMTBDRplus และเทคนิค Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF ตรงกัน 100% ผลการศึกษานี้นำไปพัฒนาในการเตรียมตัวอย่างต่อไป

คำสำคัญ : การควบคุมคุณภาพภายนอก, วิธีอณูชีววิทยา, เชื้อวัณโรค

Preparation samples of the quality of diagnostic test for rapid molecular biology of Mycobacterium.

Chanattree Kamdee (M.S.), Dhanida Rienthong (M.S.) and Somsak Rienthong (M.S.)
Bureau of tuberculosis

Abstract

Tuberculosis is a public health problem in many countries around the world, including Thailand where MDR-TB has increased. To end TB, need early diagnosed and treated promptly. This study aimed to prepare quality control samples for *M.tuberculosis*, molecular biology, using the Dry Tube Culture Spot (DCS). Then, tested for the safety of prepared samples by no growth of TB culture. The appropriate concentration of TB stocks to prepare and the Quality of samples were tested by the Line Probe Assay: GenoType MTBDRplus and Real-Time PCR: Xpert MTB / RIF technique. The results showed that this samples were safety.(100% TB strains were not growth on TB culture). The appropriate concentration were 10^7 cells/ml. (Cycle threshold, (Ct) of the sample was not significantly different p = 0.481). The results by Line Probe Assay: GenoTypeMTBDRplus and Real-Time PCR Technique: Xpert MTB / RIF were agreement 100%. The result of this study is to develop in preparation for the next.

Key words : External Quality Assessment, Molecular technique, *Mycobacterium tuberculosis*

บทนำ

วัณโรคเป็นสาเหตุหลักของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในหลายประเทศทั่วโลก ประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 22 ประเทศที่มีการระบาดของวัณโรคสูง[(1)] และปัจจุบันวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) เป็นภาระหนักที่กำลังขยายตัวออกไปเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองต่อการระบาดของโรควัณโรคในประเทศไทยก็จำเป็นที่จะต้องพัฒนาและสนับสนุนเทคโนโลยีและกลยุทธ์ใหม่ที่จะช่วยให้เพิ่มความสามารถของโปรแกรมการป้องกัน การวินิจฉัย และการรักษา [(2)]

การย้อมเสมหะด้วยสี acid fast bacilli (AFB) เป็นเทคนิควิธีที่รวดเร็วสำหรับวินิจฉัย เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของเชื้อ Mycobacterium รวมทั้งเชื้อวัณโรค แต่ต้องใช้ทักษะและประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ[(3)] และเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดด้านความไวที่ต่ำ ปัจจุบันความก้าวหน้าด้านการวินิจฉัยวัณโรคและการตรวจการดื้อยาจะใช้การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Liquid culture Method) หรือชุดตรวจทางอณูชีววิทยาโดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพต่อการค้นหาผู้ติดเชื้อซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงในการป้องกันวัณโรค

ปัจจุบันมีหน่วยงานบริการทางการแพทย์ สังกัดภาครัฐและภาคเอกชนเปิดให้บริการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาให้แก่ผู้ป่วยเพิ่มขึ้นโดยชุดตรวจที่ใช้มีหลักการ เช่น Line Probe Assay(LPA), Real-Time PCR และ In house PCR จากการสนับสนุนของสำนักวัณโรค และโครงการกองทุนโลก ด้านวัณโรค ทำให้มีการขยายการตรวจวินิจฉัยวัณโรคที่รวดเร็วและยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานโดย วิธี Real-Time PCR สนับสนุนเครื่อง GeneXpert และ วิธี Line Probe Assay (LPA) สนับสนุนเครื่อง GT-Blot 48 (เครื่องวิเคราะห์พันธุกรรมแบบอัตโนมัติ) ส่วนใหญ่การตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่อง GeneXpert จะอยู่ที่โรงพยาบาลขนาดใหญ่แต่สำหรับ LPA: GenoTypeMTBDRplus จะอยู่ที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคระดับเขต ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพสูงจะมีผลกระทบเชิงบวกต่อผลการดำเนินงานโครงการและระบบการดูแลสุขภาพอื่น ๆ ส่งผลให้มีการพัฒนาด้านคุณภาพ ความคุ้มค่า และความยั่งยืนในระยะยาวของระบบสุขภาพของประชาชนไทย การประกันคุณภาพ (Quality Assurance) เช่น การควบคุมคุณภาพ (Quality Control) การทดสอบความชำนาญและสมรรถภาพเป็นกระบวนการที่เป็นระบบสำหรับการตรวจสอบและปรับปรุงการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ[(4)]

กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โดยการสนับสนุนแหล่งทุนและวิชาการจากศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข (ศรทส.) เพื่อพัฒนาและเสริมสร้างระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการวัณโรคโดยมีการศึกษาการเตรียมสารมาตรฐานสำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยา

วัตถุประสงค์

1.เพื่อการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยาและทดสอบความไม่มีชีวิต (เชื้อตาย 100%) โดยการนำไปเพาะเชื้อต้องไม่เจริญ

2. คุณภาพของตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่เตรียมได้สำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยามีความถูกต้องมากกว่าร้อยละ 90

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- สามารถเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยาสำหรับใช้ในโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการเครือข่ายด้านการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาของประเทศ
- เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพทั้งใน ภายใน (Internal Quality control, IQC)และภายนอก (External Quality control, EQC) ในการควบคุมคุณภาพการตรวจเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วยวิธีอณูชีววิทยา

วิธีการดำเนินการทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ จะเป็นตัวอย่างเชื้อวัณโรคยาที่เก็บรักษาอยู่ในคลังสายพันธุ์อ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค ที่ทราบชนิด ลักษณะ/ชนิดของการดื้อโดยเป็นเชื้อ Mycobacterium ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง

การใช้ตัวอย่างเชื้อวัณโรคในการศึกษานี้ได้รับอนุญาตจากผู้อำนวยการสำนักวัณโรค เมื่อวันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2558

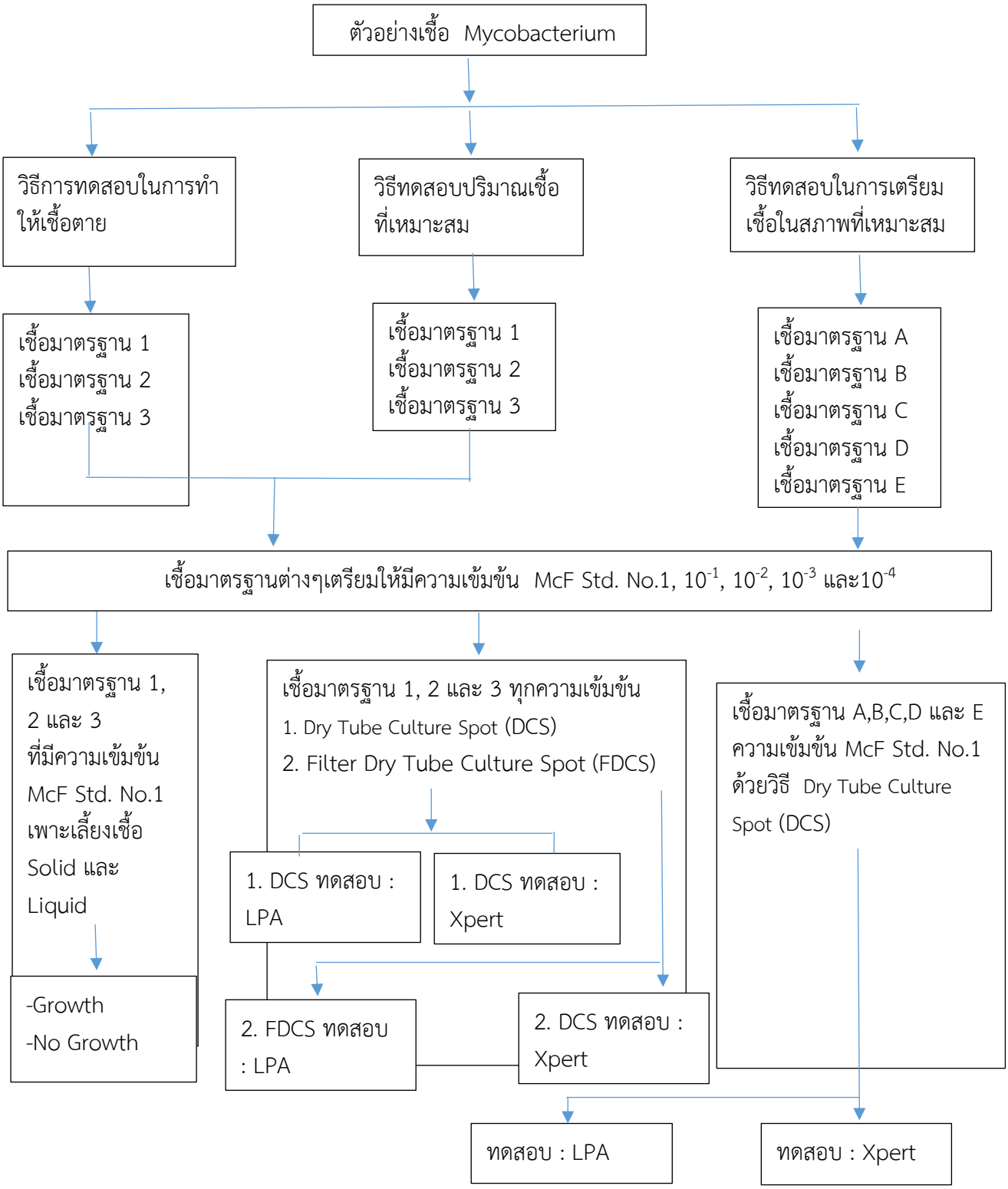
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง (Experimental Study) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยา ซึ่งจัดเตรียมโดยกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตร วัณโรคแห่งชาติ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. วิธีทดสอบในการทำให้เชื้อตาย
2. วิธีทดสอบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญ
3. วิธีทดสอบในการเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ

แผนภูมิที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium



ขั้นตอนที่ 1 วิธีในการทำให้เชื้อตาย และวิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเชื้อมาตรฐานสามสายพันธุ์ จากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค โดยเป็นเชื้อ มาตรฐาน 1 , เชื้อมาตรฐาน 2 และ เชื้อมาตรฐาน 3 โดยทั้งสามสายพันธุ์ นำมาทำให้มีความเข้มข้นของเชื้อต่างๆ คือ McFarland Standard No.1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} เซลล์/มิลลิลิตร ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ ให้เชื้อมีการเจริญเติบโตและมีอายุ 2-3 สัปดาห์ โดยดำเนินการดังนี้

หมายเหตุ เชื้อมาตรฐาน 1 คือ เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และไวต่อยา Rifampin (RIF:S.INH:R), เชื้อมาตรฐาน 2 เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ไวต่อยา Isoniazid และไวต่อยา Rifampin (RIF:S.INH:S) และเชื้อมาตรฐาน 3 เป็นเชื้อมาตรฐาน H37Rv (RIF:S.INH:S)

1.1 ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LJ mediums ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ ประมาณ 1 loop full (loop ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร)

1.2 เขี่ยเชื้อใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว (screw cap tube) ขนาด 13 × 100 มิลลิเมตรที่บรรจุลูกแก้ว (glass beads) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ประมาณ 7-8 ลูก และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หยด (ประมาณ 25 ไมโครลิตร)

1.3 นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า vortex mixer นาน 30 วินาที (จนโคโลนีของเชื้อแตกกระจายตัว)

1.4 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 5-7 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เชื้อที่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่มตกตะกอน

1.5 ดูดสารละลายแขวนตะกอนส่วนบนประมาณ 3 มิลลิลิตรใส่ Tube screwcap3 dram

1.6 เทียบกับความขุ่นมาตรฐาน McFarland Standard No.1 โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อซึ่งจะมีเชื้อประมาณ10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร ใช้เป็น Stock เชื้อ MTB

1.7 เตรียม bacterial suspension ที่ทำให้เจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ซึ่งมีเชื้ออยู่ 10^{6},10^{5},10^{4} และ 10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ และดำเนินการดังนี้

1.7.1 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจาก Stock MTB จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screw cap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร

1.7.2 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตรใส่ Tube screw cap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจาก เชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 2 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^{5} เซลล์/มิลลิลิตร

1.7.3 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screw cap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 3 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^{4} เซลล์/มิลลิลิตร

1.7.4 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 3 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screw cap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 4 ผสมให้เข้ากันดี จะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^{3} เซลล์/มิลลิลิตร

1.8 นำทุกหลอดไปต้มฆ่าเชื้อที่ 95-100^{o}C นาน 20 นาที

1.9 นำเชื้อที่มีความเข้มข้น McFarland Standard No.1 และผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้วมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LJ media) และชนิดเหลว (BBL MGIT) โดยหยด ตัวอย่าง ๆ ละ

0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และตัวอย่าง ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด (ทำ 3 ซ้ำ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1.10 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลล์เซียส และในเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ และ 42 วัน (6 สัปดาห์) ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญ (sensitivity ของเชื้อวัณโรคที่ความเข้มข้นในการเตรียมตัวอย่างในการควบคุมคุณภาพ)

นำตัวอย่างเชื้อมาตรฐานสามสายพันธุ์ จากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค) โดยเป็นเชื้อมาตรฐาน 1 , เชื้อมาตรฐาน 2 และ เชื้อมาตรฐาน 3 โดยทั้งสามสายพันธ์ นำมาทำให้มีความเข้มข้นของเชื้อต่างๆ คือ McFarland Standard No.1 , dilutions 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ซึ่งรวมทั้งหมดคือ 5 ความเข้มข้นของแต่ละเชื้อ โดยทุกความเข้มข้นมาทำเป็น Filter Dry Tube Culture Spot (FDCS) และ Dry Tube Culture Spot (DCS) เนื่องจาก Dry Culture Spot ที่ต้องสั่งซื้อราคาแพง ซึ่งชุดทดสอบอยู่ในรูปแบบของวงกลมบนกระดาษกรองจึงทำให้เกิดการเปรียบเทียบการใส่เชื้อบนกระดาษกรองแล้วใส่ในหลอดแล้วทำให้แห้งกับการใส่ตัวอย่างลงไปในหลอดแล้วทำให้แห้งการใส่หลอดเพื่อลดการสัมผัสตัวเชื้อกับเจ้าหน้าที่และเพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ เชื้อมาตรฐาน 1 คือ เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และไวต่อยา Rifampin (RIF:S,INH:R), เชื้อมาตรฐาน 2 เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ไวต่อยา Isoniazid และไวต่อยา Rifampin (RIF:S,INH:S) และเชื้อมาตรฐาน 3 เป็นเชื้อมาตรฐาน H37Rv (RIF:S,INH:S)

