กรมควบคุมโรค
DEPARTMENT OF DISEASE CONTROL

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ระหว่างวิธี Line Probe Assay และวิธี Xpert MTB/XDR

Comparative Analysis of Multidrug-Resistant Tuberculosis Detection between Line Probe Assay and Xpert MTB/XDR

นางสาวนงเยาว์ มีสิทธิ์
นางสาวศศิพร ตั้งพรชัย
นางสาวเกษศินี แสงสว่าง

สิงหาคม 2567

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ระหว่างวิธี Line Probe Assay และวิธี Xpert MTB/XDR

Comparative Analysis of Multidrug-Resistant Tuberculosis Detection between Line Probe Assay and Xpert MTB/XDR

นางสาวนงเยาว์ มีสิทธิ์
นางสาวศศิพร ตั้งพรชัย
นางสาวเกษศินี แสงสว่าง

สนับสนุนโดย สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี

คำนำ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงและวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Pre-XDR/XDR-TB) ในผู้ป่วยที่มีผลเสมหะเป็นบวก โดยใช้วิธี Line Probe Assay และ Xpert MTB/XDR ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือน กันยายน 2566 ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 6 รายงานฉบับนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อการค้นหาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา ได้อย่างรวดเร็ว ผลการตรวจวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำและมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดระยะเวลาการรอคอยผล รายงานผลได้อย่างรวดเร็ว สนับสนุนการป้องกันและควบคุมการดื้อยาในพื้นที่ได้อย่างทันท่วงที ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาได้รับการรักษาด้วยสูตรยาที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อยกระดับคุณภาพในการดูแลรักษาและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคดื้อยาที่มีประสิทธิภาพต่อไป จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์กับหน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง รวมถึงประโยชน์ในการบริหารการจัดการวัณโรคต่อไป ทั้งนี้ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวนงเยาว์ มีสิทธิ์
นางสาวศศิพร ตั้งพรชัย
นางสาวเกษศินี แสงสว่าง
ทีมผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ระหว่างวิธี Line Probe Assay และวิธี Xpert MTB/XDR ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 ในเขตสุขภาพที่ 6 ดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่สนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นางสาวนงเยาว์ มีสิทธิ์
นางสาวศศิพร ตั้งพรชัย
นางสาวเกษศินี แสงสว่าง
ทีมผู้วิจัย

หัวข้อวิจัย การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานระหว่างวิธี Line Probe Assay และวิธี Xpert MTB/XDR

ชื่อผู้วิจัย นงเยาว์ มีสิทธิ์, ศศิพร ตั้งพรชัย, เกษศินี แสงสว่าง

หน่วยงาน สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี

ปีงบประมาณ 2566-2567

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานระหว่างวิธี Line Probe Assay (LPA) กับวิธีการทดสอบ Xpert MTB/XDR โดยใช้ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 6 ที่ส่งมาที่ห้องปฏิบัติการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี จำนวน 454 ตัวอย่าง การศึกษาพบว่า วิธี Xpert MTB/XDR ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการ LPA ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 โดยทำการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรค, หาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Isoniazid (H), Fluoroquinolone (FQ) และหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Second line injectables (Capreomycin, Amikacin, Kanamycin) ตามลำดับ โดยวิธี Xpert MTB/XDR แสดงประสิทธิภาพสูงทุกการทดสอบ มีค่าความถูกต้อง 98.68% , 99.50% , 100% , 100% ตามลำดับ, ค่าความไว 100% ทุกการทดสอบ, ค่าความจำเพาะ 88.24% , 98.23% , 100% , 100% ตามลำดับ, ค่าทำนายผลบวก 98.53% , 99.32% , 100% , 100% ตามลำดับ และค่าทำนายผลลบ 100% ทุกการทดสอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการตรวจหาการดื้อยา FQ และยาในกลุ่ม Second line injectables ที่แสดงค่าประสิทธิภาพสูงสุดที่ 100% ในทุกตัวชี้วัดที่ศึกษา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธี Xpert MTB/XDR มีประสิทธิภาพที่ดีเทียบเท่ากับวิธี LPA เป็นอีกวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง และวัณโรคหลายขนานชนิดรุนแรงมาก เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก รายงานผลได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาได้รับการรักษาด้วยสูตรยาที่ถูกต้องและเหมาะสม ทำให้เกิดคุณภาพในการดูแลรักษา และควบคุมการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : วัณโรคดื้อยาหลายขนาน, Line Probe Assay, Xpert MTB/XDR

Title: Comparative Analysis of Multidrug-Resistant Tuberculosis Detection between Line Probe Assay and Xpert MTB/XDR

Researcher: Nongyao Mesithi, Sasiporn Tungpornchai, Kadsinee Saengsawang

Academic Year: 2023-2024

Abstract

The objective of this study was to compare the detection of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) using Line Probe Assay (LPA) and Xpert MTB/XDR methods with samples from hospitals in the Health Region 6 area, which were sent to the laboratory of the Disease Prevention and Control Office 6 in Chonburi Province, Totaling 454 samples. The study found that the Xpert MTB/XDR method yielded results consistent with the LPA method using the GenoType MTBDRplus Ver 2.0 and GenoType MTBDRsl VER 2.0 assays. This included detecting tuberculosis (TB), TB resistant to Isoniazid (INH), Fluoroquinolone (FQ), and TB resistant to Second-line injectables (Capreomycin, Amikacin, Kanamycin) respectively. The Xpert MTB/XDR method demonstrated high performance in all tests, with accuracy rates of 98.68%, 99.50%, 100%, and 100% respectively, sensitivity of 100% in all tests, and specificity of 88.24%, 98.23%, 100%, and 100% respectively. The positive predictive values were 98.53%, 99.32%, 100%, and 100% respectively, and the negative predictive values were 100% for all tests. Particularly, the detection of FQ and Second-line injectable drug resistance showed the highest performance with 100% in all studied indicators. The study indicates that the Xpert MTB/XDR method is as effective as the LPA method and can be used to detect multidrug-resistant tuberculosis, extensively drug-resistant tuberculosis, and highly resistant multidrug-resistant tuberculosis. It is a straightforward method that provides rapid results, ensuring that patients with drug-resistant tuberculosis receive appropriate and accurate treatment, thereby improving care quality and effectively controlling the spread of drug-resistant TB.

Key words : Multidrug-resistant tuberculosis, Line Probe Assay, Xpert MTB/XDR

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 คำถามการวิจัย / กรอบแนวคิดการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 นิยามศัพท์	5
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัณโรค	7
2.2 การแพร่กระจายเชื้อวัณโรค	7
2.3 ยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (First-line anti-TB drug; FLD)	10
2.4 วัณโรคดื้อยา	11
2.5 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Xpert MTB/XDR	12
2.6 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Line Probe Assay	13
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	19
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	
3.1 รูปแบบการศึกษา วิจัย	23
3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	23
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล	23
3.4 ขั้นตอนการศึกษา	37
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	37
3.6 ระยะเวลาการศึกษา	38
บทที่ 4 ผลการศึกษา วิจัย	39
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	46
ประวัติผู้วิจัย	49

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 แสดงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Latent TB infection; LTBI) 8
ตารางที่ 2-2 แสดงพยาธิกำเนิดของการป่วยวัณโรคลุกลาม (Active TB disease) 9
ตารางที่ 2-3 ข้อแตกต่างระหว่างการติดเชื้อวัณโรคแฝงและการป่วยเป็นวัณโรค 9
ตารางที่ 2-4 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV, และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา H 20
ตารางที่ 2-5 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม FQ 20
ตารางที่ 2-6 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Km 21
ตารางที่ 2-7 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Am 21
ตารางที่ 2-8 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Eto 22
ตารางที่ 3-1 การกลายพันธุ์ในยีน *katG* และตำแหน่ง Wild Type และ Mutation ที่เกี่ยวข้อง 29
ตารางที่ 3-2 การกลายพันธุ์ในยีน *inhA* และตำแหน่ง Wild Type และ Mutation ที่เกี่ยวข้อง 30
ตารางที่ 3-3 การกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* และตำแหน่ง Wild Type และ Mutation 31
ตารางที่ 3-4 การกลายพันธุ์ในยีน *gyrB* และตำแหน่ง Wild Type และ Mutation 31
ตารางที่ 3-5 การกลายพันธุ์ในยีน *rrs* และการดื้อยาข้ามกลุ่มต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม AG/CP 31
ตารางที่ 3-6 การกลายพันธุ์ในยีน *eis* และการดื้อยา Kanamycin Low-level KAN resistance 32
ตารางที่ 3-7 ผลการทดสอบและการแปลผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา (MTB/XDR) 32
ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจGenoType MTBDRplus Ver 2.0 และGenoType MTBDRsl VER 2.0 39
ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ วัณโรคที่มีการดื้อยา H ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 40
ตารางที่ 4-3 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ วัณโรคที่มีการดื้อยา FQ ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 40
ตารางที่ 4-4 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Second line injectables ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 41
ตารางที่ 5-1 ค่าสถิติการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน โดยวิธี Xpert MTB/XDR 42
ตารางที่ 5-2 การเปรียบเทียบของการตรวจด้วยวิธี LPA และ Xpert MTB/XDR 44

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1-1 แสดงกรอบแนวคิดวิจัย 4
รูปที่ 2-1 แสดงการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรค 11
รูปที่ 2-2 เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ที่ดื้อยาในรูปแบบ 3 มิติ ด้วยคอมพิวเตอร์ 11
รูปที่ 2-3 แสดงตำแหน่งที่มักพบการดื้อยา Rifampicin ของยีน *rpoB* ที่ชุดตรวจ GenoType MTBDRplus สามารถตรวจหาการดื้อยา R ได้ 14
รูปที่ 2-4 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR 15
รูปที่ 2-5 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Sodium hydroxide (DEN buffer) 16
รูปที่ 2-6 แสดงการทำปฏิกิริยา Hybridization เติม green hybridization buffer (HYB) 16
รูปที่ 2-7 แสดงการเกิด Non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา hybridization 17
รูปที่ 2-8 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Conjugation buffer 18
รูปที่ 2-9 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Substrate 19
รูปที่ 3-1 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมในการทดสอบเชื้อวัณโรค 26
รูปที่ 3-2 การแปลผลการตรวจวัณโรคดื้อยาด้วย Genotype MTBDRplus Ver 2.0 28
รูปที่ 3-3 แถบ Wild Type (WT) และ Mutation (MUT) ของยีน *rpoB* 29
รูปที่ 3-4 การแปลผลการตรวจวัณโรคดื้อยาแนวที่ 2 SL-LPA ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl VER 2.0 30

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

องค์การอนามัยโลกกำหนดยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค มีเป้าหมายลดอุบัติการณ์วัณโรคให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากรโลกภายในปี พ.ศ. 2578 วัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย จากรายงานองค์การอนามัยโลกเมื่อปี 2558 ประเทศไทยจัดอยู่กลุ่มประเทศที่มีปัญหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา การแพร่ระบาดโดยเฉพาะเชื้อวัณโรคดื้อยาหลาขนานเป็นปัญหาในการควบคุมวัณโรค การเร่งรัดค้นหาผู้ป่วยวัณโรคให้ได้รับการวินิจฉัยด้วยวิธีการตรวจที่รวดเร็วเป็นสิ่งสำคัญ [1]

จากรายงานขององค์การอนามัยโลก ปี ค.ศ. 2016 พบผู้ป่วยวัณโรค 10.4 ล้านราย โดย 580,000 ราย เป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด multidrug resistant tuberculosis/rifampicin resistant tuberculosis (MDR/RR-TB) คือ ดื้อต่อ Isoniazid (H) และ Rifampicin (R) หรือดื้อต่อ Rอย่างไรก็ตาม มีผู้ป่วยเพียงร้อยละ 20 คือ 125,000 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยและขึ้นทะเบียนการรักษา ส่วนผลสำเร็จของการรักษาวัณโรคดื้อยา MDR/RR-TB พบเพียงร้อยละ 52 [2-3]

ในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่า มีผู้ป่วย MDR/RR-TB ประมาณ 2,500 ราย อย่างไรก็ตาม มีผู้ป่วยเพียง 500 รายที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยและขึ้นทะเบียนการรักษา โดยร้อยละ 5 ถึง 8 ของ MDR/RR-TB เป็น extensive drug resistant tuberculosis (XDR-TB) ผลการรักษาสำเร็จโดยรวมของ MDR/RR-TB และ XDR-TB ประมาณร้อยละ 40 ถึง 50 ดังนั้น แนวทางการรักษาวัณโรคดื้อยาที่ออกมาในปี ค.ศ. 2016 จากการเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยาทั่วโลก ขององค์การอนามัยโลก (WHO, 2014 และ WHO, 2020) พบว่าประมาณร้อยละ 3.5 (95%CI 2.2-3.5%) ของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลกเป็น MDR-TB และพบสูงถึงประมาณร้อยละ 20.5 (95%CI 13.6-27.5%) ในผู้ป่วยที่เคยรักษามาก่อน โดยร้อยละ 9 (95%CI 6.5-11.5%) ของผู้ป่วย MDR-TB เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (XDR-TB) จากการเก็บข้อมูลถึงเดือนกันยายน ค.ศ. 2013 (พ.ศ. 2556) พบว่ามีผู้ป่วย XDR-TB ใน 100 ประเทศทั่วโลก [4] โดยองค์การอนามัยโลกมีมาตรการและกลยุทธ์ต่างๆ เพื่อพัฒนาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาให้มีประสิทธิภาพและได้ผลการตรวจที่รวดเร็ว การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานมีหลายวิธี เช่นการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาเป็นวิธีมาตรฐาน แต่มีข้อจำกัดคือใช้เวลานาน

โดยองค์การอนามัยโลก จึงเน้นเรื่องการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วภายใน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ด้วย Second line - Line Probe Assay (SL-LPA) เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่เร็วขึ้น ส่วนการรักษาเพื่อให้ได้ผลการรักษาสำเร็จมากขึ้น จึงมีการกล่าวถึง Shorter MDR-TB regimen โดยระยะเวลาในการรักษาจะสั้นลงเป็น 9 ถึง 12 เดือน ซึ่งแต่เดิมการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาโดยใช้ผลการเพาะเชื้อ และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาใช้เวลานาน 6 ถึง 8 สัปดาห์ และการรักษา MDR-TB ใช้ระยะเวลาในการรักษานานถึง 20 เดือน [5] ใน 5 ปี ที่ผ่านมาประเทศไทยมีนโยบายเร่งรัดการคัดกรองวัณโรคโดยการถ่ายภาพรังสีทรวงอก (Chest X-ray) วินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยา (Molecular testing) ทดสอบความไวของเชื้อต่อยารักษาวัณโรค (drug susceptibility

testing, DST) ในผู้ป่วยวัณโรคการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยามีเครื่องมือที่ทันสมัยทำให้สามารถวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว การตรวจทางอณูชีววิทยาถูกพัฒนาให้สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาและรายงานผลได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งมีการนำหลักการ Line Probe Assay (LPA) และวิธี Xpert MTB/RIF เข้ามาใช้และให้การรับรอง [6-7] หลักการ LPA จะหมายถึง ชุดตรวจ Genotype MTBDRplus (Hain LifeScience, Nehren, Germany) ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายส่วนวิธี Xpert MTB/RIF เป็นการใช้หลักการ Real-time PCR เพื่อการตรวจวิเคราะห์ ซึ่งชุดตรวจทั้งสองชนิดดังกล่าวมีการศึกษาว่ามีความไว 98% ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา R เมื่อเทียบกับวิธีการทดสอบความไวต่อยาที่เป็นวิธีมาตรฐาน [8-9]

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วย Molecular assay เป็นการตรวจที่ได้ผลเร็วเพื่อค้นหาเชื้อวัณโรคดื้อยา ได้แก่ Xpert MTB/RIF, Hain test (LPA) และ PCR MDR/XDR-TB [10-11] จึงมีบทบาทมากขึ้น ปัจจุบันในประเทศไทยมีห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจ Xpert MTB/RIF ultra จำนวน 157 แห่ง, Xpert MTB/XDR จำนวน 103 แห่ง และสามารถตรวจ Hain test จำนวน 13 แห่ง โดยการตรวจ Xpert MTB/RIF และ Xpert MTB/XDR เป็น Real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา R และ Xpert MTB/XDR สามารถตรวจการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา Fluoroquinolone (FQ), Capreomycin (Cm), Amikacin (Am), Kanamycin (Km), H และ Ethionamide (Eto) ในเวลาเดียวกัน โดยใช้เวลาทดสอบ 100 นาที ส่วน Hain test เป็น LPA สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา H และ R ปัจจุบันมี SL-LPA ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา H, R, fluoroquinolones (FQs), และ Second-line injectable drugs (SLIDs) หรือไม่ ถ้าผลดื้อต่อยาดังกล่าว วินิจฉัยว่าเป็น XDR-TB การตรวจ Line Probe Assay ใช้เวลาตรวจ 24 ถึง 48 ชั่วโมง [12-13] ดังนั้น นอกจากการตรวจเสมหะย้อมสีทนกรด (Acid Fast Bacilli smear ; AFB smear) การเพาะเชื้อวัณโรค (Mycobacterium culture) และทดสอบความไวของเชื้อต่อยา DST การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ช่วยทำให้การวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาเร็วขึ้น คือ การตรวจวินิจฉัยทาง Molecular assay ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยามีเครื่องมือที่ทันสมัยทำให้สามารถวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว วิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาถูกพัฒนาให้สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาและรายงานผลได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่องค์การอนามัยโลกได้รับรองวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ด้วยวิธี LPA [14-15] และ Xpert MTB/XDR มีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา Xpert MTB/XDR ของการตรวจการดื้อต่อยา H, FQ และยาในกลุ่ม SLIDs ซึ่งมีค่าความไว ร้อยละ 96.1 (95% CI 86.7 - 99.5), ร้อยละ 100 (95% CI 29.2 - 100) และ N/A ตามลำดับ ความจำเพาะร้อยละ 74.0 (95% CI 58.8 - 85.7), ร้อยละ 99.0 (95% CI 94.3 - 99.9), ร้อยละ 100 (95% CI 96.2 - 100) ตามลำดับ ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 80.6 (95% CI 68.6 - 89.5), ร้อยละ 75 (95% CI 29.2 - 100) และ N/A ตามลำดับ และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 94.4 (95% CI 81.3 - 99.3), ร้อยละ 100 (95% CI 96.2 - 100) และ ร้อยละ 98.0 (95% CI 92.8 - 99.7) ตามลำดับ [21] ในขณะที่การศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบน้ำยา Xpert MTB/XDR กับเชื้อวัณโรคและการดื้อยาหลายขนานในพื้นที่เขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ยังไม่เคยทำการศึกษา

