การจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) เบื้องต้นบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร Para-nitro benzoic acid (PNB)

สุมล เจริญสินถาวร วท.บ.
ทิพประภา อมราสกุลทรัพย์ วท.บ.
อมราภรณ์ สิงใส วท.บ.

กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ
กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

การจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis complex*; MTBC) จากตัวอย่างเพาะเชื้อมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทดสอบความไวต่อยา หากมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น จะทำให้การทดสอบความไวต่อยาผิดพลาด ส่งผลโดยตรงต่อการรักษาผู้ป่วยวัณโรค โดยการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ MTBC กับเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น (Nontuberculous mycobacteria; NTM) จากตัวอย่างเพาะเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen (LJ) ที่ผสมสาร Para-nitro benzoic acid (PNB)

การศึกษานี้มีกลุ่มตัวอย่าง 480 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เพาะในอาหารเหลวด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ตัวอย่างถูกนำมาเพาะในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ ที่มีส่วนผสมของสาร PNB 500 µg/ml เพื่อจำแนกเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ผลพบเป็นเชื้อ MTBC จำนวน 458 ตัวอย่าง และเชื้อ NTM จำนวน 22 ตัวอย่าง โดยวิธีการจำแนกด้วย PNB มีค่าความไว (Sensitivity) เท่ากับร้อยละ 98.91, ค่าความจำเพาะ (Specificity) เท่ากับร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์ผลบวก (Positive predictive value) เท่ากับร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์ผลลบ (Negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 81.48 และค่าความถูกต้องแม่นยำ (Accuracy) เท่ากับร้อยละ 98.96

วิธีการจำแนกด้วย PNB มีค่าความถูกต้องสูง ทำได้ง่าย สามารถทำไปพร้อมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงเหมาะสำหรับใช้จำแนกเชื้อเบื้องต้นระหว่างเชื้อ MTBC กับเชื้อ NTM ในห้องปฏิบัติการวัณโรค

บทนำ

วัณโรคยังเป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญของประเทศไทย องค์การอนามัยโลกได้จัดทำยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (End TB strategy) โดยกำหนดเป้าหมายของยุทธศาสตร์ยุติวัณโรคไว้ในปี พ.ศ. 2578 โดย 1.) ลดอุบัติการณ์วัณโรคให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากรและ 2.)ลดจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตลงร้อยละ 95 เทียบกับปี พ.ศ.2558 สำหรับประเทศไทยได้จัดทำแผนปฏิบัติ การระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560 – 2564 เพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค โดยวิสัยทัศน์ของแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค คือ “ ประเทศไทยปลอดจากวัณโรค ” โดยลดอัตราอุบัติการณ์ลงเหลือ 88 /ประชากร 100,000 คน ภายใน ปี พ.ศ. 2564[1]

การรักษาโรควัณโรคผลทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory) เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งเพราะต้องใช้เป็นแนวทางในการรักษา การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคนั้นการทำให้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยโรคและการทดสอบความไวต่อยาเพราะหากมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ (Mix) ก็จะทำ