2.1 เตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพตามข้อ 1.1 ถึง 1.8 แล้ว นำเชื้อจากข้อ 1.8 ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้นจำนวนตัวอย่างละ 2 หลอด โดยใส่ Cryovial tube ละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยา คือ Real time PCR และ Line Probe Assay (LPA) เพื่อทดสอบว่าทุกตัวอย่างทุกความเข้มข้นมีเชื้อ

2.2 นำเชื้อจากข้อ 1.8 ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้นมาทำเป็น Filter Dry Tube Culture Spot (FDCS) โดยหยดตัวอย่าง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman filter paper No.3 ซึ่งมีขนาด 0.5 ตารางนิ้ว ที่บรรจุอยู่ใน Cryovial tubeให้ทั่ว

2.3 นำเชื้อจากข้อ 1.8 ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น มาทำเป็น Dry Tube Culture Spot (DCS) โดยหยดตัวอย่าง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตรใน Cryovial tube

2.4 นำข้อ 2.2 และ 2.3 ไปอบแห้งด้วย Hot air Oven ที่ 65°C นาน 4-5 ชั่วโมง

2.5 ทำการละลายตัวอย่างโดยนำหลอด Filter Dry Culture Spot ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น เติมน้ำกลั่นปราศจาก DNA 1.2 มิลลิลิตร อบที่ 37 °C นาน 12 ชั่วโมง ดึงกระดาษกรองออกและผสมส่วนที่เหลือให้เข้ากัน แบ่ง ตัวอย่างออกตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยวิธี Real time PCR : Xpert MTB/RIF และอีกหนึ่งหลอดทำ LPA: GenoTypeMTBDRplus

2.6 นำหลอด Dry Tube Culture Spot ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น เติมน้ำปราศจาก DNA 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งตัวอย่างออกตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยวิธี Real time PCR: Xpert MTB/RIF และอีกหนึ่งหลอดส่งทำ LPA: GenoTypeMTBDRplus

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบวิธีในการเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ

เตรียมตัวอย่างจากเชื้อ Mycobacteriumที่เป็น *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) และ *Nontuberculous mycobacterium* (NTM) จำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยเชื้อมาตรฐาน A, เชื้อมาตรฐานB, เชื้อมาตรฐานC, เชื้อมาตรฐาน D, และเชื้อมาตรฐาน E จากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ ที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์โดยเตรียมเป็น **Dry Tube Culture Spot (DCS)** เป็นตัวอย่างละ 100 หลอด และมีการสุ่มร้อยละ 10 ของแต่ละตัวอย่าง ของแต่ละตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus ที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค เพื่อทดสอบ Homogenous testing และ Reproducibility testing ตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

หมายเหตุ เชื้อมาตรฐาน A คือ H37Rv (RIF:S,INH:S), เชื้อมาตรฐาน B เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และไวต่อยา Rifampin (RIF:S,INH:R), เชื้อมาตรฐาน C เชื้อ *Mycobacterium Tuberculosis* ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และดื้อต่อยา Rifampin (RIF:R,INH:R), เชื้อมาตรฐาน D เป็นเชื้อมาตรฐาน H37Rv (RIF:S,INH:S) และเชื้อมาตรฐาน E เป็นเชื้อ *Nontuberculous mycobacterium* (*M.fortuitum*)

3.1 เตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพตามข้อ 1.1 ถึง 1.6 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร (Stock MTB) ให้มีปริมาตรประมาณ 12 มิลลิลิตร

3.2 นำทุกหลอดไปต้มฆ่าเชื้อที่ 95-100°C นาน 20 นาที

3.3 ดูดทุกตัวอย่างใส่ Cryovial tube ละ 0.1 มิลลิลิตร ไปอบแห้งด้วย Hot air Oven ที่ 65 °C นาน 4-5 ชั่วโมง เรียกว่า Dry Tube Culture Spot(DCS) จำนวนตัวอย่างละ 100 หลอด

3.4 สุ่มมาร้อยละ 10 เพื่อทดสอบความสม่ำเสมอ Homogenous testing ของการเตรียมโดยทดสอบทั้งวิธี Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus ที่สำนักวัณโรค

3.5 คำแนะนำการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจ

3.5.1 ตัวอย่างที่ได้รับเป็นตัวอย่างเชื้อที่อบแห้ง ก่อนทำการตรวจต้องทำละลายเชื้อก่อนโดยใช้น้ำกลั่นที่ให้มากับตัวอย่างใส่ในตัวอย่าง ๆ ละ 1,000 ไมโครลิตร