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรคได้รับการสนับสนุนชุดน้ำยาตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR มาใช้การตรวจหา

เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานในปี พ.ศ 2566 เพื่อทดสอบการดื้อยา FQ, Cm, Am, Km, H และ Eto การศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานระหว่างวิธี LPA ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDR*plus*Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 และวิธีการทดสอบ Xpert MTB/XDR ตัวอย่างจากโรงพยาบาลในพื้นที่เขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ตรวจวัณโรคและการดื้อยาวัณโรคแนวที่ 1 ด้วยวิธี LPA พบมีการดื้อยา H, ดื้อยา R, หรือดื้อยาทั้ง R และ H ด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ultra ที่พบการดื้อยา R เพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาที่ตรวจพบว่ามีการดื้อยา R, ดื้อยา H หรือดื้อยาทั้ง R และ H แล้วนำมาตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี LPA ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl VER 2.0 และวิธี Xpert MTB/XDR ต่อ ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 เพื่อวิเคราะห์ค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และเปรียบเทียบระยะเวลาการรายงานผล (Turn Around Time; TAT) หากผลการทดสอบพบการดื้อยา R หรือดื้อยาทั้ง R และ H ตามแนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ.2564 แนะนำให้ดำเนินการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยา [1,17] ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR เปรียบเทียบกับ วิธี Line Probe Assay เพื่อช่วยให้ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์นำไปใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาที่มีคุณภาพ ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ลดระยะเวลาการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาในห้องปฏิบัติการ ลดระยะเวลาการรอคอยผล รายงานได้อย่างรวดเร็ว รองรับการป้องกัน ควบคุมวัณโรคดื้อยาในพื้นที่ ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาได้รับการรักษาด้วยสูตรยาที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้เกิดคุณภาพในการดูแลรักษา รวมทั้งเฝ้าระวัง ป้องกันควบคุมวัณโรคดื้อยาที่มีประสิทธิภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานระหว่างวิธี LPA และวิธี Xpert MTB/XDR

2) เพื่อวิเคราะห์ค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจาเพาะ (Specificity) ค่าความถูกต้อง (Accuracy) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value, PPV) และค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value, NPV) ของวิธี XpertMTB/XDR เทียบกับวิธี LPA

3) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหาการดื้อยาต่อ H, FQ และยาในกลุ่ม SLIDs (Cm, Am, Km) ระหว่างสองวิธี

4) เพื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการรายงานผล (Turn Around Time, TAT) ระหว่างวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA

1.3 คำถามการวิจัย/กรอบแนวคิดการวิจัย

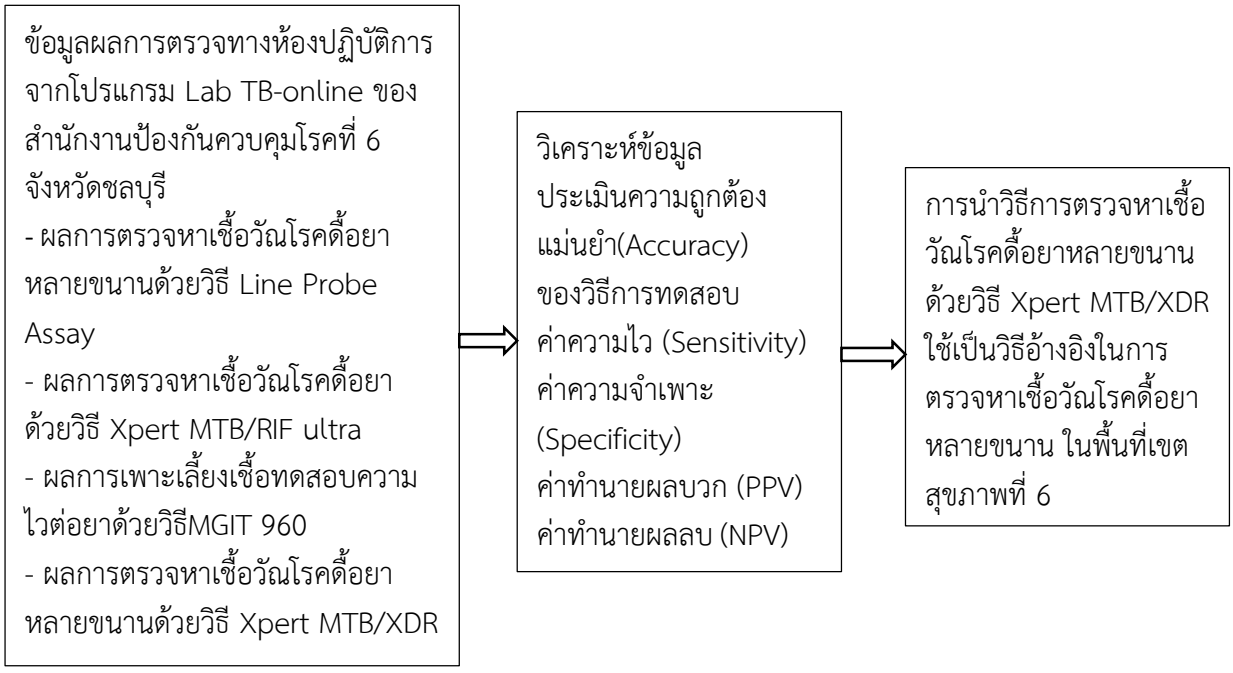
คำถามการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งตอบคำถามหลักว่า วิธี Xpert MTB/XDR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานเทียบเท่ากับวิธี LPA หรือไม่ และสามารถใช้เป็นทางเลือกในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลาย

ขนาน วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง และวัณโรคหลายขนานชนิดรุนแรงมากจะให้ค่าความถูกต้องแม่นยำที่ระดับใด

กรอบแนวคิดการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ เพื่อหาค่าความถูกต้อง ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR เปรียบเทียบกับวิธี LPA ข้อมูลผลตรวจของห้องปฏิบัติการจากโปรแกรม Lab TB-online ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 ซึ่งกำหนดกรอบแนวคิดเพื่อเป็นแนวทางการศึกษาวิจัย ดังนี้



รูปที่ 1-1 แสดงกรอบแนวคิดการวิจัย

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ตัวอย่างเสมหะที่ส่งมาตรวจยังห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรคของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 การศึกษานี้ครอบคลุมตัวอย่างจำนวน 454 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีผลการตรวจพบการดื้อยาวัณโรคด้วยวิธี LPA Assay หรือวิธี Xpert MTB/RIF ultra หรือการเพาะเชื้อวัณโรคที่มีการดื้อยา

1.4.2 ข้อมูลที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี LPA ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ultra ผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และผลการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี MGIT 960 ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566

1.5 นิยามศัพท์

LPA หมายถึง การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค และสามารถตรวจเชื้อที่ดื้อต่อยา H และ R โดยดูปฏิกิริยาการเกิดสีขึ้นบนแถบไนโตรเซลลูโลสที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ใช้เวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมง ปัจจุบันวิธีนี้ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัย MDR-TB โดยใช้ตรวจกับเสมหะใน smear ที่เป็นบวกหรือเชื้อที่เพาะเชื้อขึ้น (Culture isolated)

Xpert MTB/XDR หมายถึง ชุดทดสอบชนิด Cartridge-based ที่สามารถใช้กับเครื่อง GeneXpert Instrument System แบบ 10 สี โดยชุดทดสอบนี้สามารถตรวจการดื้อยา H, FQ ยาในกลุ่ม Second line injectables (Cm, Am, Km) และ Eto

การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค (TB Culture) หมายถึง การทดสอบเพื่อยืนยันเชื้อวัณโรคและดูว่าเชื้อมีชีวิตอยู่หรือไม่ ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยวัณโรค และสามารถนำไปใช้ทดสอบความไวต่อยาได้ สามารถตรวจพบได้แม้ว่าเชื้อจะมีจำนวนน้อยเพียง 10-100 ตัว/มิลลิลิตร

การทดสอบความไวต่อยา (DST) หมายถึง การทดสอบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตหรือเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ แล้วแปลผลว่าเชื้อที่นำมาทดสอบนั้นดื้อต่อยาหรือไวต่อยา

ค่าความไว (Sensitivity) หมายถึง คุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยที่บอกถึงสัดส่วนของผลบวกของการตรวจในผู้ป่วยที่เป็นโรควัณโรค หรืออีกนัยหนึ่งคือ ถ้าผู้ป่วยเป็นวัณโรคจริงโอกาสที่ผลการตรวจเชื้อวัณโรคให้ผลบวกกี่เปอร์เซ็นต์

ค่าความจำเพาะ (Specificity) หมายถึง คุณลักษณะของการตรวจวินิจฉัยที่บอกถึงสัดส่วนของผลลบการตรวจในคนปกติหรือผู้ป่วยที่เป็นโรคอย่างอื่น หรืออีกนัยหนึ่งคือ ถ้าคนไม่มีโรคหรือคนปกติมีโอกาสที่ผลตรวจเชื้อวัณโรคจะให้ผลลบกี่เปอร์เซ็นต์

ความถูกต้องหรือความแม่นยำ (Accuracy) หมายถึง ความแม่นยำของการตรวจที่จะบอกจำนวนที่เป็นเชื้อวัณโรคแน่เมื่อได้ผลบวกและไม่เป็นเชื้อวัณโรคแน่ ๆ เมื่อได้ผลลบนั้นเป็นสัดส่วนเท่าใดของสิ่งส่งตรวจที่นำมาตรวจ

ค่าทำนายผลบวก (PPV) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่ผู้ป่วยวัณโรคจะเป็นโรคนั้นจริงเมื่อตรวจเชื้อวัณโรคให้ผลบวก การตรวจที่มีความจำเพาะสูงมักจะมีค่า PPV สูง

ค่าทำนายผลลบ (NPV) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่ผู้ป่วยไม่ได้เป็นโรควัณโรคเมื่อการตรวจให้ผลลบการตรวจที่มีความไวสูงมักมีค่า NPV สูง

วัณโรคดื้อยา H (Isoniazid-resistant; Hr-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยา H และมีความไวต่อยา R

วัณโรคดื้อยา RR-TB หมายถึง วัณโรคดื้อยา R
ซึ่งตรวจพบโดยวิธี Genotypic ที่ทดสอบการดื้อยา R ขนานเดียว แต่ไม่ทราบผลการดื้อยาอื่น ๆ

วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยา H และ R พร้อมกันและอาจจะดื้อต่อยา First line drugs ขนานอื่น ๆ ร่วมด้วยหรือไม่ก็ได้

วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (Pre-extensively drug-resistant TB; Pre-XDR-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายขนาน ที่ดื้อยา H และ R และยาในกลุ่ม FQs (Levofloxacin, Lfx), Moxifloxacin , Mfx) (WHO 2021)

วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก XDR-TB หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายขนาน ที่ดื้อยา H และ R และยาในกลุ่ม FQs (Lfx, Mfx) และดื้อต่อยาในกลุ่ม A (Bendaquiline, Bdq), Linezolid, Lzd) อย่างน้อย 1 ขนาน (WHO 2021)

หมายเหตุ (สำหรับ พรบ. โรคติดต่อ พ.ศ. 2558 ให้ใช้คำนิยามเดิม) วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิด

รุนแรงมาก (XDR-TB) หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ดื้อยา H และ R และยาในกลุ่ม FQs (Lfx, Mfx) และ SLIDs (Cm, Am, Km) (ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องชื่อและอาการสำคัญของโรคติดต่ออันตราย พ.ศ. 2561) [1]

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยา ได้ข้อมูลเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างวิธี LPA และวิธี Xpert MTB/XDR ห้องปฏิบัติการใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณา เพื่อนำวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา ช่วยให้สามารถเลือกวิธีการตรวจที่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานในพื้นที่เขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2) ยกระดับการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา ช่วยให้แพทย์สามารถเลือกสูตรยาที่เหมาะสมได้รวดเร็วขึ้น ลดระยะเวลาในการรอผลการตรวจ ส่งผลให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น

3) เพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยา ช่วยในการวางแผนและกำหนดมาตรการป้องกันการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

4) เป็นข้อมูลในการวางแผนการเลือกเครื่องมือและการวางเครือข่ายการใช้เครื่องมือการตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาในกลุ่มเสี่ยงสูงได้เข้าถึงบริการการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิด MDR-TB, Pre-XDR-TB) และ XDR-TB ได้อย่างทั่วถึง รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เพื่อลดโอกาสการแพร่เชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาไปสู่ผู้อื่น เหมาะกับพื้นที่เขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ที่มี GeneXpert Instrument System แบบ 10 สี จำนวน 9 เครื่องและ GeneXpert Instrument System แบบ 6 สี จำนวน 6 เครื่อง รวมถึงการวางแผนทดแทนกรณีที่ GeneXpert Instrument System แบบ 6 สีชำรุดด้วย GeneXpert Instrument System แบบ 10 สี เนื่องจากสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยตลับชนิด Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/XDR ซึ่งครอบคลุมการตรวจการดื้อยาในการรักษาวัณโรคคือ R, H, Eto, FQ, Am, Km และ Cm ขณะที่ GeneXpert Instrument System แบบ 6 สี มีข้อจำกัดคือใช้ได้เฉพาะตลับชนิดที่ใช้ตรวจวินิจฉัยวัณโรคและการดื้อยา R เท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลดอันตรายทางชีวภาพและลดการเตรียมตัวอย่างให้เหลือเพียงขั้นตอนไม่กี่ขั้นตอนซึ่งเหมาะสมที่จะใช้ในจุดดูแลผู้ป่วย เมื่อใช้เป็นการทดสอบแบบตอบสนองร่วมกับ Xpert MTB/RIF หรือ Xpert MTB/RIF Ultra การทดสอบ Xpert MTB/XDR จะสามารถขยายการตรวจจับวัณโรคและการดื้อยาให้ครอบคลุมประชากรที่ไม่ได้รับบริการทางการแพทย์เพียงพอ

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) วัณโรคสามารถเกิดได้ในทุกอวัยวะ แต่พบมากที่สุดที่ปอด (ร้อยละ 80) เนื่องจากสามารถแพร่เชื้อได้ง่าย นอกจากนี้ยังอาจพบในอวัยวะอื่นๆ เช่น เยื่อหุ้มปอด ต่อมน้ำเหลือง กระดูกสันหลัง ข้อต่อ ช่องท้อง ระบบทางเดินปัสสาวะ และระบบประสาท [(1)] เชื้อ Mycobacterium แบ่งเป็น 3 กลุ่มหลัก

1) MTBC ก่อโรคในคนและสัตว์ มี 8 สายพันธุ์ โดย *M. tuberculosis* พบบ่อยที่สุด

2) Nontuberculous mycobacteria (NTM) มีมากกว่า 140 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรคในคนปกติ สามารถก่อโรคได้ในผู้ที่มีภูมิต้านทานต่ำ

3) Mycobacterium leprae เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน

เชื้อวัณโรคมีลักษณะเป็นแท่ง ขนาดเล็ก ไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ เมื่อผู้ป่วยไอหรือจาม เชื้อสามารถลอยในอากาศได้นานถึง 30 นาที เชื้อนี้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี แต่ถูกทำลายได้ด้วยสารเคมีบางชนิด ความร้อน แสงแดด และรังสีอัลตราไวโอเลต โดยแสงแดดใช้เวลา 20-30 ชั่วโมงในการทำลายเชื้อในเสมหะ ขณะที่รังสีอัลตราไวโอเลตใช้เวลาเพียง 1-2 นาที ความร้อนที่ 60°C นาน 20 นาทีก็สามารถทำลายเชื้อได้ อย่างไรก็ตาม เชื้อในเสมหะแห้งที่ไม่โดนแสงแดดอาจมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 6 เดือน [(1)]

2.2 การแพร่กระจายเชื้อวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศ (airborne transmission) โดยเมื่อผู้ป่วยวัณโรคปอด หลอดลม หรือกล่องเสียง ไอ จาม พูดดังๆ ตะโกน หัวเราะหรือร้องเพลง จะทำให้เกิดละอองฝอย (droplet nuclei) ฟุ้งกระจาย ละอองฝอยขนาดเล็ก 1-5 ไมโครเมตรจะลอยในอากาศ และเมื่อผู้อื่นสูดหายใจเข้าไป อนุภาคขนาดเล็กนี้จะเข้าสู่ถุงลมในปอดปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายเชื้อวัณโรค แบ่งเป็น 3 ด้าน

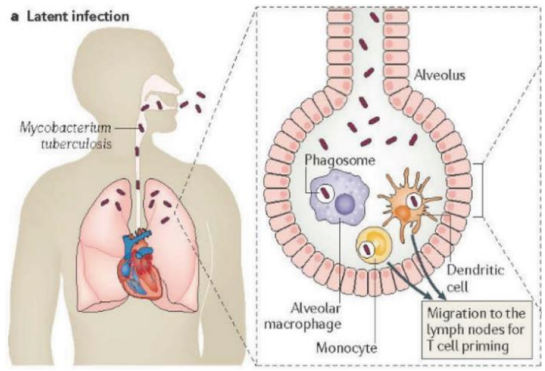
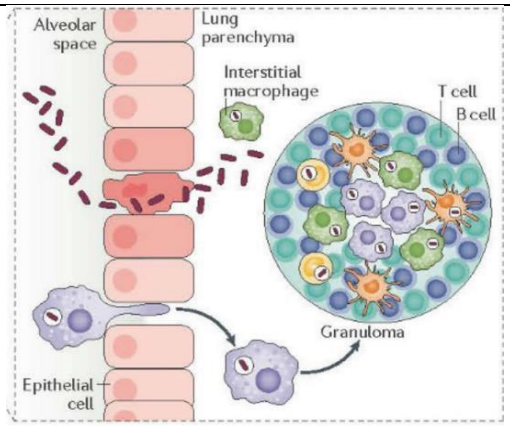
1) ปัจจัยด้านผู้ป่วยวัณโรค เช่น การป่วยเป็นวัณโรคปอดในระยะที่มีเชื้อในเสมหะ ผู้ป่วยที่มีแผลโพรงในปอด

2) ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น สถานที่อับทึบ แสงแดดส่องไม่ถึง การถ่ายเทอากาศไม่ดี

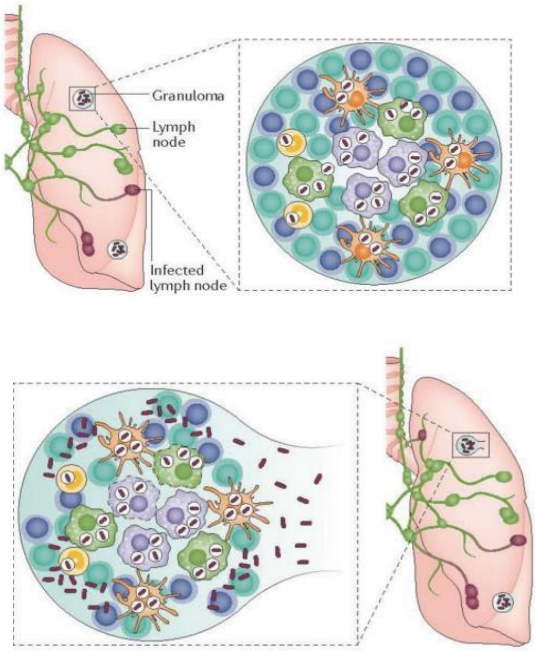
3) ปัจจัยด้านระบบบริการ เช่น การวินิจฉัยและรักษาล่าช้า การรักษาไม่ถูกต้อง การรักษาไม่ครบ

การติดเชื้อและการป่วยเป็นวัณโรค (TB infection and TB disease) เกิดขึ้นเมื่อเชื้อวัณโรคเข้าสู่ถุงลมในปอด โดย macrophage ในถุงลมปอดเป็นด่านแรกในการกำจัดเชื้อ หากไม่สามารถกำจัดเชื้อได้หมด เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลือง เกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้ง T cells และ B cells จะมารวมตัวล้อมรอบเชื้อวัณโรค เรียกว่า granuloma ซึ่งเป็นกระบวนการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (latent TB infection) [(1)] ตามรายละเอียดดังตารางที่ 2-1 ถึง 2-3

ตารางที่ 2-1 แสดงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Latent TB infection , LTBI)

รูปภาพ	คำอธิบาย
	เมื่อสูดหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าไปถึงถุงลมในปอด macrophage ในถุงลมปอดเป็นระบบภูมิคุ้มกันแรก ที่สามารถกำจัดเชื้อได้ ทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อวัณโรค
	ถ้าภูมิคุ้มกันด่านแรกไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ทั้งหมด เชื้อวัณโรคจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น และสามารถผ่านผนังถุงลม (ซึ่งเชื้ออาจจะเข้าไป โดยตรง หรือโดย macrophages ที่มีเชื้อวัณโรค) เข้าไปยังเนื้อเยื่อของปอด ในขณะเดียวกัน dendritic cells และ monocytes จะนำเชื้อวัณโรคไปยังต่อม น้ำเหลืองในปอด เพื่อสร้าง T cell เกิดกระบวนการ กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้ง T cells และ B cells มารวมตัว ที่เนื้อเยื่อปอด และล้อมรอบกลุ่ม macrophages และ cells อื่นๆ ที่มีเชื้อวัณโรคอยู่ เรียกว่า granuloma เป็นกระบวนการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (latent TB infection)

ตารางที่ 2-2 แสดงพยาธิกำเนิดของการป่วยวัณโรคลุกลาม (Active TB disease)

รูปภาพ	คำอธิบาย
	ถ้าเชื้อวัณโรคใน granuloma มีการแบ่งตัว เพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ มีปริมาณมากเกินไปที่ granuloma จะควบคุมได้ เชื้อจะสามารถเข้าสู่ กระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ หรือกลับเข้ามายังระบบทางเดินหายใจ ทำให้เกิด พยาธิสภาพในปอดหรือ/และอวัยวะต่างๆ ได้ เป็นกระบวนการป่วยวัณโรคระยะลุกลาม (active TB disease)

ตารางที่ 2-3 ข้อแตกต่างระหว่างการติดเชื้อวัณโรคแฝงและการป่วยเป็นวัณโรค

ติดเชื้อวัณโรคแฝง (Latent TB infection)	ป่วยเป็นวัณโรค (TB disease : Active TB)
มีเชื้อวัณโรคในร่างกายจำนวนน้อย เชื้อยังมีชีวิต แต่ไม่ลุกลาม (alive, but not active)	มีเชื้อวัณโรคในร่างกายจำนวนมาก เชื้อยังมีชีวิตและลุกลาม (active)
ไม่แพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น	อาจแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น
ไม่มีอาการ	อาจมีอาการใดอาการหนึ่ง ดังต่อไปนี้ ไอ ไข้ เจ็บหน้าอก ไอมีเลือดหรือเสมหะปน น้ำหนักลด เหงื่อออกผิดปกติตอนกลางคืน อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย เบื่ออาหาร (ระยะเริ่มแรกอาจไม่มีอาการ)
ทดสอบ TST หรือ IGRA ให้ผล positive	ทดสอบ TST หรือ IGRA ให้ผล positive

ติดเชื้อวัณโรคแฝง (Latent TB infection)	ป่วยเป็นวัณโรค (TB disease : Active TB)
ภาพถ่ายรังสีทรวงอก ปกติ	ภาพถ่ายรังสีทรวงอก มักพบความผิดปกติเข้าได้กับ วัณโรค (แต่อาจจะปกติในกรณีที่เป็นผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำรุนแรงหรือเป็นวัณโรคนอกปอด)
การตรวจเสมหะ AFB smear หรือ culture ให้ผล negative	การตรวจเสมหะ AFB smear หรือ culture มักจะ ให้ผล positive (แต่อาจมีผล negative ได้ถ้าเป็น วัณโรคนอกปอด หรือวัณโรคที่มีแผลเล็กๆ หรือป่วยเป็นวัณโรคระยะเริ่มแรก)
พิจารณาให้การรักษา latent TB infection เพื่อป้องกันการเป็น active TB disease	ให้การรักษา active TB disease
ไม่จำต้องแยกจากบุคคลอื่น	อาจต้องแยกจากบุคคลอื่น

2.3 ยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (First-line anti-TB drug; FLD)

วัณโรคเป็นเชื้อที่ทนทานมาก จึงจำเป็นต้องใช้ยาหลายตัวร่วมกันเพื่อควบคุมเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ใช้สำหรับผู้ป่วยใหม่ที่เชื้อไวต่อยาซึ่งยังไม่เคยรักษา หรือเคยรักษามาไม่เกิน 1 เดือน โดยใช้สูตรยา 2HRZE / 4HR ประกอบด้วยยา 4 ชนิด ตามรายละเอียดดังรูปที่ 2-1 ได้แก่

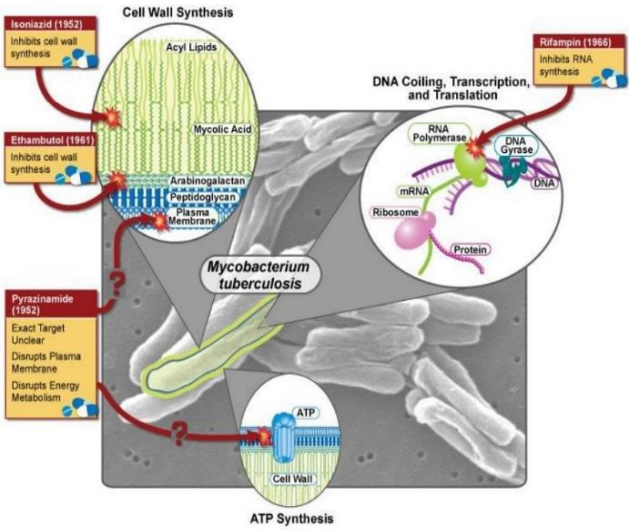
1.ไอโซไนอะซิด (H) ยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์เชื้อวัณโรค โดยอาศัยเอนไซม์ของเชื้อเองในการเปลี่ยนเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ ซึ่งจะไปยับยั้งโปรตีนสำคัญในการสร้าง mycolic acid

2. ไรแฟมพิซิน (R) จับกับเอนไซม์ RNA polymerase ของเชื้อ ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถสร้าง DNA ได้

3.ไพราซินาไมด์ (Pyrazinamide, Z) ยับยั้งเอนไซม์ที่เชื้อใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน และยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนของเชื้อ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้

4. อีแธมบูทอล (Ethambutol, E) ยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์เชื้อวัณโรค ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์

ยาทั้ง 4 ชนิดนี้ทำงานร่วมกันเพื่อทำลายเชื้อวัณโรคอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมุ่งเน้นที่การยับยั้งการสร้างและการทำงานของส่วนประกอบสำคัญในเซลล์ของเชื้อ



รูปที่ 2-1 แสดงการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรค

2.4 วัณโรคดื้อยา

วัณโรคดื้อยา (Drug-resistant tuberculosis: DR-TB) เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของโลก เชื้อวัณโรคดื้อยาสามารถแพร่กระจายได้เช่นเดียวกับเชื้อวัณโรคทั่วไป ผ่านการไอ จาม พูด หรือร้องเพลง ทำให้ผู้คนในบริเวณใกล้เคียงอาจหายใจเอาเชื้อเข้าไปและติดเชื้อได้

สาเหตุของการดื้อยาเกิดจากการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม (genetic mutation) ในเชื้อแบคทีเรีย MTB ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อวัณโรคนั้นได้ การรักษาวัณโรคด้วยยา H และ R ที่ขาดการกำกับดูแลที่ดี ทำให้พบผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ พ.ศ. 2513 ต่อมาในปี พ.ศ. 2533 พบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานมีการดื้อยากลุ่ม FQs ร่วมด้วย ซึ่งเพิ่มความซับซ้อนในการรักษาและควบคุมโรค

ในปี พ.ศ. 2536 องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้วัณโรคเป็นภาวะฉุกเฉิน และกำหนดให้นานาประเทศใช้ยุทธศาสตร์ directly observed therapy system (DOTS) เพื่อจัดการกับปัญหาวัณโรคที่ทวีความรุนแรงขึ้น ประเทศไทยได้นำยุทธศาสตร์ DOTS มาใช้เป็นหลักในการแก้ปัญหาวัณโรคตั้งแต่ พ.ศ. 2539

รูปที่ 2-2 เชื้อ MTB ที่ดื้อยาในรูปแบบ 3 มิติ ด้วยคอมพิวเตอร์

วัณโรคดื้อยาสามารถพบได้ทั้งในผู้ป่วยรายใหม่และผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาก่อน อาจเป็นวัณโรคปอดหรือวัณโรคนอกปอด และอาจพบเชื้อในเสมหะหรือไม่ก็ได้ มีคำจำกัดความเฉพาะดังนี้

Primary drug resistance หมายถึง ภาวะการดื้อยาวัณโรคที่พบในผู้ป่วยใหม่ที่ไม่เคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน

Acquired drug resistance หมายถึง ภาวะการดื้อยาวัณโรคที่พบในผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษาวัณโรคมาก่อนหรืออยู่ระหว่างได้รับการรักษาวัณโรค

ในอดีตสัดส่วนของ Acquired drug resistance มีมากกว่า Primary drug resistance อย่างชัดเจน แต่ในระยะหลังพบว่าสัดส่วนนี้ไม่ได้แตกต่างกันมากนัก แสดงให้เห็นว่า Primary drug resistance กำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งบ่งชี้ถึงการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาในสังคมอย่างต่อเนื่อง องค์การอนามัยโลกได้เสนอแนะให้ประเทศต่างๆ กำหนดนโยบาย Universal DST ซึ่งหมายถึงการเข้าถึงการตรวจทดสอบความไวของยาต่อเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยทุกรายอย่างรวดเร็ว (Rapid DST) โดยอย่างน้อยต้องทดสอบความไวต่อยา R และหากพบการดื้อยา R ต้องทดสอบต่อยากลุ่ม FQs และ SLIDs ด้วยประเทศไทยได้นำนโยบายนี้มาใช้ แม้ในทางปฏิบัติอาจยังไม่ครอบคลุมเพียงพอ แต่ยังคงดำเนินการตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก ห้องปฏิบัติการที่มีระบบควบคุมคุณภาพและบริหารจัดการที่ดีจะช่วยให้ได้ผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาได้รวดเร็วและถูกต้อง การใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสม ความเพียงพอและความชำนาญของบุคลากร รวมถึงนโยบายของประเทศในการคัดกรองและขั้นตอนวิธีการต่างๆ ในการส่งตรวจ ถือเป็นกลไกสำคัญในการยุติปัญหาการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยา

แผนงานวัณโรคแห่งชาติได้กำหนดกลุ่มผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงเป็นวัณโรคดื้อยา ได้แก่

1. ผู้ป่วยที่เคยรักษามาก่อนทุกราย เช่น ผู้ป่วยล้มเหลวที่ต้องเปลี่ยนการรักษา ผู้ป่วยกลับมารักษาซ้ำหลังขาดยา และผู้ป่วยกลับเป็นซ้ำ
2. ผู้ป่วยที่กำลังรักษาและผลเสมหะยังพบเชื้อเมื่อสิ้นสุดเดือนที่ 2, 3 หรือ 5 หรือหลังจากนั้น
3. ผู้มีประวัติสัมผัสผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา
4. ผู้ป่วยวัณโรคในพื้นที่ที่มีความชุกของวัณโรคดื้อยาสูง เช่น เรือนจำ กลุ่มแรงงานต่างด้าว และบุคลากรสาธารณสุขที่ปฏิบัติงานในโรงพยาบาล

ผู้ป่วยในกลุ่มเสี่ยงเหล่านี้ควรได้รับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาทางห้องปฏิบัติการ เช่น การทดสอบด้วย Xpert MTB/RIF, Real-time PCR, หรือ LPA หรือการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค เพื่อยืนยันการมีหรือไม่มีภาวะดื้อยาก่อนเริ่มการรักษา ผู้ป่วยควรเข้าสู่กระบวนการรักษาโดยเร็วที่สุด เพื่อลดโอกาสการแพร่เชื้อวัณโรคดื้อยาไปสู่ผู้อื่น เพิ่มโอกาสในการรักษาหาย และลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยลง

2.5 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Xpert MTB/XDR

Xpert MTB/XDR เป็นชุดทดสอบชนิด Cartridge-based ที่สามารถใช้กับเครื่อง GeneXpert Instrument System แบบ 10 สีเท่านั้น ตัวอย่างที่ใช้ตรวจได้แก่ เสมหะ ตะกอนที่ผ่านขบวนการกำจัดเชื้อปนเปื้อน หรือเชื้อที่เพาะขึ้นในอาหารเหลว อย่างไรก็ตาม ชุดทดสอบนี้ยังไม่มีการประเมินในตัวอย่างเลือด น้ำไขสันหลัง น้ำดูดซึมจากกระเพาะอาหาร อุจจาระ เนื้อเยื่อ และปัสสาวะ ชุดทดสอบนี้สามารถตรวจการดื้อยาได้ดังต่อไปนี้

1. H ตรวจการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับยีน *katG* และ *fabG1* บริเวณ intergenic *oxyR-aphpC* และโปรโมเตอร์ *inhA*

2. Eto ตรวจการกลายพันธุ์ของโปรโมเตอร์ *inhA* เท่านั้น

3. FQs ตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *gyrA* และ *gyrB*

4. SLIDs ตรวจการกลายพันธุ์ในยีน *rrs* และส่วนโปรโมเตอร์ *eis* สำหรับยา Am, Km และ Cm ข้อควรระวัง ไม่แนะนำให้ใช้ชุดทดสอบในรายที่ปริมาณ DNA น้อย กรณีตรวจด้วย Xpert MTB/RIF ultra แล้วได้ผล MTB detected level trace

2.6 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี Line Probe Assay

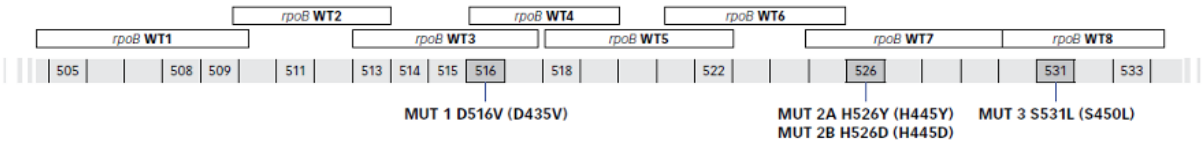
LPA เป็นวิธีการตรวจหาการดื้อยารักษาวัณโรคโดยการอ่านแผ่นแถบการตรวจ (Strip) ที่แสดงรูปแบบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคผ่านการวิเคราะห์แถบสีที่ปรากฏ วิธีนี้อาศัยหลักการ Polymerase chain reaction และ reverse hybridization เพื่อตรวจจับชิ้นส่วนของเชื้อวัณโรคและการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยา โดยต้องมีจำนวนเชื้ออย่างน้อย 160 CFU/ml จำเป็นต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมอุปกรณ์สำหรับงานอณูชีวโมเลกุล และบุคลากรที่มีความชำนาญผ่านการอบรม LPA สามารถใช้ทดสอบการดื้อยารักษาวัณโรคทั้งแนวที่ 1 และ 2

1. ยารักษาวัณโรคแนวที่ 1
   - H ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ *inhA* ความไว 94.5%, ความจำเพาะ 99.3%
   - R ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ความไว 95.8%, ความจำเพาะ 98.4%
2. ยารักษาวัณโรคแนวที่ 2
   - กลุ่ม FQs ความไว 86.2%, ความจำเพาะ 98.6%
   - กลุ่ม SLDIs ความไว 87.0%, ความจำเพาะ 99.5%