ให้การทดสอบความไวต่อยาผิดพลาดไปด้วย ทำให้ผู้ป่วยเสียโอกาสในการรักษาที่ถูกต้อง การแพร่กระจายก็สูงขึ้น ก็จะทำให้ปัญหาวัณโรคนั้นไม่มีวันยุติ เมื่อเทำการเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นแล้ว ขั้นตอนต่อไปก็คือการทดสอบความไวต่อยา โดยเชื้อวัณโรคที่ได้จะต้องปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ เช่น Non-tuberculous mycobacteria (NTM) เพราะการแปลผลการทดสอบความไวต่อยานั้นต้องแม่นยำ ถูกต้อง เพื่อผลประโยชน์ของผู้ป่วยที่ต้องได้รับการรักษาที่ถูกต้อง และจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับผู้ป่วยที่มีการดื้อยาในการรักษาวัณโรค เพราะเมื่อทำการรับประทานยารักษาวัณโรคไปนานๆก็มักจะมีเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆ เข้ามาปนเปื้อน อีกทั้งหากผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (ผู้ติดเชื้อ HIV) ก็มักจะมีเชื้ออื่นๆที่ฉวยโอกาสเข้ามาปนเปื้อนเช่นกัน เช่น Non-tuberculous mycobacteria (NTM) ได้แก่ เชื้อ *M.avium* ดังนั้นการได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์นั้นจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสาร Para-nitro benzoic acid (PNB) สามารจำแนกเชื้อวัณโรคออกมาจาก NTM ได้ดี เพราะสามารถ เห็นลักษณะโคโลนีได้ชัดเจน ค่อนข้างแม่นยำ และราคาถูก ขั้นตอนการเตรียมค่อนข้างง่าย เก็บไว้ได้นาน จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมในการเตรียมอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อไว้สำหรับใช้เอง และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารPNB ยังสามารถจัดส่งให้กับห้องปฏิบัตการในเครือข่าย ได้แก่ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคเขตที่ 1-12 ที่ต้องการจำแนกเชื้อวัณโรคเบื้องต้นก่อนส่งมาทดสอบความไวต่อยาที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดสอบ

การทดสอบความไวต่อยา หากเกิดปัญหาทดสอบความไวต่อยาที่ซับซ้อนก็สามารถส่งต่อมาที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติได้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการตัดสินใจทดสอบความไวต่อยา กลุ่มยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (first line drug susceptibility FL-DST) และผลทดสอบความไวต่อยาของกลุ่มยารักษาวัณโรคแนวที่ 2 (second line drug susceptibility SLD-DST) เพิ่มเติม เพื่อครอบคลุมการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค (Universal DST)[2] หรือแพทย์ต้องการยารายตัว หรือในกรณีที่ผู้ป่วยมีผลการทดสอบความไว ผลการทดสอบความไวต่อยาไม่ตรงกันระหว่างฟีโนไทป์ (Phenotype) และจีโนไทป์ (Genotype) เป็นต้น เพื่อเป็นการเฝ้าระวังวัณโรคและเตรียมความพร้อมเพื่อรองรับภาวะฉุกเฉินจากวัณโรคได้แก่ วัณโรคดื้อยา MDR และ XDR ในการทดสอบความไวต่อยานั้นเชื้อวัณโรคดื้อยา จะต้องเป็นการดื้อต่อยาของเชื้อวัณโรคจริงๆ ไม่ใช่เป็นการปนเปื้อนของเชื้อ NTM เพราะจะทำให้การทดสอบความไวต่อยาผิดพลาด ทำให้แพทย์วินิจฉัยได้ไม่ถูกต้อง ผู้ป่วยเสียโอกาสในการรักษา ทำให้การแพร่กระจายของวัณโรคและวัณโรคดื้อยาสูงขึ้นทั้งนี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการวินิจฉัยและเป็นประโยชน์สูงสุดต่อผู้ป่วย
วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัย เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อกลุ่ม MTBC ออกจากการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม NTM ให้ได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) ก่อนทำการทดสอบความไวต่อยา และแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร PNB สถานที่ศึกษาวิจัย กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ กองวัณโรค กรุงเทพมหานคร และระยะเวลาศึกษาวิจัยวันที่ 1 มิถุนายน – 1 กันยายน 2564

วัสดุและวิธีการศึกษา

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจากหลอด MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) มักพบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ค่อนข้างสูง ทำให้ไม่สามารถแปลผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงได้ และยังไม่สามารถทำการทดสอบความไวต่อยาได้อีกด้วย การขจัดการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ Non-tuberculous mycobacteria (NTM) จึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อให้สามารถจำแนกเชื้อกลุ่มวัณ