3.5.2 ผสมตัวอย่างให้ละลายโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วอย่างน้อย 5,000 รอบ/นาที อย่างน้อย 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอน มิฉะนั้นอาจทำให้ผลการตรวจเกิดความผิดพลาดและตัวอย่างอาจไม่พอสำหรับการตรวจและแบ่งตัวอย่างเป็น 2 หลอดๆละ 500 ไมโครลิตร เพื่อส่งตรวจวิธี Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus

3.5.3 ดำเนินตามขั้นตอนและวิธีการของแต่ละวิธี ยกเว้นหากท่านใช้ชุดตรวจ Xpert MTB/RIF ท่านต้องเติม Buffer อีก 2 มิลลิลิตร ก่อนดำเนินการขั้นต่อไป

3.5.4 ให้ดำเนินการตรวจตัวอย่าง EQA เช่นเดียวกับงานประจำวันตามขั้นตอนปกติที่ท่านทำการตรวจตัวอย่างทั่วไป และทำการตรวจโดยผู้ที่ปฏิบัติงานประจำวันในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

- ค่าร้อยละ(Percentage) ใช้สำหรับอธิบายเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไป
- ค่ามัชฌิมาเลขคณิตหรือ ค่าเฉลี่ย (Mean) อธิบายให้ทราบถึงภาพกว้างของข้อมูล
- สถิติ ANOVA ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดสอบ

ผลการทดสอบ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยา ซึ่งจะวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การทำให้เชื้อตาย ผลการทดสอบทุกตัวอย่างภายหลังจากต้มฆ่าเชื้อที่ 95-100°C นาน 20 นาที และนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อทุกตัวอย่างที่มีความเข้มข้น McFarland Standard No.1

2. ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญจากทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้นใส่ Cryovial tube ละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 2 หลอด ที่ผ่านกระบวนการ Filter Dry Culture Spot (FDCS) และ Dry Tube Culture Spot แล้วส่งทดสอบด้วย Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus พบว่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland Standard No.1 หรือ10^7 เซลล์/มิลลิลิตรสามารถตรวจวินิจฉัยได้ถูกต้อง ทุกตัวอย่าง แต่เชื้อที่ถูกเจือจางไป 10^{-1} หรือเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบทั้ง Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus พบว่าสามารถตรวจวินิจฉัยได้บางตัวอย่าง และเมื่อนำเชื้อที่ถูกเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} เป็นต้นไป หรือมีความเข้มข้นของเชื้อ10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นต้นไปทดสอบทั้งReal-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ ดังนั้นความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการนำมาทำการประเมินคุณภาพจึงเลือกใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland Standard No.1 หรือ 10^7เซลล์/มิลลิลิตร และด้วยวิธี Dry Tube Culture Spot เพราะมีขั้นตอนการดำเนินงานไม่ยุ่งยากแต่ได้ผลเหมือนกันดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1.การเตรียมตัวอย่างปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความชำนาญ

Test No.	ผลการทดสอบ											
	Dry Tube Culture Spot						Filter Dry Culture Spot (FDCS)					
	LPA				Xpert		LPA				Xpert	
	INH		RIF		RIF		RIF		INH		RIF	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
INH: R / RIF: S												
McF No.1		R	S		S		S			R	S	
10^{-1}		Not detected	Not detected		S		Not detected			Not detected	S	
10^{-2}		Not detected	Not detected		Not detected		Not detected			Not detected	Not detected	
10^{-3}		Not detected	Not detected		Not detected		Not detected			Not detected	Not detected	
10^{-4}		Not detected	Not detected		Not detected		Not detected			Not detected	Not detected	
INH: S / RIF: S												
McF No.1	S		S		S		S		S		S	
10^{-1}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
10^{-2}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
10^{-3}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
10^{-4}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
H37Rv (INH: S / RIF: S)												
McF No.1	S		S		S		S		S		S	
10^{-1}	Not detected		Not detected		S		Not detected		Not detected		S	
10^{-2}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
10^{-3}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	
10^{-4}	Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected		Not detected	

หมายเหตุ S; Susceptible, R; Resistant

3. การเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ จากการทดสอบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความชำนาญพบว่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland Standard No.1 หรือ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถตรวจวินิจฉัยได้ถูกต้อง ทุกตัวอย่างทั้ง Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus โดยเตรียมตัวอย่างจากเชื้อ Mycobacterium ที่เป็น *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) และ *Nontuberculous mycobacterium* (NTM) จำนวน 5 ตัวอย่าง จากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค) ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ ที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์โดยเตรียมเป็น **Dry Tube Culture Spot (DCS)** เป็นตัวอย่างละ 100 หลอด และมีการสุ่มร้อยละ 10 ของแต่ละตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Real-Time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus ที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค

สำหรับการทดสอบด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus จะแสดงให้เห็นในรูปของแถบสีและมาแปลผลว่าเชื้อที่ทดสอบเป็นเชื้อวัณโรค และแปลผลว่าเชื้อมีความดื้อหรือไวต่อยา INH หรือ RIF แต่สำหรับ การทดสอบด้วย Xpert MTB/RIF จะแปลผลออกมาให้เลยว่าเป็น MTB หรือไม่ และดื้อหรือไวต่อยา RIF และยังแสดงปริมาณเชื้อที่แสดงค่า Cycle Threshold (Ct) ซึ่งจะบอกว่าปริมาณเชื้อ MTB ที่ตรวจพบ

ตารางที่ 2. แสดงจำนวนตัวอย่างควบคุณคุณภาพที่เตรียมและปริมาณเชื้อที่แสดงค่า Cycle Threshold (Ct) (

MTB result	Ct range	จำนวนตัวอย่าง (%)
High	< 16	
Medium	16 – 22	
Low	22 – 28	48 (96)
Very Low	> 28	2(4)
Negative	> 36	

ตารางที่ 3. แสดงผลการทดสอบLPA: GenoTypeMTBDRplus และ Xpert MTB/RIF

Test No.	ผลการทดสอบ										
	LPA						Xpert				
	ID		ผลการทดสอบต่อยา				ID		MTB		SPC(Ct)
	NTM	MTB	INH		RIF		NTM	MTB	RIF		
			S	R	S	R			S	R	
H37Rv (INH: S / RIF: S)											
A1	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		23.4
A2	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.7
A3	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.3
A4	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.8
A5	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.5
A6	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.5
A7	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.8
A8	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		23.6
A9	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		23.0
A10	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.2
HE (INH: R / RIF: S)											
B1	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		25.2
B2	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		24.4
B3	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		24.2
B4	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		27.1
B5	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		23.8

Test No.	ผลการทดสอบ										
	LPA						Xpert				
	ID		MTB				ID		MTB		SPC(Ct)
	NTM	MTB	INH		RIF		NTM	MTB	RIF		
			S	R	S	R			S	R	
B6	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		29.2
B7	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		23.1
B8	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		25.1
B9	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		24.9
B10	not detected	Detected		R	S		not detected	Detected	S		26.4
MDR (INH: R / RIF: R)											
C1	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	25.1
C2	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	26.5
C3	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	24.0
C4	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	23.4
C5	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	23.3
C6	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	27.0
C7	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	25.2
C8	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	28.1
C9	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	24.8
C10	not detected	Detected		R		R	not detected	Detected		R	23.8

Test No.	ผลการทดสอบ										
	LPA						Xpert				
	ID		MTB				ID		MTB		SPC(Ct)
	NTM	MTB	INH		RIF		NTM	MTB	RIF		
			S	R	S	R			S	R	
H37Rv (INH: S / RIF: S)											
D1	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.8
D2	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		22.9
D3	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		26.7
D4	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.2
D5	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.1
D6	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.5
D7	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		26.5
D8	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.0
D9	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		25.0
D10	not detected	Detected	S		S		not detected	Detected	S		24.0
M. .fortuitum											
E1	Detected	not detected	Not done				Detected	not detected	Not done		25.5
E2	Detected	not detected					Detected	not detected			26.2
E3	Detected	not detected					Detected	not detected			24.9
E4	Detected	not detected					Detected	not detected			24.4
E5	Detected	not detected					Detected	not detected			26.6
E6	Detected	not detected					Detected	not detected			25.5
E7	Detected	not detected					Detected	not detected			24.7

Test No.	ผลการทดสอบ									
	LPA						Xpert			
	ID		MTB				ID		MTB	SPC(Ct)
	NTM	MTB	INH		RIF		NTM	MTB	RIF	
			S	R	S	R			S	R	
E8	Detected	not detected	Not done				Detected	not detected	Not done		23.8
E9	Detected	not detected					Detected	not detected			25.1
E10	Detected	not detected					Detected	not detected			25.3

หมายเหตุ S; Susceptible, R; Resistant, ID; Identification, SPC; Specimen probe check, Ct = Cycle threshold

จากตารางที่ 3. ผลการทดสอบ จำนวน 50 ตัวอย่าง ที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค พบว่าด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF ให้ผลตรงกันคือสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็น MTB หรือ NTM และสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อวัณโรคที่มีความดื้อหรือไวต่อยา INH และ RIF ได้ถูกต้องตรงกันคิดเป็นร้อยละ 100 และพบว่าปริมาณเชื้อที่แสดงค่า Ct 22-28 มีจำนวน 48 ตัวอย่าง และ Ct > 28 มีจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 96 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 4. แสดง Cycle threshold ของการทดสอบด้วยวิธี Xpert MTB/RIF