รายละเอียดการตรวจหาการดื้อยา

1. R ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่ตำแหน่ง codon 505 ถึง 533
2. H ตรวจหาการกลายพันธุ์ของ
   - ยีน katG เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ Catalase peroxidase (ตรวจที่ตำแหน่ง codon 315) การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับ high level resistance (ดื้อต่อยาที่ความเข้มข้น 1µg/mL)
   - ยีน *inhA* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mycolic acid (ตรวจที่ตำแหน่ง –16 ถึง –8 nucleotides upstream) การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับ low level resistance (ดื้อต่อ 0.2 µg/mL แต่ยังไวต่อ 1µg/mL)

แผ่น Strip จะเคลือบด้วย probe ที่จำเพาะทั้ง WT probes (wild-type probes) และ MUT probes (Mutations probes) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การดื้อยา ตามรายละเอียดดังรูปที่ 2-3



(ที่มา : Hain, 2012)

รูปที่ 2-3 แสดงตำแหน่งที่มักพบการดื้อยา R ของยีน *rpoB* ที่ชุดตรวจ GenoType MTBDRplus สามารถตรวจหาการดื้อยา R ได้

การทดสอบด้วยเทคนิค Line Probe Assay ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

1. เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยหลักการ polymerase chain reaction

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย PCR เป็นการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ที่สนใจในหลอดทดลองแบบซ้ำๆ กันหลายรอบ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase จำนวน DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเป็นแบบ exponential curve คำนวณได้เท่ากับ 2n (n คือจำนวนรอบของการทำ PCR) จนถึงระยะที่ปริมาณ PCR product คงที่และองค์ประกอบในการทำ PCR ลดลง เรียกว่า "plateau effect" องค์ประกอบในการทำ PCR มีดังนี้

1.1 Template หรือ DNA ตั้งต้น

1.2 Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น นิยมใช้ความยาวประมาณ 18-26 bp

1.3 Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, T, C, G ที่ใช้ในการสร้าง PCR product สายใหม่

1.4 Thermostable DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสาย DNA เส้นใหม่หรือ PCR product ในตำแหน่งยีนที่ต้องการ โดยนำ dNTP มาต่อในตำแหน่งที่ถัดจาก primers ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ให้มีความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในทิศทาง 5' -> 3' และยังทำหน้าที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ในบริเวณที่มีการเติมเบสไม่ถูกต้องในทิศทาง 3'-> 5' เอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ Taq DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องสูงอาจใช้ Pfu DNA polymerase ปกติจะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ 2.5-5 unit/100 µl ของ PCR reaction

1.5 PCR buffer และองค์ประกอบอื่นๆ ช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดย buffer จะสอดคล้องกับชนิดของ DNA polymerase ที่ใช้

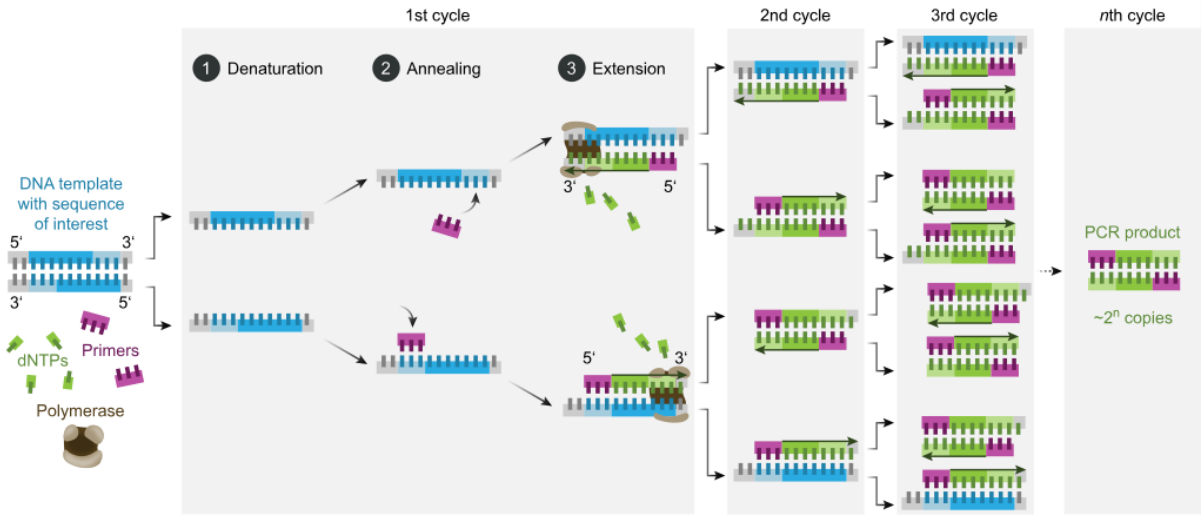
ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังแสดงในรูปที่ 2-4

1. Denaturation step ในขั้นตอนนี้ สาย DNA template คู่จะถูกแยกให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing step หลังจากนั้น อุณหภูมิจะถูกลดลงมาอยู่ในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primers ในปฏิกิริยา PCR สามารถเข้าจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่จำเพาะ เป็นการเตรียมพร้อมสำหรับการสร้าง PCR product ใหม่

3. Extension step ขั้นตอนสุดท้ายคือการสร้าง DNA สายใหม่ โดยเริ่มจากจุดต้นของ primers บน DNA template แต่ละข้าง เอนไซม์ DNA polymerase จะทำหน้าที่นำ dNTPs มาต่อกันให้คู่สมกับ DNA template อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะถูกปรับให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้

ทั้งสามขั้นตอนนี้จะถูกทำซ้ำหลายรอบ เพื่อเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายแบบทวีคูณ ตามรายละเอียดดังรูปที่ 2-4 ซึ่งให้ภาพรวมของกระบวนการ PCR ทั้งหมด



รูปที่ 2-4 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

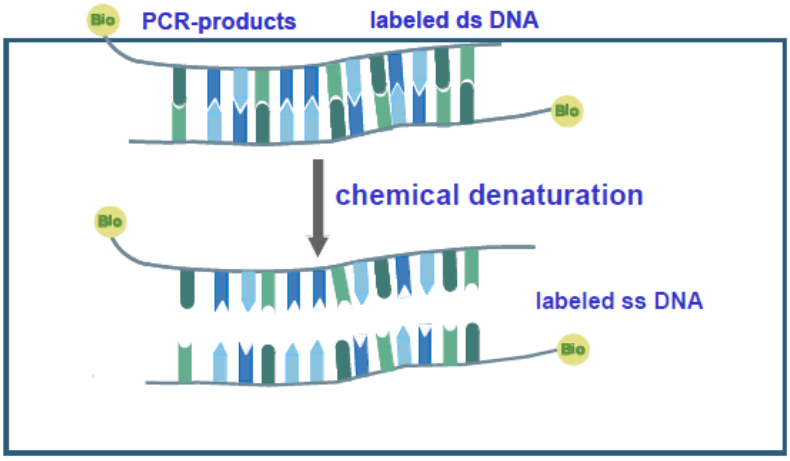
2. ย้อมสีแถบการตรวจ (Strip) ด้วยหลักการ Reverse hybridization

Reverse hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว กระบวนการนี้ใช้ PCR product (Amplicons) ที่ติดฉลากด้วย biotin มาทำปฏิกิริยากับ probe ที่ตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน จากนั้นจึงตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาโดยการเติมสารตั้งต้น (Substrate)

ขั้นตอนของปฏิกิริยา Reverse hybridization ของน้ำยา GenoType® MTBDRplus มีดังนี้

2.1 การแยกสาย DNA ขั้นตอนแรกคือการแยกสาย DNA ของ Amplicons ที่ติดฉลากด้วย biotin ให้เป็น single stranded DNA (ssDNA) โดยใช้ sodium hydroxide (DEN buffer) กระบวนการนี้ ตามรายละเอียดดังรูปที่ 2-5

รูปที่ 2-5 แสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อ sodium hydroxide (DEN buffer) ทำปฏิกิริยากับ DNA สายคู่ ทำให้เกิดการแยกสายเป็น DNA สายเดี่ยว ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียม DNA สำหรับขั้นตอนต่อไปของกระบวนการ Reverse hybridization



รูปที่ 2-5 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Sodium hydroxide (DEN buffer)

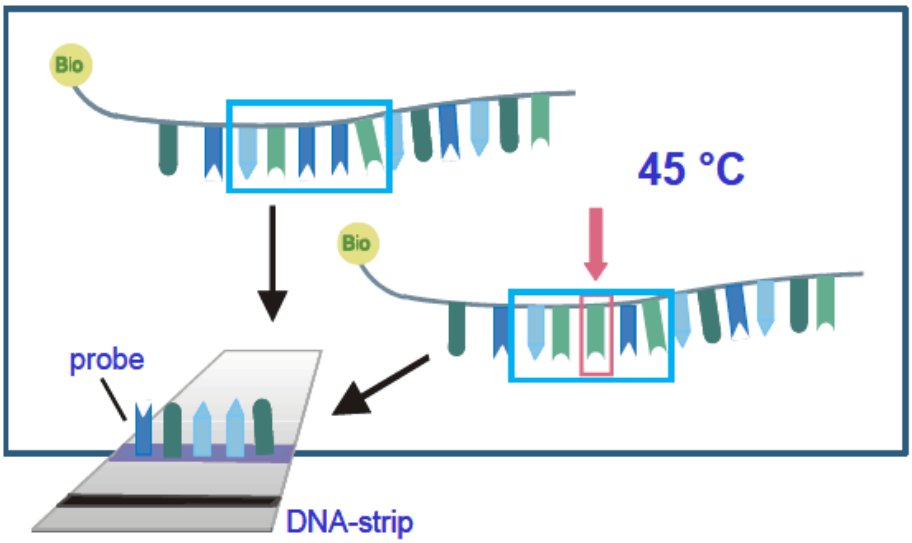
2.2 การเกิดปฏิกิริยา hybridization

เมื่อเติม green hybridization buffer (HYB) จะเกิดปฏิกิริยา hybridization ระหว่าง Amplicons ที่ติดฉลากด้วย biotin กับ probe บนแผ่นเมมเบรน กระบวนการนี้มีลักษณะดังนี้

1. การจับกันอย่างจำเพาะ: Amplicons จะจับกับ probe ที่มีลำดับเบสที่สอดคล้องกันอย่างจำเพาะเจาะจง

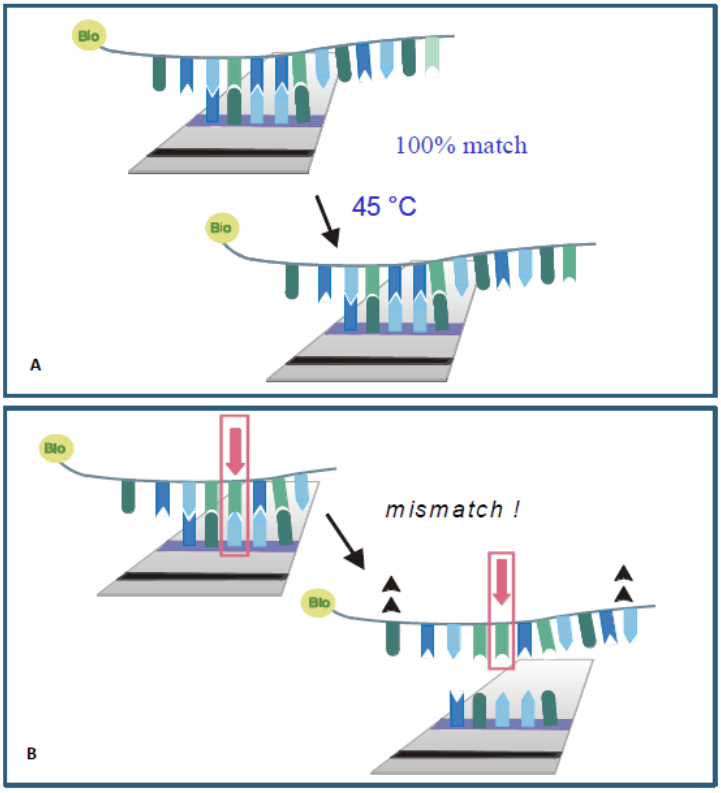
2. การจับกันที่ไม่จำเพาะ: ในบางตำแหน่ง อาจเกิดการจับกันที่ไม่จำเพาะระหว่าง Amplicons กับ probe ซึ่งแสดงด้วยลูกศรสีแดง ตามรายละเอียดดังรูปที่ 2-6

รูปที่ 2-6 แสดงให้เห็นกระบวนการ hybridization หลังจากการเติม green hybridization buffer (HYB) โดยภาพจะแสดงทั้งการจับกันอย่างจำเพาะและไม่จำเพาะระหว่าง Amplicons กับ probe บนแผ่นเมมเบรน การเข้าใจกระบวนการนี้มีความสำคัญในการแปลผลการทดสอบ เนื่องจากการจับกันที่จำเพาะจะให้ผลบวกที่ถูกต้อง ในขณะที่การจับกันที่ไม่จำเพาะอาจนำไปสู่ผลบวกปลอมได้



รูปที่ 2-6 แสดงการทำปฏิกิริยา Hybridization เติม green hybridization buffer (HYB)

รูปที่ 2-7 แสดงให้เห็นผลของการใช้ Stringent wash buffer ในการลด Non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา Hybridization โดยภาพจะแสดงความแตกต่างระหว่างการจับกันที่จำเพาะซึ่งยังคงอยู่หลังการล้าง และการจับกันที่ไม่จำเพาะซึ่งถูกกำจัดออกไป การใช้ STR เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเพิ่มความแม่นยำของการทดสอบ โดยช่วยลดผลบวกปลอมที่อาจเกิดจากการจับกันที่ไม่จำเพาะระหว่าง Amplicons และ probe



รูปที่ 2-7 แสดงการเกิด Non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา Hybridization

2.3 การใช้ Stringent wash buffer (STR) เพื่อลดการจับกันที่ไม่จำเพาะ

การเติม Stringent wash buffer (STR) เป็นขั้นตอนสำคัญในการเพิ่มความจำเพาะของการทดสอบ โดยมีผลดังนี้

1. การจับกันที่จำเพาะ รูปที่ 2-7 (A)

- Amplicons ที่จับกับ probe อย่างจำเพาะ (A=T & C≡G) จะยังคงจับกันอยู่แม้หลังการล้างด้วย STR
- การจับกันนี้จะให้ผลบวกที่ถูกต้องบน strip

2. การจับกันที่ไม่จำเพาะ รูปที่ 2-7 (B)

- ในกรณีที่มีการจับกันที่ไม่จำเพาะของ single nucleotide
- เมื่อล้างด้วย STR Amplicons ที่จับกันไม่จำเพาะจะหลุดออกจาก probe
- กระบวนการนี้ช่วยป้องกันการเกิด non-specific bands บน strip

2.4 การใช้ Conjugation buffer ในกระบวนการ

การเติม Conjugation buffer เป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดผล โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. องค์ประกอบของ Conjugation buffer ประกอบด้วย Streptavidin-alkaline phosphatase

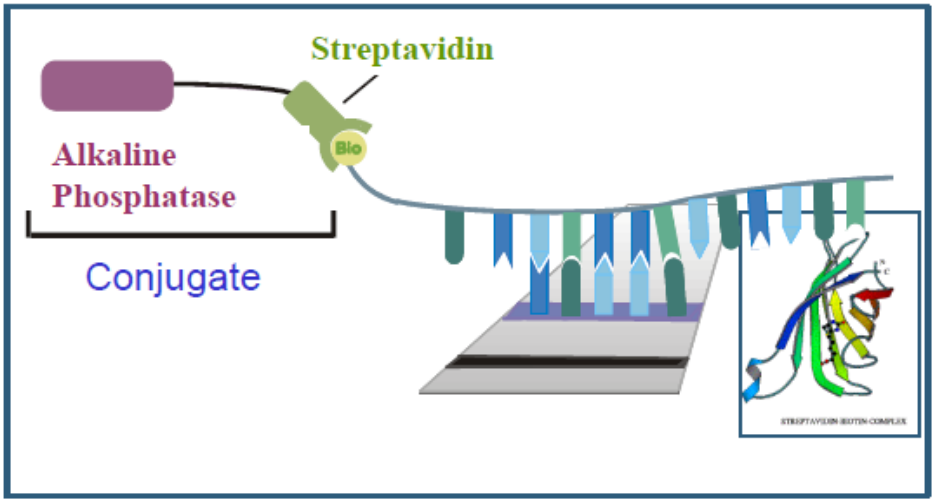
2. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เมื่อเติม Conjugation buffer ลงไป streptavidin จะจับกับ biotin ที่ติดอยู่กับ Amplicons

3. ความสำคัญของปฏิกิริยา

- การจับกันระหว่าง streptavidin และ biotin เป็นการเตรียมพร้อมสำหรับขั้นตอนการตรวจวัดผลในลำดับถัดไป

- Alkaline phosphatase ที่ติดมากับ streptavidin จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นในขั้นตอนสุดท้าย

รูปที่ 2-8 แสดงให้เห็นกระบวนการทำปฏิกิริยาของ Conjugation buffer โดยภาพจะแสดงการจับกันระหว่าง streptavidin จาก Conjugation buffer กับ biotin ที่ติดอยู่กับ Amplicons บน probe การใช้ Conjugation buffer เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดผลสุดท้าย โดยการจับกันระหว่าง streptavidin และ biotin จะช่วยให้สามารถตรวจจับ Amplicons ที่จับกับ probe ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การแสดงผลที่ชัดเจนในขั้นตอนสุดท้ายของการทดสอบ



รูปที่ 2-8 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Conjugation buffer

2.5 การเติม Substrate และการเกิดสี ขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการคือการเติม Substrate ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. Substrate ที่ใช้ Hydrogen peroxide เป็น Substrate ที่ใช้ในขั้นตอนนี้

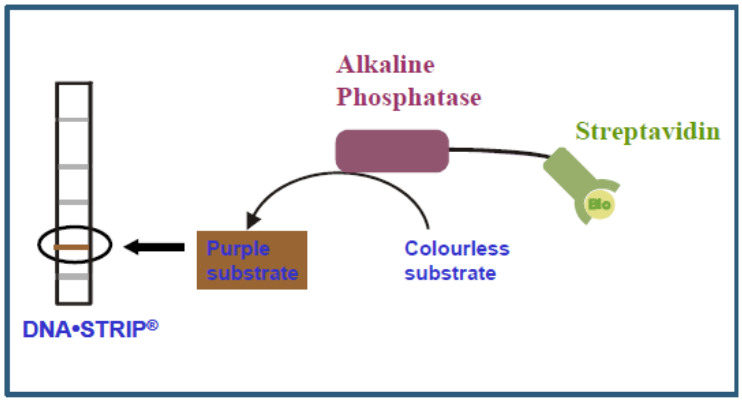
2. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น Hydrogen peroxide จะทำปฏิกิริยากับ alkaline phosphatase ที่ติดอยู่กับ streptavidin