โรค *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ให้ได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) ที่แท้จริงออกมาจากกลุ่มเชื้อปนเปื้อนกลุ่มอื่นๆ ก่อนทำการทดสอบความไวต่อยา จึงทำให้เกิดแนวทางคิดวิจัย เรื่อง การจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรค โดยเน้นถึงความถูกต้องแม่นยำ จึงได้เลือกใช้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร Para-nitro benzoic acid (PNB) เนื่องจากทางกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติมีศักยภาพในการเตรียมเองได้ อีกทั้งยังสามารถส่งไปสนับสนุนให้กับเครือข่ายได้ โดยหากมีการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม NTM จะพบการเจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB แต่หากเป็น เชื้อกลุ่ม MTBC จะไม่พบการเจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB และอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร PNB นั้นมีราคาถูก การเตรียมงาน เก็บไว้ได้นาน และถูกต้อง แม่นยำในการแยกเชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) เนื่องสามารถเห็นโคโลนีได้ชัดเจนกว่าการทดสอบอื่นๆ หากมีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นๆ (Mix) ที่ปะปนเข้ามา

กลุ่มตัวอย่างที่นำมาทดสอบ คือกลุ่มตัวอย่างที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ที่ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก (Positive) จำนวน 480 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ถูกนำมาศึกษาเป็นตัวอย่างของหลอดอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ MGIT positive ที่มีเชื้อเจริญเติบโตแล้วพบว่า เป็นเชื้อกลุ่ม MTBC จำนวน 458 ตัวอย่าง และเป็นเชื้อกลุ่ม NTM จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 480 ตัวอย่าง โดยมีตัวแปรอิสระ คือ การใช้อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร Para - nitro benzoic acid (PNB) ในการจำแนกกลุ่มชนิดของเชื้อ และตัวแปรตาม คือ การจำแนกชนิดของกลุ่มเชื้อ MTBC กับ NTM ออกจากกันเพื่อให้ได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) การทดสอบครั้งนี้ได้นำความรู้เกี่ยวกับสถิติเชิงบรรยาย แจกแจงความถี่ที่พบ มาใช้ในการวิเคราะห์และวิจัยผลการทดสอบ[3]

การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นหากมีเชื้อวัณโรค 1-10 เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่หลังจากการกำจัดเชื้อปนเปื้อน[4-5] โดยการเพาะเลี้ยงวัณโรคในปัจจุบันมี 2 วิธี คือ