		Cycle threshold (Ct) of Xpert MTB/RIF			
เชื้อ	จำนวน	ค่าเฉลี่ย	StdDev	ค่าสูงสุด	ค่าต่ำสุด
เชื้อมาตรฐาน A และ D	20	24.68	1.03	26.7	22.9
เชื้อมาตรฐาน B	10	25.34	1.79	29.2	23.1
เชื้อมาตรฐาน C	10	25.12	1.62	28.1	23.3
เชื้อมาตรฐาน E	10	25.20	0.82	26.6	23.8
Total	50	25.00	1.30	29.2	22.9

จากตารางที่ 4. จากการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่างด้วยวิธี Xpert MTB/RIF พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ Cycle threshold เท่ากับ 25.0

ตารางที่ 5. แสดงผลการทดสอบความแปรปรวน (Homogeneity)

	Test Statistics				
Xpert Ct					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	P
Between Groups	.020	1	.020	.505	.481
Within Groups	1.900	48	.040		
Total	1.920	49			

จากตารางที่ 5. การทดสอบความแปรปรวน (Homogeneity) ของตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่างด้วยวิธี Xpert MTB/RIF โดยดูจากค่า Cycle threshold และทดสอบด้วย ANOVA พบว่าผลการทดสอบของตัวอย่างทั้งห้ากลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (P-value เท่ากับ 0.481) อย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ หมายถึงการเตรียมตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมีความเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 6. แสดงจำนวนผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTB และ การทดสอบความไวต่อยา ด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus เพื่อดูความแปรปรวน (Homogeneity)

วิธีการทดสอบ	ผลการตรวจ RIF			ค่า p-value
LPA: GenoTypeMTBDRplus	Susceptible	Resistant	Not evaluate	
MTB	30	10	0	
NTM	0	0	10	

จากตารางที่ 6. การทดสอบความแปรปรวน (Homogeneity) วิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus ซึ่งผลการทดสอบเป็นเชิงคุณภาพจึงทำการเปรียบเทียบผลความถูกต้องของการตรวจพิสูจน์และจำแนกชิดของเชื้อกับเชื้อมาตรฐาน คือได้ผลการทดสอบ concordance ร้อยละ 100 positive และ ร้อยละ 100 negative หมายถึงการตรวจวินิจฉัยได้ว่าเป็น MTB หรือ NTM และสามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อวัณโรคที่มีความดื้อหรือไวต่อยา INH และ RIF ได้ถูกต้องตรงกันคิดเป็นร้อยละ 100 วิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus ไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 7. แสดงจำนวนผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTB และ NTM ด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF

วิธีการทดสอบ	ผลการตรวจ	
	MTB	NTM
LPA: GenoTypeMTBDRplus	40	10
Xpert MTB/RIF	40	10

จากตารางที่ 7. พบว่า ผลการทดสอบทั้งสองวิธี คือ LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTB และ NTM ให้ผลการทดสอบเหมือนกัน

ตารางที่ 8. แสดงจำนวนผลการทดสอบความไวต่อยา RIF ด้วยด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF

วิธีการทดสอบ	ผลการตรวจ RIF	
	Susceptible	Resistant
LPA: GenoTypeMTBDRplus	30	10
Xpert MTB/RIF	30	10

จากตารางที่ 8. พบว่า ผลการทดสอบทั้งสองวิธี คือ LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF ในการตรวจวินิจฉัยผลการทดสอบความไวต่อยา RIF ของเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยาทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกัน

สรุปและอธิปรายผลการทดสอบ

จากการทดสอบว่าเชื้อตายหรือไม่โดยนำเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7เซลล์/มิลลิลิตร ที่ผ่านการต้มที่ 95 °C นาน 20 นาที เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และอาหารเหลวของเชื้อทุกตัวอย่างแสดงว่าด้วยวิธีดังกล่าวเชื้อเหลว พบว่าทั้งสองวิธีหลังจากไปอบเพาะเชื้อที่ 37 °C แล้ว ไม่มีการเจริญเติบโตแสดงว่าเมื่อผ่านการต้มสามารถฆ่าเชื้อให้ตาย และวิธีการเตรียมตัวอย่างจะเห็นได้ว่าการทดสอบเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7เซลล์/มิลลิลิตร สามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้ง Filter Dry Culture Spot (FDCS) และ Dry Tube Culture Spot (DCS) จากผลการทดสอบสรุปว่าเลือกใช้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และ Dry