3. ผลของปฏิกิริยา:

- ปฏิกิริยานี้ทำให้แถบบน strip เปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีม่วง

- การเปลี่ยนสีนี้ทำให้สามารถอ่านผลการทดสอบด้วยตาเปล่าได้

รูปที่ 2-9 แสดงให้เห็นกระบวนการทำปฏิกิริยาของ Substrate กับ alkaline phosphatase บน strip โดยภาพจะแสดงการเปลี่ยนแปลงจากแถบไม่มีสีเป็นแถบสีม่วงหลังจากเติม Substrate



รูปที่ 2-9 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Substrate

ความสำคัญของขั้นตอนนี้:

- เป็นขั้นตอนที่ทำให้ผลการทดสอบปรากฏเป็นที่สังเกตได้
- ช่วยให้สามารถแปลผลการทดสอบได้ โดยการดูรูปแบบของแถบสีม่วงที่เกิดขึ้นบน strip
- ทำให้การอ่านผลสามารถทำได้ด้วยตาเปล่า ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษในการอ่านผล

การเข้าใจขั้นตอนนี้มีความสำคัญในการแปลผลการทดสอบและการตรวจสอบคุณภาพของการทดสอบ เนื่องจากความเข้มของสีและความชัดเจนของแถบสีจะบ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานผลการศึกษา จำนวนมากในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก เกี่ยวกับการประเมินประสิทธิภาพของวิธี Xpert MTB/XDR เปรียบเทียบกับวิธี LPA ซึ่งให้ค่าความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (PPV) และค่าทำนายผลลบ (NPV) แตกต่างกันไปตามช่วงเวลาและสถานที่ที่ทำการศึกษาวิจัย

ผลการศึกษาของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยา H ให้ค่าความไว 70.83-96.30%, ค่าความจำเพาะ 74.00-100.00%, ค่าทำนายผลบวก 98.10-100.00%, ค่าทำนายผลลบ 73.08-98.07% รายละเอียดดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา H

งานศึกษาวิจัยของ	สถานที่/ประเทศ	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Ranganah *et al*.[24]	Karataka	70.83%	100.00%	100.00%	73.08%
Maurya et al.[25]	Lucknow	96.30%	98.40%	98.10%	96.70%
Singhal et al.[26]	New Delhi	83.30%	93.80%	98.80%	46.90%
Sharma et al.[27]	Nepal	91.40%	10.00%	100.00%	86.30%
Albert et al.[28]	Uganda	80.80%	100.00%	100.00%	98.07%
Singh et al. [29]	อินเดีย	94.00%	98.00%	99.00%	86.00%
Nguyen,H. V.et al.[30]	เวียดนาม	94.00%	98.00%	99.00%	86.00%
Maya et al. [31]	แทนซาเนีย	93.30%	92.90%	98.30%	76.50%
Katamba et al. [21]	ยูกันดา	96.10%	74.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ

ผลการศึกษาของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม FQ ให้ค่าความไว 80.00-96.60%, ค่าความจำเพาะ 98.00-100.00%, ค่าทำนายผลบวก 98.00-100.00%, ค่าทำนายผลลบ 71.40-99.00% รายละเอียดดังตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม FQ

งานศึกษาวิจัยของ	สถานที่/ประเทศ	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Singh et al. [29]	อินเดีย	91.00%	100.00%	98.00%	99.00%
Nguyen, H.V.et al. [30]	เวียดนาม	95.00%	98.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
Maya et al. [31]	แทนซาเนีย	96.60%	100.00%	100.00%	71.40%
Katamba et al. [21]	ยูกันดา	80.00%	100.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ

ผลการศึกษาของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม Second Line Injectables (Km) ให้ค่าความไว 83.00-98.00%, ค่าความจำเพาะ 99.60-100.00%, ค่าทำนายผลบวก 90.90-100.00%, ค่าทำนายผลลบ 99.30-99.30% รายละเอียดดังตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity Specificity PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Km

งานศึกษาวิจัยของ	สถานที่/ประเทศ	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Singh et al. [29]	อินเดีย	83.00%	99.60%	90.90%	99.30%
Nguyen, H.V.et al. [30]	เวียดนาม	86.00%	100.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
Maya et al. [31]	แทนซาเนีย	98.00%	ไม่ระบุ	100.00%	ไม่ระบุ
Katamba et al. [21]	ยูกันดา	ไม่ระบุ	100.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ

ผลการศึกษาของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม SLID (Am) ให้ค่าความไว 70.00-98.70%, ค่าความจำเพาะ 98.89-99.60%, ค่าทำนายผลบวก 87.50-100.00%, ค่าทำนายผลลบ 98.90-98.90% รายละเอียดดังตารางที่ 2-7

ตารางที่ 2-7 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Am

งานศึกษาวิจัยของ	สถานที่/ประเทศ	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Singh et al. [29]	อินเดีย	70.00%	99.60%	87.50%	98.90%
Nguyen, H.V.et al. [30]	เวียดนาม	73.00%	98.89%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
Maya et al. [31]	แทนซาเนีย	98.70%	ไม่ระบุ	100.00%	ไม่ระบุ

ผลการศึกษาของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยากลุ่ม SLID (Eto) ให้ค่าความไว 61.80-99.60%, ค่าความจำเพาะ 70.00-99.60%, ค่าทำนายผลบวก 95.50-99.30%, ค่าทำนายผลลบ 66.70-95.20% รายละเอียดดังตารางที่ 2-8

ตารางที่ 2-8 งานศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้อง แสดงค่า Sensitivity, Specificity, PPV และ NPV ของการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยา Eto

งานศึกษาวิจัยของ	**สถานที่/ประเทศ**	**Sensitivity**	**Specificity**	**PPV**	**NPV**
Singh et al. [29]	อินเดีย	61.80%	99.60%	95.50%	95.20%
Nguyen, H.V.et al. [30]	เวียดนาม	64.00%	98.00%	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ
Maya et al. [31]	แทนซาเนีย	99.60%	70.00%	99.30%	66.70%

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 รูปแบบการศึกษาวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลย้อนหลังเชิงพรรณนา (Retrospective descriptive study) โดยเก็บรวบรวมข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จากโปรแกรม Lab TB-online ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคดื้อยาทางห้องปฏิบัติการ ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 เป็นตัวอย่างที่มีข้อมูลผลตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

1. ตัวอย่างที่ตรวจวัณโรคและการดื้อยาวัณโรคแนวที่ 1 ด้วยวิธี LPA พบมีการดื้อยา H ดื้อยา R, หรือดื้อยาทั้ง R และ H

2. ตัวอย่างที่ตรวจวัณโรคและการดื้อยาด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ultra พบการดื้อยา R

3. ตัวอย่างที่เพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาที่ตรวจพบว่ามีการดื้อยา R ดื้อยา H หรือดื้อยาทั้ง R และ H

แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี Second Line Probe Assay (SL-LPA) ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl VER 2.0 และวิธี Xpert MTB/XDR จำนวน 454 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่มีผลการดื้อยาจะถูกนำทำการเพาะเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด liquid (MGIT 960) กรณีที่พบข้อมูลการทดสอบที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันของทั้งสองวิธี จะมีการทดสอบซ้ำของแต่ละวิธีจากตัวอย่างที่มีผลการเพาะเชื้อ MTB ขึ้น

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาคือ

แบบบันทึกผลการตรวจวิเคราะห์วัณโรค วัณโรคดื้อยา สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 จาก Lab TB-online ประกอบด้วย ผลการตรวจวิเคราะห์วัณโรค การดื้อยาวัณโรคด้วยวิธี first line-LPA , Xpert MTB/RIF ultra ผลทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี MGIT 960 และผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และ SL-LPA

การศึกษานี้ใช้วัสดุและอุปกรณ์ดังต่อไปนี้ในการเก็บรวบรวมข้อมูล:

1) อุปกรณ์หลัก

- Biosafety Cabinets Class II
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาโพลีเมอเรส (PCR Thermal cycler)
- เครื่องเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960
- GeneXpert (10 colours modules)

2) อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและจัดการตัวอย่าง

- หลอดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 50 มล. ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- กระจกสไลด์ริมฝ้า สำหรับทำเสมียร์เสมหะ
- Tube พลาสติกก้นแหลม มีฝาปิด ขนาด 50ml
- Eppendorf Tube ขนาด 1.5ml และ 0.2ml

3) อุปกรณ์สำหรับการปั่นแยก

- Centrifuge สำหรับ Tube ขนาด 50ml (ความเร็ว 3,000 g)
- Micro-centrifuge สำหรับ Eppendorf Tube 1.5ml (4,000-13,000rpm)
- Micro-centrifuge สำหรับ Eppendorf Tube 0.2ml
- Refrigerated Centrifuge

4) อุปกรณ์สำหรับการจัดการตัวอย่างขนาดเล็ก

- Microtube rack สำหรับ Eppendorf Tube ขนาด 1.5ml และ 0.2ml
- Auto pipette และ Tip ขนาด 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, และ 1-5ml

5) อุปกรณ์เสริมอื่นๆ

- Heat block (100°C)
- Vortex
- นาฬิกาจับเวลา
- Forceps
- ชุด PPE (Personal Protective Equipment)

6) น้ำยา

- GenoLyse® (Hain LifeScience, Nehren, Germany)
- Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain LifeScience, Nehren, Germany)
- Genotype® MTBDRsl Ver2.0 (Hain LifeScience, Nehren, Germany)
- ตลับน้ำยา Xpert MTB/XDR Assay
- อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MGIT tube 7 มล.
- Lowenstein-Jensen Media (L-J media) หรือ 2% Ogawa media
- น้ำยา 4% Sodium hydroxide (NaOH)
- 2.9% Sodium citrate
- Phosphate Buffer pH 6.8 (PBS)
- สารละลาย 2% NALCL (NaOH)

อุปกรณ์เหล่านี้ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง การทดสอบ และการวิเคราะห์ผล เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและเชื่อถือได้สำหรับการศึกษา

วิธีการทดสอบ

การทดสอบนี้ทำโดยใช้ตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยจำนวน 454 ตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยชุดทดสอบ Genotype MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life-Science, Nehren, Germany) หากพบการดื้อยา จะทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี SL-LPA โดยใช้ชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl Ver2.0 และวิธี Xpert MTB/XDR โดยใช้ชุดทดสอบ Xpert ® MTB/XDR หากผลทดสอบจากทั้งสองวิธีไม่สอดคล้องกัน จะดำเนินการเพาะเชื้อเพื่อตรวจสอบเพิ่มเติม

1. การเตรียมตัวอย่างเสมหะ (Pre-treatment)

- นำเสมหะเทลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 mL (1 หลอดต่อตัวอย่าง) หากเสมหะมีปริมาตรมากกว่า 10 mL และมีความหนืดมาก ให้แบ่งใส่ 2 หลอดเพื่อให้ย่อยเสมหะได้อย่างทั่วถึง
- เติมสารละลาย 2% NALC และ 4% NaOH ในปริมาณ 1-2 เท่าของเสมหะ จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที (vortex ทุก 5 นาทีเพื่อช่วยย่อยเสมหะ)
- หลังจาก 15 นาที เติมสารละลาย PBS (pH 6.8, 0.067 M) จนถึงระดับ 45 mL แล้วคว่ำหลอดไปมา 4-5 ครั้ง ผสมให้เข้ากัน
- นำหลอดไปปั่นด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
- เทน้ำส่วนบนทิ้งช้า ๆ ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุด
- เติม PBS pH 6.8 ปริมาตร 1.5 mL ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

2. การตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อต่อยา R และ H ใช้ชุดทดสอบ Genotype MTBDRplus Ver2.0 โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 การสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยา Genolyse®

1.นำตัวอย่างที่ผ่านการ pre-treatment ปริมาตร 500 µL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL ที่มีฝาเกลียว

2. ปั่นที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที

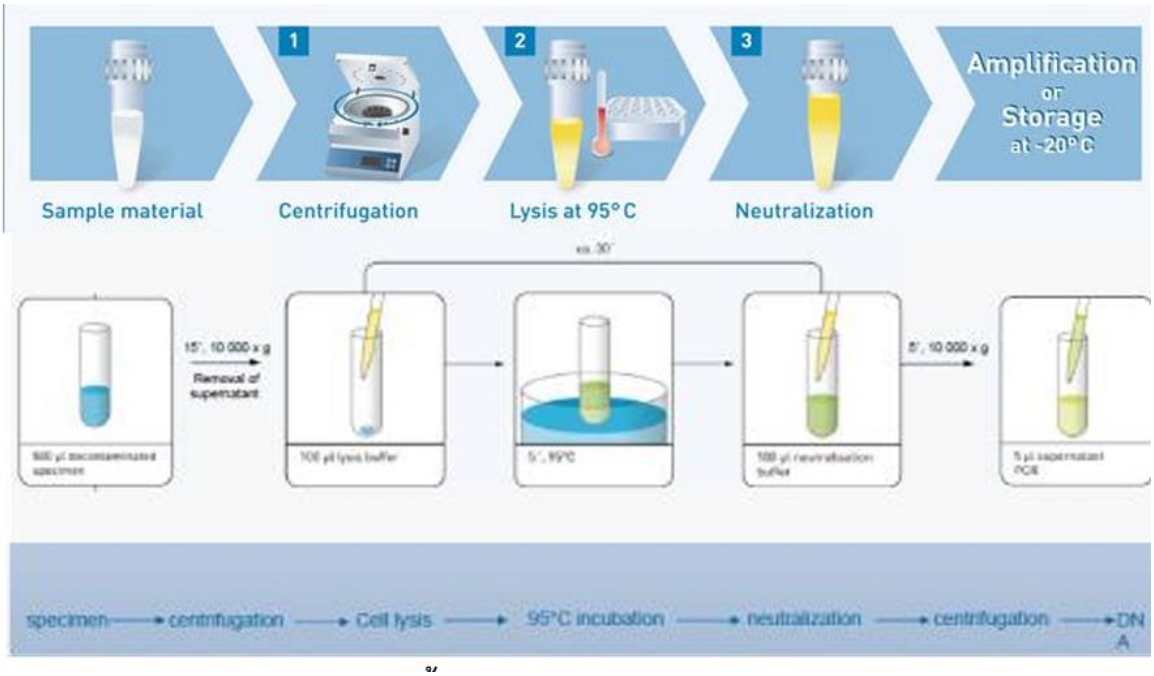
3. ใช้ micropipette ดูด supernatant (น้ำส่วนบน) ทิ้งให้หมด

4. เติม Lysis Buffer (A-LYS) ปริมาตร 100 µL ผสมด้วย vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาทีใน water bath

5. เติม Neutralization Buffer (A-NB) ปริมาตร 100 µL ผสมด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 5 นาที

6. ดูด supernatant (สารละลาย DNA) ปริมาตร 100 µL เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 mL แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

7. นำสารละลาย DNA ปริมาตร 5 µL ไปทดสอบต่อด้วยเทคนิค Line Probe Assay ขั้นตอนนี้จะช่วยให้สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคและเชื้อที่ดื้อยาหลายขนานได้อย่างแม่นยำ



รูปที่ 3-1 ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมในการทดสอบเชื้อวัณโรค

2.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) ด้วยเครื่อง GTQ-Cycler 24

การเตรียมสารและเริ่มการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

1. เติม Amplification Mixes A (AM-A) 10 µL และ Amplification Mixes B (AM-B) 35 µL ลงหลอด PCR แล้วผสมให้เข้ากัน
2. เติม DNA solution 5 µL ลงไปในหลอดที่เตรียมแล้ว
3. นำหลอดไปทำการ Amplification ด้วยเครื่อง GTQ-Cycler 24 โดยตั้งโปรแกรมดังนี้:
   - 1 cycle: 95°C เป็นเวลา 15 นาที
   - 20 cycles: 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, 65°C เป็นเวลา 2 นาที
   - 30 cycles: 95°C เป็นเวลา 25 วินาที, 53°C เป็นเวลา 40 วินาที, 70°C เป็นเวลา 40 วินาที
   - 1 cycle: 70°C เป็นเวลา 8 นาที

ขั้นตอนการใช้งานเครื่อง GTQ-Cycler 24

1. เปิดเครื่องโดยกดปุ่มเปิด-ปิดที่อยู่ด้านหลังเครื่อง
2. เปิดฝาเครื่องและใส่ Reaction Tube (ขนาด 0.2 mL) ลงในเครื่อง GTQ-Cycler 24 แล้วปิดฝาให้ล็อค
3. บนหน้าจอเครื่อง เลือก “Run Program”
4. เลือกโปรแกรมที่ต้องการใช้งาน สำหรับตัวอย่างทางคลินิก: เลือกโปรแกรม “MDR DIR”
5. ตั้งปริมาตรปฏิกิริยาที่ต้องการ โดยเลือก “50 µL” แล้วกด “OK”
6. ตรวจสอบรายละเอียดโปรแกรมที่ปรากฏบนหน้าจอ Touch Screen โดยเลือก “View Trace” เพื่อตรวจสอบ Temperature Curve

7.หลังจากโปรแกรมทำงานประมาณ 2 ชั่วโมง จะมีข้อความขึ้นบนหน้าจอว่า “Unit IS IDLE” หากมีข้อความ “Unit Holding” แสดงว่ากำลังทำการทดสอบรอบถัดไป สามารถกด Stop เพื่อหยุดได้

8.เมื่อสิ้นสุดโปรแกรม ให้กด “Stop” และกลับไปที่หน้า Home จากนั้นทำการปิดเครื่อง

9.ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิ 8°C ถึง -20°C

2.3 ขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Hybridization

1. อุ่นน้ำยา HYB และ STR ที่อุณหภูมิ 45°C ส่วน RIN และน้ำกลั่นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. เติม 20 µL ของ Denaturation Solution (DEN, ฝาสีฟ้า) เพื่อ denature DNA amplicons ลงในมุมของ well ใน Plastic Tray แล้วเติม 20 µL ของ DNA amplicon (PCR product สีม่วง) ผสมให้เข้ากันโดยปิเปตขึ้นลง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