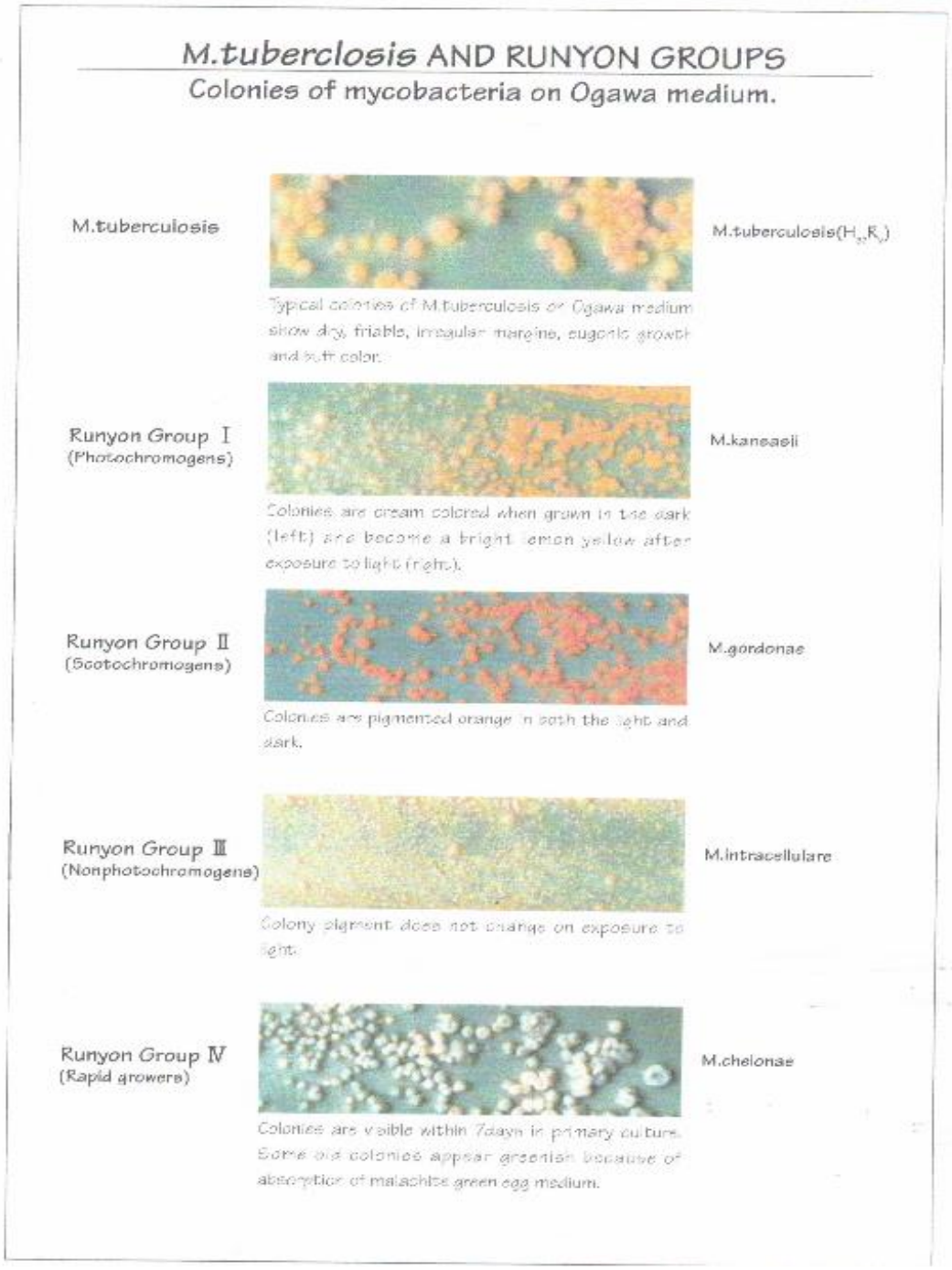
1. การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง (Solid media) แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ อาหารไข่ (Egg-based media) ได้แก่ Lowenstein-Jensen media และ Ogawa media และอาหารวุ้น (Agar-based media) ที่นิยมใช้ ได้แก่ Middlebrook 7H9 และ Middlebrook 7H11 การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (solid culture) จะใช้เวลาบ่มเพาะเชื้อนาน 8 สัปดาห์ โดยปกติเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่จะเจริญในช่วงสัปดาห์ที่ 3 ถึง 4 ซึ่งถือว่าใช้เวลานานเนื่องจาก เชื้อใช้เวลาแบ่งตัว (generation time) นานประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว (Liquid media) เช่น การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ซึ่งใช้เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคแบบอัตโนมัติที่สามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส และสามารถอ่านค่าการเจริญเติบโตของเชื้อได้ โดยมีหลักการคือ เชื้อที่เจริญเติบโตจะมีการดึงออกซิเจนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ middle brook 7H9 liquid media ที่อยู่ในหลอด MGIT tube และเมื่อใช้ออกซิเจนในส่วนนี้หมด เชื้อจะดึงออกซิเจนที่จับอยู่กับสารเรืองแสง (oxygen-quenched fluorochrome) ที่อยู่ก้นหลอดและฝังอยู่ในซิลิโคน (tris 4,7-diphenonthroline ruthenium chloride pentahydrate, embedded in silicon) ออกซิเจนที่จับกับสารเรืองแสงถูกดึงไปใช้จะทำให้สารเรืองแสงเป็นอิสระ สามารถเรืองแสงได้เครื่องจะทำการตรวจวัดสารเรืองแสงทุกๆ 10 นาที และแปลงค่าการเรืองแสงออกมาในรูปการเจริญของเชื้อเป็น GU (growth unit) มีสัญญาณแสดงการเจริญของเชื้อเครื่องจะแสดงไฟสัญลักษณ์ (+ สีแดง) ให้