Tube Culture Spot (DCS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการดำเนินงานน้อยกว่าได้แต่ผลการทดสอบเหมือนกัน และเมื่อนำมาทดสอบความเหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับการทดสอบความชำนาญโดยทำการสุ่มตัวอย่าง ร้อยละ 10 ซึ่งมีตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง เมื่อผสมตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดี่ยวกันแล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เพื่อทดสอบด้วยเวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Xpert MTB/RIF อย่างละ 50 ตัวอย่างโดยทำการทดสอบที่ กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค พบว่าด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Xpert MTB/RIF จำนวน 50 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐานร้อยละ 100 ทำการทดสอบทางสถิติความแปรปรวน (Homogeneity) ของตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่างด้วยวิธี Xpert MTB/RIF โดยดูจากค่า Cycle threshold ไม่มีความแตกต่างกัน (p-value เท่ากับ 0.481) อย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ ความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธี Real time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus พบว่าผลการทดสอบของตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน และความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบความไวต่อยา RIF ด้วยวิธีReal time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: GenoTypeMTBDRplus พบว่าผลการทดสอบของตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาการประเมินคุณภาพของ Xpert MTB/RIF ของ L.E. Scott et.al ที่ South Africa ในปี 2011 โดยนำเชื้อที่ตายแล้วไปหยดบนกระดาษ whatmann จำนวน 25 ไมโครลิตร แล้วตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่มีเครื่อง Xpert MTB/RIF ทั้งหมด 26 แห่ง จำนวน 274 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่ามี 6 ตัวอย่าง error และ 268 ตัวอย่างให้ผลถูกต้องตรงกัน คิดเป็นร้อยละ 97.8 ซึ่งผลสอดคล้องกับการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับทดสอบความชำนาญการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่จัดทำขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน และ คุณสมบูรณ์ หนูไข่ ที่ช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ. 2556 ; 3.

2. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, แนวทางการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา, 2558 ; 7-13.

3 . Association of Public Health Laboratory. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. Washington. DC. 2002; 9.

4. สมศักดิ์ เหรียญทอง, ธนิดา เหรียญทอง : หนังสือที่ระลึกครบรอบ 80 ปี สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์. Novel diagnosis tests for TB. A current status and what direction should we move.พ.ศ. 2558; 94-108.

5. บันทึกข้อความ กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค ที่ สธ 0438.6/330
เรื่อง ขอความอนุเคราะห์ใช้ตัวอย่างเชื้อจากคลังสายพันธ์อ้างอิงเชื้อวัณโรค
สำนักวัณโรค. 14 กันยายน 2558; 1.

6. ธนิดา เหรียญทอง. มาตรฐานการปฏิบัติงานการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค กลุ่มห้องปฏิบัติการอ้างอิงวัณโรค สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางสัมพันธ์. 2548.

7. กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. Rapid detection for early appearance of Rifampicin and Isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, 2552; 12 – 14.

8. ภิรมย์ กมลรัตนกุล, มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์ และ ทวีสิน ตันประยูร. หลักการทำวิจัยให้สำเร็จ.คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บริษัทเทกซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด. 2542; 115-124.

9. บริษัทไบโอมีเดีย (ประเทศไทย) จำกัด. คู่มือการใช้งาน Gene Xpert Dx System (Software Version 4.0). บทที่ 5: 2.

10. L. E. Scott, N. Gous, B. E.Cunningham. Ect; Dried Culture Spots for Xpert MTB/RIF External Quality Assessment: Results of a Phase 1 Pilot Study in South Africa. Journal of Clinical Microbiology, Dec. 2011; Vol. 49, No. 12: 4356–4360.

ภาคผนวก

ตารางแสดงจำนวนผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อ MTB และ NTM ด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF

วิธีการทดสอบ	LPA		Total
	MTB	NTM	
Xpert : MTB	40	0	40
: NTM	0	10	10
Total	40	10	50

หมายเหตุ

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	50.000[a]	1	.000		
Continuity Correction[b]	43.945	1	.000		
Likelihood Ratio	50.040	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	49.000	1	.000		
N of Valid Cases[b]	50				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.

b. Computed only for a 2x2 table

ตารางแสดงจำนวนผลการทดสอบความไวต่อยา RIF ด้วยด้วยวิธี LPA: GenoTypeMTBDRplus และ Real-Time PCR :Xpert MTB/RIF

วิธีการทดสอบ	**LPA: GenoTypeMTBDRplus**		**Total**
Xpert	**RIF : S**	**RIF : R**	
RIF : S	30	0	30
RIF : R	0	10	10
Total	30	10	40

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	40.000[a]	1	.000		
Continuity Correction[b]	34.844	1	.000		
Likelihood Ratio	44.987	1	.000		
Fisher's Exact Test				.000	.000
Linear-by-Linear Association	39.000	1	.000		
N of Valid Cases[b]	40				

a. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.50.

b. Computed only for a 2x2 table

LPA * LPARIF Crosstabulation

Count

		LPARIF			
		RIF Not Detected	RIF Detected	not evaluate	Total
LPA	MTB	30	10	0	40
	NTM	0	0	10	10
Total		30	10	10	50

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig.
Pearson Chi-Square	50.000[a]	2	.000
Likelihood Ratio	50.040	2	.000
Linear-by-Linear Association	37.516	1	.000
N of Valid Cases	50		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.00.