3. เติม 1 mL ของ Hybridization Buffer (HYB, ฝาสีเขียว) ด้านตรงข้ามกับ well ที่ใส่สารไว้ครั้งแรก พลิก tray ขึ้นลงจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

4. วางแผ่น DNA STRIP ลงใน well ของ Plastic Tray (ให้ด้านตัวเลขอยู่ด้านล่าง tray) แล้วนำ tray ไปวางบนถาดให้ความร้อนของเครื่อง TwinCubator® บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 30 นาที (Program P1 Step 1) จากนั้นใช้ Pasteur pipette ดูด Hybridization Buffer ออกจาก well

5. เติม 1 mL ของ Stringen Wash Solution (STR, ฝาสีแดง) แล้วบ่มที่ 45°C เป็นเวลา 15 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 2) จากนั้นใช้ Pasteur pipette ดูด Stringen Wash Solution ออกจาก well

6. ล้าง Strip ด้วย 1 mL ของ Rinse Solution (RIN) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 3) แล้วเท RIN ทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

7. เติม 1 mL ของ Diluted Conjugate (10 µL CON-C + 990 µL CON-D) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 4) จากนั้นล้าง Conjugate ออกด้วยน้ำและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

8. ล้าง Strip ด้วย 1 mL ของ Rinse Solution (RIN) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 5) แล้วเท RIN ทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

9. ล้าง Strip อีกครั้งด้วย 1 mL ของ Rinse Solution (RIN) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 6) แล้วเท RIN ทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

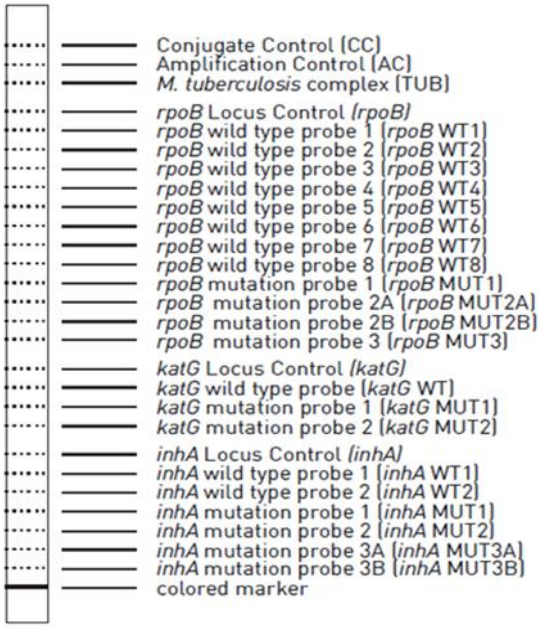
10. เติม 1 mL ของน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1 Step 7) แล้วเทน้ำกลั่นทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

11. เติม 1 mL ของ Diluted Substrate (10 µL SUB C + 990 µL SUB-D) แล้วบ่มระหว่างเวลา 3-20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (Program P1 Step 8) จนสีของ background ชัดเจนขึ้น จากนั้นเท substrate ทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ

12. หยุดการทำปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ (Program P1 Step 9 และ Step 10) แล้วเทน้ำกลั่นทิ้งและคว่ำ tray ลงซับกับกระดาษ จากนั้นหยิบแผ่น Strip ขึ้นมาอ่านผล

13. วางแถบ Strip ลงบน data sheet และแปลผล

2.4 การแปลผลวัณโรคที่ดื้อต่อยา R และ H ด้วยชุดตรวจ Genotype MTBDRplus Ver 2.0 ผลการทดสอบสามารถแปลได้ตามแถบต่าง ๆ ที่ปรากฏบนแผ่นตรวจ รายละเอียดดังรูปที่ 3-2



รูปที่ 3-2 การแปลผลการตรวจวัณโรคดื้อยาด้วย Genotype MTBDRplus Ver2.0

จากรูปที่ 3-2 มีรายละเอียดดังนี้

1.Conjugate Control (CC)

- เป็นการตรวจสอบประสิทธิภาพของการจับของ conjugate และการเกิดปฏิกิริยาของ substrate

- หากแถบ CC ปรากฏ แสดงว่าการทดสอบมีประสิทธิภาพในการจับ conjugate และเกิดปฏิกิริยาได้ตามปกติ

2. Amplification Control (AC)

- ตำแหน่งที่ amplicon ควบคุม (control amplicon) จะจับ หากผลการทดสอบมีประสิทธิภาพ

- ผลบวก: แถบ AC อาจจางลงหรือหายไปได้ อันเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาการแข่งขันในการจับ Amplification

- ผลลบ: หากแถบ AC และ CC ปรากฏพร้อมกัน แสดงว่าเป็นผลลบ (ไม่มีเชื้อ) แต่หากแถบ AC หายไปในกรณีผลลบ อาจบ่งบอกถึงข้อผิดพลาดในการสกัด DNA หรือการ Amplification ไม่สมบูรณ์ รวมถึงการมี inhibitor ที่รบกวนระหว่างการ Amplification

3. M. tuberculosis complex (TUB) หากแถบนี้ปรากฏขึ้น แสดงว่ามีการติดเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex

4. Locus Controls (r*poB, katG*, and *inhA*)

- ตำแหน่งของการจับของ gene region specific โดยเป็นการตรวจจับยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา

- *rpoB* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา R

- *katG* และ *inhA* เกี่ยวข้องกับการดื้อยา H

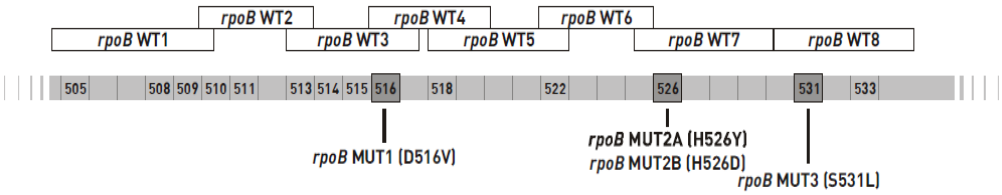
5. Wild Type Probes

- แถบนี้จะเป็นบวกหากไม่มีการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้อง
- หากแถบ wild type ปรากฏ แสดงว่าไม่มีการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ทดสอบ

6. Mutation Probes

- แถบนี้จะเป็นบวกหากมีการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้อง
- ตำแหน่ง *rpoB* MUT2A และ MUT2B อาจให้สัญญาณแถบที่ต่ำลง แต่ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้

ข้อควรระวัง แถบที่นำมาวิเคราะห์จะต้องมีความเข้มเท่ากันหรือมากกว่าแถบ AC



รูปที่ 3-3 แถบ Wild Type (WT) และ Mutation (MUT) ของยีน *rpoB*

แถบ Wild Type (WT) และ Mutation (MUT) ของยีน *rpoB* จะใช้ในการวิเคราะห์ผลการกลายพันธุ์

- หากแถบ Wild Type ปรากฏขึ้น แสดงว่าไม่มีการกลายพันธุ์
- หากแถบ Mutation ปรากฏ จะระบุการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเฉพาะ เช่น *rpoB* MUT1 (D516V), *rpoB* MUT2A (H526Y), *rpoB* MUT2B (H526D) และ *rpoB* MUT3 (S531L)

ตำแหน่งเหล่านี้เป็นจุดสำคัญในการระบุการดื้อยาต่อ Rifampicin รายละเอียดดังรูปที่ 3-3

การแปลผลตามแถบ Wild Type และ mutation ในตารางนี้ จะช่วยระบุว่าผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์ในยีน *katG* และ *inhA* หรือไม่ ซึ่งมีผลต่อการดื้อยาต่อ Isoniazid หากไม่มีการกลายพันธุ์ แถบ Wild Type จะปรากฏ แต่ถ้ามีการกลายพันธุ์ แถบ mutation จะเป็นบวก รายละเอียดดังตารางที่ 3-1 ถึง 3-2 จะใช้ในการวิเคราะห์เพิ่มเติมร่วมกับข้อมูลการกลายพันธุ์ในยีน *rpoB* ที่ตรวจจับการดื้อยา Rifampicin

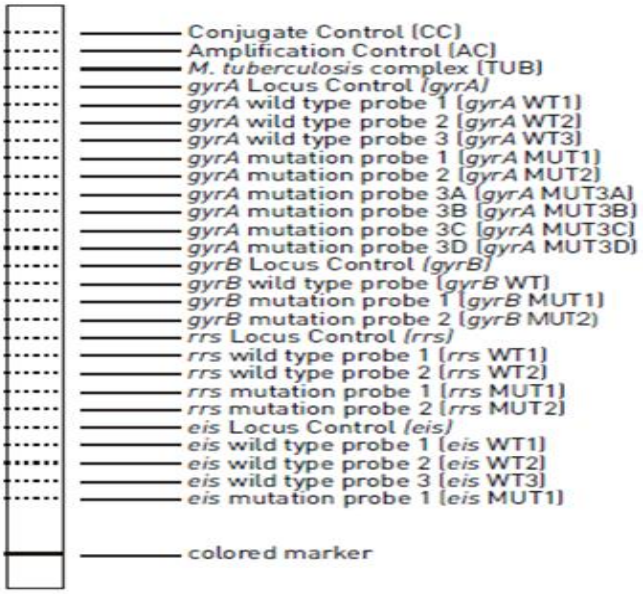
ตารางที่ 3-1 การกลายพันธุ์ในยีน *katG* และตำแหน่ง Wild Type และ mutation ที่เกี่ยวข้อง

Failing wild type band	Codon analyzed	Developing mutation band	Mutation
katG WT	315	*katG* MUT1	S315T1
		katG MUT2	S315T2

ตารางที่ 3-2 การกลายพันธุ์ในยีน *inhA* และตำแหน่ง Wild Type และ mutation ที่เกี่ยวข้อง

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation
inhA WT1	–15	*inhA* MUT1	C–15T
	–16	*inhA* MUT2	A–16G
inhA WT2	–8	*inhA* MUT3A	T–8C
		inhA MUT3B	T–8A

2.5 การแปลผลวัณโรคที่ดื้อต่อยาแนวที่ 2 SL-LPA ชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl VER 2.0 (Hain Life-Science, Nehren,Germany)



รูปที่ 3-4 การแปลผลการตรวจวัณโรคดื้อยาแนวที่ 2 SL-LPA ด้วยชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl VER 2.0

จากรูปที่ 3-4 มีรายละเอียดดังนี้

1.Conjugate Control (CC) แสดงถึงประสิทธิภาพของการจับ conjugate และปฏิกิริยาของ Substrate หากแถบ CC ปรากฏ แสดงว่าการทดสอบ conjugate binding และ substrate reaction ทำงานอย่างถูกต้อง

2. Amplification Control (AC) เป็นตำแหน่งที่ Control amplicon จะลงจับ หากมีประสิทธิภาพถูกต้อง

- ผลบวก แถบ AC อาจจางหรือหายไป เนื่องจากปฏิกิริยาการแข่งขันระหว่างการจับ Amplification

- ผลลบ หากทั้ง CC และ AC ปรากฏพร้อมกัน แสดงผลลบ (ไม่มีเชื้อ) แต่ถ้าผลลบมีแถบ AC หายไป แสดงถึงความผิดพลาดระหว่างการสกัด DNA หรือการ Amplification หรือมี inhibitor ระหว่างการ Amplification

3. *M.tuberculosis complex* (TUB) หากมีแถบนี้ แสดงว่ามีการติดเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex

4. Locus Controls (*gyrA, gyrB, rrs, eis*) เป็นตำแหน่งที่บ่งชี้การจับของ gene region ที่เฉพาะเจาะจง

- *gyrA* และ *gyrB* ใช้ในการวิเคราะห์การดื้อต่อยา FQs เช่น Ofx หรือ Mfx การแปลผล: หากพบแถบในส่วน *gyrA* หรือ *gyrB* อาจบ่งชี้ว่ามีการดื้อยากลุ่ม FQ ในขณะที่การกลายพันธุ์ในยีนเหล่านี้จะช่วยในการวิเคราะห์ความรุนแรงและลักษณะของการดื้อยา รายละเอียดดังตารางที่ 3-3 ถึง 3-4

ตารางที่ 3-3 การกลายพันธุ์ในยีน *gyrA* และตำแหน่ง Wild Type และ mutation

wild type band	mutation band	Mutation	resistance
gyrA WT1	-	G88A	FLQ
		G88C	
gyrA WT2	*gyrA* MUT1	A90V	
	gyrA MUT2	S91P	
gyrA WT3	*gyrA* MUT3A	D94A	
	gyrA MUT3B	D94N	
		D94Y	
	gyrA MUT3C	D94G	
	gyrA MUT3D	D94H[1)]	

ตารางที่ 3-4 การกลายพันธุ์ในยีน *gyrB* และตำแหน่ง Wild Type และ mutation

Failing wild type band	Developing mutation band	Mutation[1)]	Phenotypic resistance
gyrB WT	*gyrB* MUT1	N538D	FLQ
	gyrB MUT2	E540V	

สำหรับยีน *rrs* ใช้ในการวิเคราะห์การดื้อยาข้ามกลุ่ม (Cross-resistance) สำหรับยาปฏิชีวนะกลุ่ม AG/CP เช่น Kanamycin (Km), Amikacin (Am) กลุ่ม Aminoglycosides(AG) และ Capreomycin (Cm), Viomycin (Vm) ในกลุ่ม CP (Cyclic Peptides) ซึ่งการกลายพันธุ์ในยีนนี้จะช่วยระบุการดื้อยาในกลุ่มดังกล่าว รายละเอียดดังตารางตารางที่ 3-5 การวิเคราะห์เหล่านี้ใช้เพื่อระบุความต้านทานร่วมของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ต่อตัวยาในกลุ่ม AG/CP สำคัญในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยา

ตารางที่ 3-5 การกลายพันธุ์ในยีน *rrs* และการดื้อยาข้ามกลุ่มต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม AG/CP

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation	Phenotypic resistance				See figure 1
rrs WT1	1401	*rrs* MUT1	A1401G	KAN	AMK	CAP		example 2 and 6
	1402	-	C1402T	KAN		CAP	VIO	example 3
rrs WT2	1484	*rrs* MUT2	G1484T	KAN	AMK	CAP	VIO	example 4

ส่วนยีน *eis* ใช้สำหรับการวิเคราะห์การดื้อยา Kanamycin (Km) ในระดับต่ำ (low-level resistance) ซึ่งการกลายพันธุ์ในยีนนี้มีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อยาที่อาจไม่แสดงความรุนแรงเท่าการดื้อยาในระดับสูง แต่ยังคงเป็นข้อมูลสำคัญในการรักษาผู้ป่วยที่ดื้อต่อยา Km ข้อมูลการกลายพันธุ์ในยีน *eis* รายละเอียดดังตารางที่ 3-6 จะช่วยให้สามารถระบุความต้านทานในระดับต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3-6 การกลายพันธุ์ในยีน *eis* และการดื้อยา Kanamycin ระดับต่ำ (low-level KAN resistance)

Failing wild type band	Developing mutation band	Mutation	Phenotypic resistance
eis WT1	-	G-37T	low-level KAN
eis WT2	*eis* MUT1	C-14T	
	-	C-12T	
	-	G-10A	
eis WT3	-	C-2A	

3. การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Xpert MTB/XDR

3.1 การเตรียมตัวอย่าง: ตัวอย่างเสมหะที่ยังไม่ผ่านการทำลายเชื้อปนเปื้อนชนิดอื่น

1. เตรียมน้ำยา Sample Reagent (SR) ให้อยู่ที่อุณหภูมิห้อง
2. เตรียมตัวอย่างในตู้ BSC Class II
3. เติม Sample Reagent (SR) ลงในตัวอย่างเสมหะตามอัตราส่วน 2:1 (เช่น เติม Sample Reagent 2 mL ต่อ ตัวอย่างเสมหะ 1 mL)
4. เขย่าตัวอย่างที่ผสมแล้ว 10-20 ครั้ง หรือใช้ vortex อย่างน้อย 10 วินาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
5. เขย่าตัวอย่างอีกครั้ง 10-20 ครั้ง หรือใช้ vortex อย่างน้อย 10 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 5 นาที
6. เตรียมตลับ Cartridge ที่จะใช้งาน โดยเขียนชื่อและรหัสตัวอย่างที่ข้างตลับ
7. เปิดฝาตลับ Cartridge ใช้ Transfer Pipette ดูดตัวอย่างปริมาณ 2 mL ลงในตลับ Cartridge
8. ปิดฝาตลับ แล้วนำตลับเข้าเครื่อง GeneXpert เริ่มกระบวนการทดสอบโดยเลือก "Create Test" ใช้เวลาในการทดสอบทั้งหมด 90 นาที

การแปลผล: ผลการทดสอบจะออกมาหลังจากกระบวนการเสร็จสิ้น และจะแสดงข้อมูลที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อ รายละเอียดดังตารางที่ 3-7

ตารางที่ 3-7 ผลการทดสอบและการแปลผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยา (MTB/XDR)

ผลทดสอบ	การแปลผล
MTB DETECTED H Resistance NOT DETECTED FQ Resistance NOT DETECTED Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance NOT DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ด้านแถบการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา H, FQs, Am, Km, Cm, หรือ Eto ไม่ถูกพบ - SPC: NA (not applicable). An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS

ผลทดสอบ	การแปลผล
MTB DETECTED H Resistance DETECTED FQ Resistance DETECTED Am Resistance DETECTED Km Resistance DETECTED Cm Resistance DETECTED Eto Resistance DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *katG, fabG1, oxyR-ahpC* intergenic region และ *inhA* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง FQ resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้: *gyrA* และ *gyrB* quinolone resistance determining regions (QRDR) - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Am resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *rrs* gene และ *eis* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Km resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *rrs* gene และ *eis* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Cm resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *rrs* gene - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Eto resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *inhA* promoter SPC: NA (not applicable). An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS
MTB DETECTED H Resistance DETECTED FQ Resistance NOT DETECTED Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance NOT DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา FQs, Am, Km, Cm, หรือ Eto ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *katG, fabG1, oxyR-ahpC* intergenic region และ *inhA* promoter - SPC: NA (not applicable) An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS

ผลทดสอบ	การแปลผล
MTB DETECTED H Resistance DETECTED FQ Resistance INDETERMINATE Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance NOT DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา Am, Km, Cm, หรือ Eto ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใด หรือทั้งหมด ดังนี้ *katG, fabG1, oxyR-ahpC* intergenic region และ *inhA* promoter - การกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง FLQ resistance ไม่สามารถตรวจเจอได้เนื่องจากตรวจเจอแค่ 1 หรือหลายโพรบสำหรับ WT Tm และมีการทำนาย Tm ของโพรบเป้าหมายยืนยันจำนวน 1 หรือหลายโพรบของ *gyrA* หรือ *gyrB* "หรือ" ไม่มี Tm ของโพรบใดๆเลย - SPC: NA (not applicable). An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS
MTB DETECTED Low H Resistance DETECTED FQ Resistance NOT DETECTED Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance NOT DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา FQ, Am, Km, หรือ Cm ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Low H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมดดังนี้ *inhA* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Eto resistance ซึ่งเจอในตำแหน่ง *inhA* promoter - SPC: NA (not applicable) An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS
MTB DETECTED H Resistance NOT DETECTED Low FQ Resistance DETECTED Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance NOT DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา H, Am, Km, Cm, หรือ Eto ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Low FQ resistance ซึ่งเจอในตำแหน่ง *gyrA* - SPC: NA (not applicable) An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS

ผลทดสอบ	การแปลผล
MTB DETECTED H Resistance DETECTED FQ Resistance NOT DETECTED Am Resistance DETECTED Km Resistance DETECTED Cm Resistance DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา FQ และ Eto ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมด ดังนี้ *katG, fabG1*, และ *oxyR-ahpC* intergenic region - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Am resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมด ดังนี้ *rrs* gene และ *eis* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Km resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมด ดังนี้: *rrs* gene และ *eis* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Cm resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมด ดังนี้ *rrs* gene - SPC: NA (not applicable) An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control. - Probe Check: PASS
MTB DETECTED H Resistance DETECTED Low FQ Resistance DETECTED Am Resistance NOT DETECTED Km Resistance DETECTED Cm Resistance NOT DETECTED Eto Resistance NOT DETECTED	พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา Am, Cm และ Eto ไม่ถูกพบ - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง H resistance ซึ่งเจอในตำแหน่งใดหรือทั้งหมด ดังนี้: *katG, fabG1, oxyR-ahpC* intergenic region และ *inhA* promoter - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Low FQ resistance ซึ่งเจอในตำแหน่ง *gyrA* - เจอการกลายพันธุ์ที่บ่งบอกถึง Km resistance ซึ่งเจอในตำแหน่ง *eis* promoter - SPC: NA (not applicable) An SPC signal is not required because MTB amplification can compete with this control - Probe Check: PASS
MTB NOT DETECTED	ไม่พบเป้าหมาย MTB ในตัวอย่าง - SPC: PASS. The SPC met the acceptance criteria. - Probe Check: PASS

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อในกรณีที่ผลการตรวจด้วยวิธี LPA และวิธี Xpert MTB/XDR ไม่สอดคล้องกัน

4.1 กระบวนการลดการปนเปื้อน (Decontamination process)

- นำตัวอย่างเสมหะมาลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ ด้วยสารละลาย 2% NALC/NaOH ในอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:2 ขึ้นอยู่กับความเหนียวข้นของเสมหะ

- ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Phosphate Buffer pH 6.8 (PBS) ในอัตราส่วน 1:1

- ปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 x g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

- เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม PBS pH 6.8 ปริมาตร 1-1.5 mL ลงไปในหลอด แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปต

- ใช้สารละลายที่ได้เป็นตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์:
    - หยดตัวอย่าง 1-2 หยดลงบนสไลด์เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยการย้อมสี acid fast bacilli (Ziehl Neelsen stain)
    - แบ่งตัวอย่าง 4 หยดเพาะเลี้ยงเชื้อลงบน อาหารแข็ง (LJ media)
    - ดูดตัวอย่าง 0.5 mL ใส่ลงใน อาหารเหลว (MGIT media) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960
    - เก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

4.2 การพิสูจน์แยกชนิดเชื้อด้วยวิธี Immunochromatographic Assay (ICA)

- ตัวอย่างที่เจริญเติบโตจากการเพาะเลี้ยงจะถูกนำมาทดสอบหาแอนติเจน MPT64 ซึ่งเป็นโปรตีนเฉพาะในเชื้อกลุ่ม Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC)

- ทดสอบด้วยชุดตรวจ TB Ag MPT64 Rapid (SD, Korea) ซึ่งใช้แยกเชื้อกลุ่ม MTBC ออกจากเชื้อกลุ่ม NTM (Nontuberculous Mycobacteria)

4.3 การทดสอบความไวต่อยา (Drug Susceptibility Test)

- ตัวอย่างที่มีการเจริญเติบโตจากการเพาะเชื้อใน เครื่อง BACTEC MGIT 960 และได้รับการยืนยันว่าเป็น *Mycobacterium tuberculosis* complex ด้วยชุดทดสอบ TB Ag MPT64 Rapid จะถูกนำไปเพาะบนอาหารแข็ง (L-J media)

- เชื้อวัณโรคที่บริสุทธิ์ (Purify Colony) อายุประมาณ 2 สัปดาห์ที่เจริญเติบโตไม่น้อยกว่า 20 colonies จะถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาแบบ Liquid MGIT 960 ดังนี้:
    - ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง ประมาณ 1 loop full ใส่ใน Sterile screw tube ที่มี glass beads ขนาด 3 mm จำนวน 7-8 เม็ด แล้วปั่นด้วยเครื่อง Vortex นาน 30 วินาที จนเชื้อแตกกระจาย
    - เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3-7 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อที่เกาะตัวตกตะกอน
    - ปรับความขุ่นของสารละลายเป็น 0.5 McFarland ด้วยเครื่อง Densitometer แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:5

- ดูดสารละลาย 0.5 mL ใส่ในหลอด MGIT ที่มียาผสมอยู่ ได้แก่ Streptomycin (S), Isoniazid (H), Rifampicin (R), และ Ethambutol (E) ที่ความเข้มข้น 1.0 µg/mL, 0.1 µg/mL, 1.0 µg/mL และ 5 µg/mL ตามลำดับ
- เจือจางเชื้ออีกครั้งในอัตราส่วน 1:100 แล้วดูดสารละลาย 0.5 mL ใส่ในหลอด MGIT ที่ไม่มียาผสม (growth control)
- ผสมโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำหลอดทั้งหมดเข้าเครื่อง BACTEC MGIT 960 เพื่อตรวจวัดสารเรืองแสงเปรียบเทียบระหว่างหลอดที่มียาและหลอดควบคุม
- เครื่องจะแสดงผลเป็นค่า Growth unit (GU) และแปลผลการทดสอบว่าดื้อยา (resistance) หรือไวต่อยา (susceptible)

5. การตรวจสอบและวิเคราะห์ข้อมูลหลังการดำเนินการตรวจในแต่ละขั้นตอน

- ตรวจสอบความถูกต้องและความครบถ้วนของข้อมูลที่ได้รับ
- ลงรหัสข้อมูลและบันทึกในคอมพิวเตอร์
- ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อประเมินค่าทางสถิติ ได้แก่
  - ค่าความไว (Sensitivity): ความสามารถในการตรวจพบผู้ที่มีเชื้อจริง
  - ค่าความจำเพาะ (Specificity): ความสามารถในการระบุผู้ที่ไม่มีเชื้อจริง
  - ค่าความถูกต้อง (Accuracy): ความถูกต้องของผลตรวจทั้งหมด
  - ค่าทำนายผลลบ (PV): ความน่าจะเป็นที่ผู้ที่ได้ผลลบไม่มีเชื้อจริง
  - ค่าทำนายผลบวก (PPV): ความน่าจะเป็นที่ผู้ที่ได้ผลบวกมีเชื้อจริง
- เปรียบเทียบ ระยะเวลาการรายงานผล (TAT) ของการตรวจแต่ละขั้นตอนเพื่อประเมินประสิทธิภาพและความรวดเร็วในการตรวจ

3.4 ขั้นตอนการศึกษา

1. เก็บรวบรวมข้อมูลการตรวจวิเคราะห์วัณโรคและวัณโรคดื้อยาจากโปรแกรม Lab TB-online ของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค ระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566 ประกอบด้วย ผลการตรวจการดื้อยาวัณโรควัณโรคด้วยวิธี Line Probe Assay ผลการตรวจด้วยวิธี Xpert MTB/RIF ultra ผลการเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี MGIT 960 และผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR

2. ตรวจสอบความถูกต้อง ครบถ้วนของข้อมูล และวิเคราะห์ข้อมูล

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติสำหรับประเมินประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานโดยใช้วิธีที่ทดสอบ ได้แก่ LPA และ Xpert MTB/XDR โดยจะมีการตรวจสอบค่าทางสถิติที่สำคัญเพื่อประเมินความแม่นยำของวิธีการดังกล่าว ได้แก่

- ค่าความไว (Sensitivity): ความไวในการตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยา หมายถึงความสามารถของวิธีการในการตรวจจับผู้ป่วยที่มีเชื้อวัณโรคดื้อยาจริง ๆ หากค่า Sensitivity สูง วิธีการนั้นจะมีความสามารถสูงในการตรวจพบผู้ป่วยที่มีเชื้อ

- ค่าความจำเพาะ (Specificity): ความจำเพาะในการระบุผู้ที่ไม่มีเชื้อวัณโรคดื้อยา หมายถึงความสามารถของวิธีการในการแยกผู้ป่วยที่ไม่มีเชื้อวัณโรคดื้อยาออกจากผู้ที่มีเชื้ออย่างแม่นยำ หากค่า Specificity สูง วิธีการนั้นจะลดการตรวจเจอผลบวกที่ผิดพลาดได้

- ค่าความถูกต้อง (Accuracy): ประเมินผลการตรวจทั้งหมดว่าถูกต้องแค่ไหน โดยจะวัดผลรวมจากการตรวจทั้งผู้ป่วยที่มีเชื้อและไม่มีเชื้อ การมีค่า Accuracy สูงแสดงถึงการตรวจที่แม่นยำมากทั้งในแง่ของการตรวจพบผู้ที่มีเชื้อและผู้ที่ไม่มีเชื้อ

- ค่าทำนายผลลบ (NPV): ความสามารถของวิธีการในการคาดการณ์ว่าผู้ที่ได้ผลลบจะไม่มีเชื้อวัณโรคดื้อยาจริง ๆ ค่า NPV ที่สูงแสดงว่าวิธีการสามารถระบุผู้ที่ไม่มีเชื้อได้อย่างถูกต้อง

- ค่าทำนายผลบวก (PPV): ความสามารถของวิธีการในการคาดการณ์ว่าผู้ที่ได้ผลบวกจะมีเชื้อวัณโรคดื้อยาจริง ๆ ค่า PPV ที่สูงแสดงว่าวิธีการสามารถระบุผู้ป่วยที่มีเชื้อได้อย่างแม่นยำ

3.6 ระยะเวลาการศึกษา

ดำเนินการระหว่างเดือนมกราคม 2566 ถึง เดือนกันยายน 2566

บทที่ 4

ผลการศึกษา วิจัย

การศึกษานี้ได้ดำเนินการเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน โดยใช้วิธีการตรวจ LPA และ Xpert MTB/XDR กับตัวอย่างเสมหะจำนวน 454 ตัวอย่างที่ได้รับจากโรงพยาบาลในพื้นที่เขตความรับผิดชอบของ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี ซึ่งส่งมายังห้องปฏิบัติการของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาคือ การประเมินความแม่นยำ ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ รวมถึงระยะเวลาการรายงานผลในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เพื่อหาข้อสรุปเกี่ยวกับประสิทธิภาพของทั้งสองวิธีในการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา H ยากลุ่ม FQ และยากลุ่ม SLIDs เช่น Cm, Am, Km

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเสมหะจำนวน 454 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนาน โดยเฉพาะการดื้อยาต่อยา H ยากลุ่ม FQ และยากลุ่ม SLIDs คือ SLIDs เช่น Cm, Am, Km โดยใช้วิธี Xpert MTB/XDR เปรียบเทียบกับวิธี LPA พร้อมชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 และได้ผลลัพธ์ดังต่อไปนี้

จากการตรวจหาเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะจำนวน 454 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างจำนวน 403 ตัวอย่าง ให้ผล MTB positive สอดคล้องกันทั้งสองวิธี ตัวอย่างจำนวน 51 ตัวอย่าง ให้ผล MTB negative สอดคล้องกันทั้งสองวิธี ตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่างให้ MTB ไม่สอดคล้องกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่า accuracy, sensitivity, specificity, PPV, NPV ของ MTB พบ 98.68%, 100%, 88.24%, 98.53%, 100% ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 4-1 สำหรับตัวอย่างที่ไม่สอดคล้องเมื่อเพาะเชื้อขึ้นแล้วพบว่าเป็นเชื้อ MTB ทั้ง 6 ตัวอย่าง เมื่อนำเชื้อที่เพาะขึ้นมาทดสอบซ้ำด้วย DST, Xpert MTB/XDR วิธี LPA พร้อมชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 พบ MDR-TB จำนวน 2 ตัวอย่างดื้อต่อ H จำนวน 4 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4-1 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0

Xpert MTB/XDR	Line Probe Assay		Total
	MTB positive	MTB negative	
MTB positive	403	6	409
MTB negative	-	45	45
Total	403	51	454

จากตัวอย่างเสมหะที่ให้ผล MTB positive จำนวน 403 ตัวอย่าง พบผลการดื้อยา H สอดคล้องกันทั้งสองวิธี จำนวน 290 ตัวอย่าง พบผลสอดคล้องกันทั้งสองวิธีคือไวต่อยา H จำนวน 111 ตัวอย่าง พบเฉพาะการดื้อยา H ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR จำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่า accuracy, sensitivity, specificity, PPV, NPV พบ 99.50%, 100%, 98.23%, 99.3%, 100% ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 4-2 สำหรับตัวอย่างที่ไม่สอดคล้องจำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อนำเชื้อที่เพาะขึ้นมาทดสอบซ้ำด้วย DST, Xpert MTB/XDR วิธี LPA พร้อมชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 พบการดื้อยา H โดยวิธี DST, Xpert MTB/XDR ทั้ง 2 ตัวอย่าง.ในขณะที่ไม่พบการดื้อยา H โดยวิธี LPA การวิเคราะห์การดื้อยากลุ่ม FQ พบการดื้อยา FQ สอดคล้องกันทั้งสองวิธี จำนวน 13 ตัวอย่าง พบการไวต่อยาสอดคล้องกันทั้งสองวิธี จำนวน 390 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ค่า accuracy, sensitivity, specificity, PPV, NPV พบว่าได้ 100% ทุกค่า รายละเอียดดังตารางที่ 4-3 การวิเคราะห์การดื้อยากลุ่ม SLIDs พบการดื้อยา SLIDs สอดคล้องกันทั้งสองวิธี จำนวน 5 ตัวอย่าง พบการไวต่อยาสอดคล้องกันทั้งสองวิธี จำนวน 398 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ค่า accuracy, sensitivity, specificity, PPV, NPV พบว่าได้ 100% ทุกค่า รายละเอียดดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-2 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่มีการดื้อยา H ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0

Xpert MTB/XDR	Line Probe Assay		Total
	H-resistance	H-susceptible	
H-resistance	290	2	292
H-susceptible	-	111	111
Total	290	113	403

ตารางที่ 4-3 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ วัณโรคที่มีการดื้อยา FQ ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDR*plus* Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0

Xpert MTB/XDR	Line Probe Assay		Total
	FQ-resistance	FQ-susceptible	
FQ-resistance	13	0	13
FQ-susceptible	-	390	390
Total	13	390	403

ตารางที่ 4-4 เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่มีการดื้อยาในกลุ่ม Second line injectables ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA โดยชุดตรวจ GenoType MTBDR*plus* Ver 2.0และ GenoType MTBDRsl VER 2.0

Xpert MTB/XDR	**Line Probe Assay**		**Total**
	Cm/Am/Km - resistance	**Cm/Am/Km - susceptible**	
Cm/Am/Km - resistance	5	0	5
Cm/Am/Km - susceptible	-	398	398
Total	5	398	403

จากการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR เปรียบเทียบกับวิธี LPA ในตัวอย่างเสมหะจำนวน 454 ตัวอย่าง พบว่าวิธี Xpert MTB/XDR มีความแม่นยำสูงในการตรวจวิเคราะห์ทั้งการดื้อยา H, FQ และยากลุ่ม SLIDs (Cm, Am และ Km) โดยค่าความถูกต้อง (Accuracy), ความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ค่าทำนายผลบวก (PPV) และค่าทำนายผลลบ (NPV) ของวิธี Xpert MTB/XDR ในการทดสอบทั้งหมดอยู่ในระดับสูง โดยเฉพาะการทดสอบดื้อยากลุ่ม FLQ และ Second Line Injectables ที่มีประสิทธิภาพสูงถึง 100% ในทุกตัวชี้วัด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าวิธี Xpert MTB/XDR สามารถเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ควบคู่ไปกับวิธี LPA ช่วยให้ผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาได้รับการรักษาที่เหมาะสมในเวลาที่รวดเร็วขึ้น

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผล

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานในตัวอย่างเสมหะ จำนวน 454 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA ได้ค่าสถิติของการตรวจวิเคราะห์ เพื่อการประเมินประสิทธิภาพของวิธี Xpert MTB/XDR รายละเอียดดังตารางที่ 5-1 พบประเด็นสำคัญดังนี้

1. ประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อวัณโรค (MTB) วิธี Xpert MTB/XDR มีความแม่นยำสูง โดยมีค่าความถูกต้อง 98.68% ค่าความไว 100% ค่าความจำเพาะ 88.24% ค่าทำนายผลบวก 98.53% และค่าทำนายผลลบ 100% ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการตรวจจับเชื้อวัณโรคอย่างแม่นยำ

2. การตรวจหาการดื้อยา H การตรวจวัณโรคดื้อต่อยา H ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR มีค่าความถูกต้อง 99.50% ค่าความไว 100% ค่าความจำเพาะ 98.23% ค่าทำนายผลบวก 99.32% และค่าทำนายผลลบ 100% แสดงถึงประสิทธิภาพในการตรวจหาการดื้อยา H ได้อย่างแม่นยำ