นำมาย้อม AFB โดยวิธี ZN ให้ผล AFB เป็น negative คือ มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ให้ผล AFB เป็น positive คือ เชื้อมีการเจริญทั้งกลุ่มวัณโรค (MTBC) และเชื้อกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย (NTM) แต่ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อใดๆ เครื่องจะแสดงไฟสัญลักษณ์ (– สีเขียว) บนหน้าจอเครื่องเมื่อครบกำหนด 42 วัน[6]

การอ่านผลจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ให้อ่านผลทุกวันของวันทำการเมื่อเครื่องแสดงผลไฟสัญลักษณ์ (+ สีแดง) ให้ Scan MGIT tube ออกมาจากเครื่อง หลังจากนำออกจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ให้นำอาหารเหลวจากหลอด MGIT tube มาย้อมหาเชื้อ AFB โดยวิธี ZN ในกรณีที่ย้อมแล้วไม่พบเชื้อใด ๆ ให้นำ MGIT tube นั้น scan กลับมาเข้าเครื่องได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 5 ชั่วโมง เครื่องก็จะดำเนินการบ่มเชื้อต่อไปได้

รูปที่ 1.[7] แสดงลักษณะเชื้อ *M. tuberculosis* และ NTM บน 2% Ogawa medium



ขั้นตอนการศึกษา

การเพาะเชื้อจาก liquid medium โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ พบว่าเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงขึ้นจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ มีค่าความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5-10^6 CFU/ml [8] (หรือเทียบเท่ากับ McFarland No. 1) ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบในการจำแนกชนิดของเชื้อระหว่าง MTBC กับ NTM จึงได้ทำการทดสอบโดยการนำเชื้อที่เพาะขึ้นแล้วจากจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ มาทดสอบบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen media (LJ) ที่ผสมสาร Para-nitro benzoic acid (PNB) 500 µg/ml เพื่อใช้ในการจำแนกเชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) ก่อนนำไปทดสอบการความไวต่อยารายตัวและในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี Immunochromatography(ICA)เพิ่มเติมเพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผลการทดสอบอีกด้วย

ขั้นตอนการดำเนินการ

เพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเหลว (MGIT) ในเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Modified 2%NaOH – NALC เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ที่องค์การอนามัยโลกยอมรับ โดยการกำจัดเชื้อปนเปื้อนมีกระบวนการดังต่อไปนี้

1. ถ่ายสิ่งส่งตรวจ (เสมหะ) ลงใน Centrifuge tube 50 ml เทสารละลาย 2% NaOH – NALC เป็นอัตราส่วน 1:1 หรือ 1:2
2. ผสมให้เข้ากัน (mix บน vortex) ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 15-20 นาที

เติมสารละลาย phosphate buffer (pH 6.8) จนถึงปริมาตร 45 ml โดยปั่นที่เครื่อง Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยแรงปั่น 3000 g เป็นเวลา 20 นาที

3. เทส่วนใสทิ้งแล้วจึงนำตะกอน (treated specimen) ที่ได้มาใส่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ MGIT ปริมาตร 500 µl จำนวน 1 หลอด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อนี้ไปบ่มที่เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ อุณหภูมิที่ 36 ± 1 องศาเซลเซียส
4. เชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ที่ให้ผลบวกและยืนยันผลการทดสอบแล้วว่าเป็นเชื้อ MTBC กับ NTM ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ค่าความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5-10^6 CFU/ml (เทียบเท่ากับ McFarland No. 1)

การจำแนกเชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Immunochromatography (ICA)

1. เชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ (Liquid Culture)
2. ดูดสารละลายหยดลงในหลุมใส่ตัวอย่างของชุดทดสอบประมาณ 100 µl อ่านผลภายใน 15 นาที

การแปลผล - Negative มีแถบสีชมพู แดง จนถึงแดงม่วง เกิดขึ้น 1 แถบ ที่แถบ control (ตรงอักษร C)

- Positive มีแถบสีชมพู แดง จนถึงแดงม่วง เกิดขึ้น 2 แถบ ที่ แถบ test (ตรงอักษร T) และแถบ control (ตรงอักษร C)

- Invalid มีแถบสีชมพู แดง จนถึงแดงม่วง เกิดขึ้น 1 แถบ ที่แถบ test (ตรงอักษร T) หรือไม่มีแถบใดๆเกิดขึ้นเลย ซึ่งถือว่าไม่สามารถแปลผลได้ ต้องทำการทดสอบใหม่

การจำแนกกลุ่มเชื้อโดยใช้อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อหยอดบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมสาร

Para-nitro benzoic acid (PNB) 500 µg/ml

1. เชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อขึ้นจากเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ มีค่าความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5-10^6 CFU/ml เชื้อที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตราฐาน (Gold standard) ระหว่างกลุ่มเชื้อ MTBC กับ NTM

2. นำมาหยอดบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม) และอาหารแข็งที่มีส่วนผสม PNB 500 µg/ml (หลอดทดสอบ) ปริมาตร หลอดละ 100 µl

3. อ่านผลการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม) พบการเจริญของเชื้อ แต่อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสม PNB (หลอดทดสอบ) ไม่พบการเจริญของเชื้อ (+/-) รายงานว่าเป็นกลุ่มเชื้อ MTBC แต่หากมีการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่ม NTM จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม) และอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสม PNB (หลอดทดสอบ) (+/+)

การแปลผล

ตารางที่ 1 การแปลผลการเจริญของเชื้อกลุ่ม MTBC และ NTM บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม) / PNB (หลอดทดสอบ)

กลุ่มเชื้อ	LJ / PNB
MTBC (TB)	Positive / Negative (+/-)
NTM (Non-TB)	Positive / Positive (+/+)

หมายเหตุ

Positive (+) คือ พบเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ หรือ PNB

Negative (-) คือ ไม่พบเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ หรือ PNB

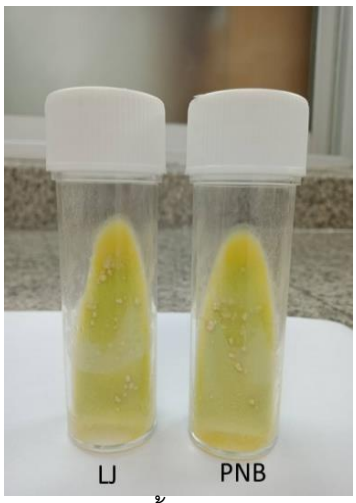
จากตารางที่ 1 การแปลผลการทดสอบจำแนกเชื้อปนเปื้อนของกลุ่มเชื้อ NTM ออกจากกลุ่มเชื้อ MTBC นั้นจำเป็นจะต้องมีหลอดควบคุม (Control) อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ ในการทดสอบทุกตัวอย่าง เนื่องจากอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB ต้องทำการแปลผลการทดสอบควบคู่กับอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ เสมอ เพราะต้องแปลผลด้วยการดูลักษณะทางกายภาพ ลักษณะโคโลนี, สีโคโลนี ของเชื้อที่เจริญเติบโต ไม่สามารถแปลผลจากอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB ได้เพียงอย่างเดียว

การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control : IQC) โดยการทำการทดสอบด้วย Distill water (DW) และ H37RV ในทุกรอบที่มีการเปลี่ยน Lot ของอาหารเลี้ยงเชื้อหรืออย่างน้อย 1 ครั้งต่อ 1 เดือน (ห้องปฏิบัติการ กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ ได้รับการรับรองความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ด้านห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ISO 15189 และ ISO 15190[9] ตัวอย่างทดสอบ Sputum, Extra pulmonary รายการทดสอบ Phenotypic culture and Identification using solid media วิธีทดสอบ Liquid Culture

รูปที่ 2[10] การแปลผลการจำแนกของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมสาร Para-nitro benzoic acid (PNB) 500 µg/ml

กลุ่มเชื้อ MTBC

- พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม)
  ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสม PNB (หลอดทดสอบ)



กลุ่มเชื้อ NTM

กลุ่มเชื้อ NTM

- พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม)
  พบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสม PNB (หลอดทดสอบ)

ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (Liquid Culture) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) เครื่องแสดงผลบวก จำนวน 480 ตัวอย่าง โดยจำแนกเป็นเชื้อกลุ่ม MTBC จำนวน 458 ตัวอย่าง และเชื้อกลุ่ม NTM จำนวน 22 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาทดสอบด้วยวิธี Immunochromatography (ICA) และทำการทดสอบด้วยวิธีอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ (หลอดควบคุม) และอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB 500 µg/ml (หลอดทดสอบ) ได้ผลการศึกษา ดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงผลการจำแนกของกลุ่มเชื้อ MTBC และ NTM ด้วยวิธีทดสอบ ICA และยืนยันผลการทดสอบของกลุ่มเชื้อ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard)

ผลการทดสอบ ด้วยวิธี Immunochromatography (ICA)	วิธีการทดสอบ	การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว (Liquid Culture)		
		MTBC (TB)	NTM (Non-TB)	รวม
	ICA+	446	0	446
	ICA-	12	22	34
	รวม	458	22	480

จากตารางที่ 2 จำแนกชนิดของเชื้อได้ค่าผลบวกจริง (true positive) เท่ากับ 446, ค่าผลลบจริง (true negative) เท่ากับ 22, ค่าผลบวกปลอม (false positive) เท่ากับ 0 และค่าผลลบปลอม (false negative) เท่ากับ 12 จากค่าเหล่านี้สามารถคำนวณหาค่าต่างๆ ที่ใช้ประเมินการจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรคด้วยการทดสอบ ICA ได้ดังนี้

ความไว (sensitivity) $= \frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง + ผลลบปลอม}} \times 100\ \% = 97.38\ \%$

ความจำเพาะ (specificity) $= \frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง + ผลบวกปลอม}} \times 100\ \% = 100\%$

ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) $= \frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง + ผลบวกปลอม}} \times 100\ \%$

$= 100\ \%$

ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) $= \frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง + ผลลบปลอม}} \times 100\ \%$

$= 64.71\ \%$

ความถูกต้อง แม่นยำ (accuracy) $= \frac{\text{ผลบวกจริง + ผลลบจริง}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100\ \%$

$= 97.50\ \%$

ตารางที่ 3 แสดงผลการจำแนกของกลุ่มเชื้อ MTBC และ NTM เชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร PNB และยืนยันผลการทดสอบของกลุ่มเชื้อ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard)

ผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB	วิธีการทดสอบ	การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลว (Liquid Culture)		
		MTBC (TB)	NTM (Non-TB)	รวม
	LJ + / PNB -	453	0	453
	LJ + / PNB +	5	22	27
	รวม	458	22	480

จากตารางที่ 3 จำแนกชนิดของเชื้อได้ค่าผลบวกจริง (true positive) เท่ากับ 453, ค่าผลลบจริง (true negative) เท่ากับ 22, ค่าผลบวกปลอม (false positive) เท่ากับ 0 และค่าผลลบปลอม (false negative) เท่ากับ 5 จากค่าเหล่านี้สามารถคำนวณหาค่าต่างๆ ที่ใช้ประเมินการจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรคด้วยอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB ได้ดังนี้