3. การตรวจหาการดื้อยา FQ ผลการตรวจหาการดื้อยา FQ ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR มีค่าความถูกต้อง 100% ค่าความไว 100% ค่าความจำเพาะ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% แสดงถึงประสิทธิภาพในการตรวจหาการดื้อยา FQ ได้อย่างแม่นยำ

4. การตรวจหาการดื้อยากลุ่ม SLIDs (Cm, Am, Km) ด้วยวิธี Xpert MTB/XDR มีค่าความถูกต้อง 100% ค่าความไว 100% ค่าความจำเพาะ 100% ค่าทำนายผลบวก 100% และค่าทำนายผลลบ 100% แสดงถึงประสิทธิภาพในการตรวจหาการดื้อยา SLIDs ได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 5-1 ค่าสถิติการประเมินประสิทธิภาพของการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยวิธี Xpert MTB/XDR และวิธี LPA

การตรวจวิเคราะห์	Accuracy %	Sensitivity %	Specificity %	Positive predictive value %	Negative predictive value %
MTB	98.68	100	88.24	98.53	100
H	99.50	100	98.23	99.32	100
FQ	100	100	100	100	100
Cm/Am/Km	100	100	100	100	100

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี Xpert MTB/XDR มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธี LPAซึ่งเป็นหลักการที่องค์การอนามัยโลก (WHO) ให้การรับรองในการตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง และ วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ได้เพิ่มเติมการตรวจซ้ำจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในรายที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันในการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรค จำนวน 6 ตัวอย่าง ด้วย DST, Xpert

MTB/XDR และวิธี LPA พร้อมชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 พบ MDR-TB จำนวน 2 ตัวอย่าง ดื้อต่อ H จำนวน 4 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการตรวจด้วย Xpert MTB/XDR ที่ไม่ต้องใช้เครื่องปั่นในการเตรียมตัวอย่าง ทำให้ไม่มีการสูญเสียเชื้อในตัวอย่างไปขณะปั่นล้างเช่นเดียวกับวิธี LPA ทำให้ Xpert MTB/XDR ตรวจเชื้อในตัวอย่างที่จำนวนเชื้อน้อยๆ ประมาณ 160 เซลล์/มิลลิลิตรได้ รวมถึงการตรวจไม่พบเชื้อวัณโรคดื้อยา H ใน 2 ตัวอย่างโดยวิธี LPA พร้อมชุดตรวจ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 ในขณะที่สามารถตรวจพบโดยวิธี DST, Xpert MTB/XDR โดยการตรวจซ้ำจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นร่วมด้วยแสดงให้เห็นว่า วิธี Xpert MTB/XDR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่นที่อยู่นอกเหนือจากตำแหน่งที่วิธี LPA ชุดทดสอบ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ตรวจพบ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อวัณโรคและวัณโรคดื้อยา โดยใช้วิธีการทดสอบ Xpert MTB/XDR ซึ่งนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง และวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก ผลการศึกษาพบว่า วิธี Xpert MTB/XDR มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับชุดทดสอบ GenoType MTBDRplus Ver 2.0 และ GenoType MTBDRsl VER 2.0 ด้วยวิธี LPA ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ในหลายงานวิจัยยังระบุว่าหลักการ Real-Time PCR ซึ่งเป็นพื้นฐานของวิธีการนี้ สามารถใช้ในการคัดกรองวัณโรคดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้ Xpert MTB/XDR มีวิธีการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก ได้ผลรวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 90 นาที ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง และวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก ทำให้สามารถทราบผลการทดสอบภายใน 6-12 ชั่วโมง หากตรวจด้วยวิธี Xpert MTB/RIF และพบการดื้อยา R ก็สามารถนำตัวอย่างไปตรวจเพิ่มเติมต่อด้วยวิธี Xpert MTB/XDR เพื่อตรวจหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้ในเวลาเพียง 90 นาที หรือหากตรวจด้วยวิธี LPA เพื่อตรวจการดื้อยา H และ R ซึ่งถ้าดื้อต่อยาทั้งสองก็จะนำตัวอย่างไปตรวจต่อด้วยวิธี Xpert MTB/XDR เพื่อหาว่าเชื้อวัณโรคนั้นดื้อต่อยากลุ่ม FQs และยากลุ่ม SLIDs หรือไม่ หากพบว่าดื้อต่อยาเหล่านี้ จะสามารถวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง ทำให้ผู้ป่วยได้รับผลการตรวจที่รวดเร็ว ได้รับการรักษาที่เหมาะสม และสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาไปสู่ชุมชน

นอกจากนี้ วิธี Xpert MTB/XDR ยังสามารถตรวจสอบได้ว่าเชื้อที่ดื้อต่อยา H เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *KatG* หรือ *InhA* หากพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *InhA* ก็จะพบการดื้อยาต่อ Eto ซึ่งออกฤทธิ์ที่ตำแหน่งเดียวกัน ทั้งนี้ การกลายพันธุ์ของตำแหน่ง *InhA* ยังสัมพันธ์กับระดับการดื้อยาแบบ Low-level resistance การเปรียบเทียบของการตรวจด้วยวิธี LPA และ MTB/XDR สามารถแสดงรายละเอียดดังตารางที่ 5-2

ตารางที่ 5-2 การเปรียบเทียบของการตรวจด้วยวิธี LPA และ MTB/XDR

Characterizations	Line Probe Assay	Xpert MTB/XDR
1.Principle	Amplification and reverse hybridization	Nested Real-time PCR and melt peak detection
2. Drug resistance	FL=R, H SL=FQs และกลุ่ม Injectables drugs (Cm, Am, Km)	H, FQ Eto, Cm, Am, Km
3.MDR-TB detected	Yes	No
4.Limit of detection CFU/mL	160 CFU/mL	Unprocessed Sputum: 136 colony-forming units per milliliter (CFU/mL) Sputum Sediment: 86 CFU/mL
5.Turnaround time ;TAT	24-48 hours	6-12 hours
6.Experience	Yes	No
7.Prices of test	400-500 Baht	1,000-1,250 Baht

ข้อเสนอแนะ

1. การเลือกใช้ชุดตรวจตามความเหมาะสม

การเลือกใช้ชุดตรวจควรพิจารณาจากราคาและปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความชำนาญของบุคลากร สำหรับน้ำยาของวิธี Xpert MTB/XDR ที่มีราคาประมาณ 1,000-1,250 บาทต่อการทดสอบ เหมาะสมใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ไม่เหมาะที่จะใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยวัณโรคทั่วไป หากต้องการการคัดกรองผู้ป่วยวัณโรคทั่วไปควรใช้วิธี Xpert MTB/RIF ultra ซึ่งอาจเป็นทางเลือกที่เหมาะสมกว่า

2. น้ำยา LPA ชุดทดสอบ GenoType MTBDRsl Ver 2.0

ชุดทดสอบนี้มีราคาประมาณ 400-500 บาท แต่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญและผ่านการอบรมในการตรวจวิเคราะห์ และเหมาะสำหรับตัวอย่างที่ AFB Positive เท่านั้น การใช้วิธีนี้อาจเป็นตัวเลือกที่ดีในกรณีที่ต้องการการทดสอบหาเชื้อวัณโรคดื้อยา

3. การจัดการผลตรวจ Rifampicin จาก Xpert MTB/RIF ultra

หากตรวจพบการดื้อยา Rifampicin ในระดับ Low หรือ Very low และเป็นผู้ป่วยรายใหม่ ควรพิจารณาเก็บตัวอย่างเพิ่มอีก 1 กระปุก เพื่อทดสอบซ้ำหรือทดสอบด้วยวิธีอื่น เช่น LPA ทั้งนี้ อาจมีความเป็นไปได้ในการเกิด False Positive ของการดื้อยา Rifampicin ได้ประมาณ 10% ซึ่งอาจทำให้การทดสอบด้วย Xpert MTB/XDR ให้ผล MTB Not Detected หรือผลการดื้อยาที่ได้อาจเป็น Indeterminate ทำให้ไม่สามารถแปลผลได้ แนะนำให้ทำการส่งเพาะเชื้อต่อ

4. การทดสอบ Xpert MTB/XDR มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นการทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองสำหรับตัวอย่างที่ตรวจพบว่าติดเชื้อ *M. tuberculosis* และเพื่อใช้เป็นตัวช่วยในการวินิจฉัยประเภทหลักของการดื้อยาที่มีอยู่ใน M/XDR-TB เมื่อใช้ร่วมกับผลการตรวจทางคลินิกและการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ เพื่อแก้ไขวิกฤต MDR-TB ทั่วโลกและเร่งการวินิจฉัย องค์การอนามัยโลกได้กำหนดว่าการขยายการทดสอบอย่างรวดเร็วและการตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาเป็นสิ่งสำคัญที่สุด

บรรณานุกรม

1. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค. (2564). *แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2564: National Tuberculosis Control Programme Guideline, Thailand 2021*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์.

2. World Health Organization. (2014). *Global tuberculosis report 2014*. Geneva, Switzerland: WHO.

3. World Health Organization. (2020). *WHO operation handbook on tuberculosis: Module 3: diagnosis-rapid diagnostic for tuberculosis detection*. Geneva: World Health Organization.

4. Reechaipichitkul, W. (2016). *Guideline for programmatic management of drug-resistant tuberculosis* (2nd ed.). Bureau of Tuberculosis, Ministry of Public Health.

5. Reechaipichitkul, W. (2017). Guidelines for DR-TB, MDR-TB and XDR-TB treatment in Thailand 2016. In Pornsuriyasak, P., Kaewkittinarong, K., & Kaewamatawong, T. (Eds.), *Current practice in pulmonary medicine* (pp. 101–117). Nontaburi: Parbpim.

6. World Health Organization. (2014). *Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis* (WHO/HTM/TB/2014.11). Geneva, Switzerland: WHO.

7. World Health Organization. (2016). *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis: update 2016*. Geneva, Switzerland: WHO.

8. Kim, M. J., Nam, Y. S., Cho, S. Y., Park, T. S., & Lee, H. J. (2015). Comparison of the Xpert MTB/RIF Assay and Real-time PCR for the detection of Mycobacterium tuberculosis. *Annals of Clinical & Laboratory Science, 45*(3), 327–332.

9. Zhang, Z. X., Sng, L. H., Yong, Y., Lin, L. M., Cheng, T. W., Seong, N. H., et al. (2017). Delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in AFB smear-negative patients with pneumonia. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 21*(5), 544–549.

10. Suthum, K., & Tipkrua, N. (2013). Comparison of Mycobacterium tuberculosis drug resistance testing between Real-time PCR using a Dual Priming Oligonucleotide Method and drug susceptibility testing by the BACTEC MGIT 960 System. *Journal of Medical Technology Association Thailand, 41*(3), 4654–4666.

11. Lawn, S. D., Mwaba, P., Bates, M., Piatek, A., Alexander, H., & Marais, B. J., et al. (2013). Advances in tuberculosis diagnostics: The Xpert MTB/RIF assay and future prospects for a point-of-care test. *Lancet Infectious Diseases, 13*(4), 349–361.

12. Brossier, F., Veziris, N., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., & Sougakoff, W. (2006). Performance of the genotype MTBDR Line Probe Assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of Mycobacterium tuberculosis with low- and high-level resistance. *Journal of Clinical Microbiology, 44*(12), 3659–3664.

13. Rufai, S. B., Kumar, P., Singh, A., Prajapati, S., Balooni, V., & Singh, S. (2014). Comparison of Xpert MTB/RIF with Line Probe Assay for detection of rifampin-monoresistant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology, 52*(6), 1846–1852.

14. World Health Organization. (2022). *Practice manual on tuberculosis laboratory strengthening 2022 update*. Geneva: World Health Organization.

15. World Health Organization. (2020). *WHO operation handbook on tuberculosis: Module 3: diagnosis-rapid diagnostic for tuberculosis detection*. Geneva: World Health Organization.

16. โยธิน ถนอมวัฒน์. (2566). การบริหารจัดการกองทุนวัณโรคในระบบหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานและหลายขนานชนิดรุนแรงมาก, มิถุนายน 2566.

17. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค. (2562). *แนวทางบริหารจัดและการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการด้านวัณโรค:Management and practice guideline for tuberculosis laboratory*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์.

18. HAIN Lifescience. (2015). *Instructions for use GenoType MTBDRplus VER 2.0* [cited 2019 Aug 26].

19. Bollela, V. R., Namburete, E. I., Feliciano, C. S., Macheque, D., Harrison, L. H., & Caminero, J. A. (2016). Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 20*(8), 1099–1104.

20. Kambli, P., Ajbani, K., & Sadani, M. (2015). Defining multidrug-resistant tuberculosis: Correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 82*(1), 49–53.

21. Achilles Katamba, Willy S sengooba, James S serubiri, Derrick Semugenze, George William Kasle. (2023) .Evaluation of Xpert MTB/XDR test for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first and second-line drugs in Uganda. PLOS ONE.

22. BollelaVR, NambureteEI,Feliciano CS, Macheque D, HarrisonLH, CamineroJA. Detection of katG and inhA mutations to guide isoniazid and ethionamide use for drug-resistant tuberculosis Int J Tuberc Lung Dis 2016;20:1099-104.

23. Kambli P, Ajbani K, Sadani M, Nikam C, Shetty A, Udwadia Z, et al. Definingmultidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations. Diagn Microbiol Infect Dis 2015;82:49-53.

24. Ranganath R, Vijay Kumar GS, Javali V, Ranganath R. Line probe assay as a rapid tool for detection of MDRTB. Ann Res Rev Biol 2014; 4:246-57.

25. Maurya AK, Singh AK, Kant S, Umrao J, Kumar M, Kushwaha RA, et al. Use of GenoType® MTBDRplus assay to assess drug resistance and mutation patterns of multidrug-resistant tuberculosis isolates in Northern India. Indian J Med Microbiol 2013; 31:230-6.

26. Singhal R, Arora J, Lal P, Balla M, Myneeedu VP, Vehera D. Detection of multi-drug resistant tuberculosis by line probe assay. Indian J Med Res 2012; 136:1044-7

27. Sharma BK, Bhandari S, Maharjan B, Shrestha B, Banjara MR. Rapid detection of rifampicin and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis using Genotype MTBDRplus assay in Nepal. Int Sch Res Notices 2014; 2014:648294.

28. Albert H, Bwanga F, Mukkada S, Nyesiga B, Ademun JP, Lukyamuzi G, et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda. BMC Infect Dis 2010; 10:41.

29.Singh, S., Rojava, P., Vinnard, C., Sharma, A., & Banerjee, R. (2022). Diagnostic accuracy of Xpert MTB/XDR for detection of isoniazid- and fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: A multicentre study. *The Lancet Infectious Diseases, 22*(4), 519–528. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00694-4

30.Nguyen, H. V., Bui, T. N., Dao, T. L., & Hoang, T. M. (2021). Performance of the Xpert MTB/XDR assay compared to line probe assay and phenotypic drug susceptibility testing. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 25*(12), 1002–1009. https://doi.org/10.5588/ijtld.21.0445

31.Maya, T., Wilfred, A., Lubinza, C., Mfaume, S., Mafie, M., Mtunga, D., Kingalu, A., Mgina, N., Petrucka, P., Doulla, B. E., Ngadaya, E., Mfinanga, S. G., & Mnyambwa, N. P. (2024). Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/XDR assay for detection of Isoniazid and second-line antituberculosis drugs resistance at central TB reference laboratory in Tanzania. *BMC Infectious Diseases, 24*, 672.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย): นางสาวนงเยาว์ มีสิทธิ์
2. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ): Miss NONGYAO MESITHI
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3321000695842
4. ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

   205/21 หมู่ 4 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
6. ที่ทำงานปัจจุบัน

   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค อาคาร 5 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000

   โทรศัพท์ 085 0874427 Email: yaomesithi@yahoo.com
7. ประวัติการศึกษา: วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2535-2539
8. ประวัติการทำงาน:

   ปี พ.ศ. 2542 – 2548 นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี

   ปี พ.ศ. 2548 – 2551 นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี

   ปี พ.ศ. 2551 – ปัจจุบัน หัวหน้ากลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี
9. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

   - Molecular biology
10. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ

    - การเฝ้าระวังการติดเชื้อ HIV-2 ในกลุ่มเสี่ยงเมืองชลบุรีและเมืองพัทยา เผยแพร่ผลงานโดยการตีพิมพ์ใน วารสารสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดชลบุรี ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 ม.ค.-มี.ค 2551

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย): นางสาวศศิพร ตั้งพรชัย
2. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ): Miss SASIPORN TUNGPORNCHAI
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 1720100019627
4. ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   อาคาร 5 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
6. ที่ทำงานปัจจุบัน
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   อาคาร 5 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
   โทรศัพท์: 08 3014 0123
   Email: Littleblue_mt@hotmail.com
7. ประวัติการศึกษา:
   วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ 2547-2551
8. ประวัติการทำงาน:
   นักเทคนิคการแพทย์ แผนกห้องปฏิบัติการ
   โรงพยาบาลยันฮี 2551 – 2559
   นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี 2560 – ปัจจุบัน
9. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - Molecular biology
10. ประวัติการอบรมเกี่ยวกับจริยธรรมการวิจัย และ/หรือ ICH-GCP (พร้อมแนบ Certificate)

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย): นางสาวเกษศินี แสงสว่าง
2. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ): Miss KADSINEE SAENGSAWANG
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 1529900546788
4. ตำแหน่งปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   อาคาร 5 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
6. ที่ทำงานปัจจุบัน
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดชลบุรี กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   อาคาร 5 ถนนพระยาสัจจา ตำบลบ้านสวน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20000
   โทรศัพท์: 087-5687125
   Email: Kadsinee_s@hotmail.com
7. ประวัติการศึกษา:
   วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยพะเยา 2554-2559
8. ประวัติการทำงาน:
   นักเทคนิคการแพทย์ แผนกห้องปฏิบัติการ
   โรงพยาบาลเอกชล 2560 – 2561
   นักเทคนิคการแพทย์ปฏิบัติการ กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค
   สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 ชลบุรี 2561– ปัจจุบัน
9. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   -TB Culture/DST
10. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
    -