ความไว (sensitivity) = $\frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง + ผลลบปลอม}} \times 100\ \% = 98.91\ \%$

ความจำเพาะ (specificity) = $\frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง + ผลบวกปลอม}} \times 100\ \% = 100\%$

ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) = $\frac{\text{ผลบวกจริง}}{\text{ผลบวกจริง + ผลบวกปลอม}} \times 100\ \%$

= 100 %

ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) = $\frac{\text{ผลลบจริง}}{\text{ผลลบจริง + ผลลบปลอม}} \times 100\ \%$

= 81.48 %

ความถูกต้อง แม่นยำ (accuracy) = $\frac{\text{ผลบวกจริง + ผลลบจริง}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100\ \%$

= 98.96 %

วิจารณ์

การจำแนกเชื้อกลุ่มวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ให้ได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) ที่แท้จริงออกมาจากกลุ่มเชื้อปนเปื้อนกลุ่มอื่นๆ NTM ก่อนทำการทดสอบความไวต่อยาด้วยอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB ยังมีข้อจำกัดในการทดสอบที่ต้องทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของเชื้อ McFarland. No.1 (เท่ากับ 10^5-10^6 CFU/ml) ทำให้ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนทำการ

ทดสอบ อีกทั้งจะต้องมีหลอดมีหลอดควบคุม (Control) อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ ในการทดสอบทุกตัวอย่าง เนื่องจากอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB ต้องทำการแปลผลการทดสอบควบคู่กับอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ LJ เสมอ เพราะต้องแปลผลประกอบการดูลักษณะทางกายภาพ ลักษณะโคโลนี, สีโคโลนีของเชื้อที่เจริญเติบโต ไม่สามารถแปลผลจากอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB ได้เพียงอย่างเดียว แต่ถ้าเปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยวิธี Immunochromatography(ICA) กับอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB แล้ว ค่าความจำเพาะของอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB นั้นดีกว่า และค่าพยากรณ์ผลลบ ICA เท่ากับร้อยละ 64.71 ค่อนข้างต่ำ แต่ค่าพยากรณ์ผลลบของอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ PNB เท่ากับร้อยละ 81.48 ซึ่งถือได้ว่ามีค่าความผิดพลาดค่อนข้างน้อย

การจำแนกเชื้อกลุ่ม MTBC ให้ได้เชื้อวัณโรคบริสุทธิ์ (Pure TB) ที่แท้จริงออกมาจากกลุ่มเชื้อปนเปื้อนกลุ่มอื่นๆ NTM ก่อนทำการทดสอบความไวต่อยา ด้วยอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB มีความแม่นยำสูงถึงร้อยละ 98.96 ค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100 หากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อกลุ่มอื่นๆ เช่น NTM ก็ทำให้สามารถสังเกตุเห็นลักษณะโคโลนีได้ทันที ทำให้สามารถนำเชื้อไปขจัดสิ่งปนเปื้อนแล้วทำการจำแนกเชื้อโดยการทำ Isolation เชื้อต่อไปเหมาะสมแก่การทำก่อนที่จะนำไปทดสอบความไวต่อยา เพื่อให้สามารถทดสอบความไวต่อยาได้ทุกราย และรายงานผลให้กับแพทย์ได้ เพื่อทำการวินิจฉัยให้กับผู้ป่วยได้ทุกราย เพื่อลดการแพร่กระจายของวัณโรคและวัณโรคดื้อยา และเพื่อเป็นไปตามตัวชี้วัดเชิงคุณภาพของระบบห้องปฏิบัติการด้านเทคนิค และเป้าหมายผลสัมฤทธิ์ของงานทดสอบความไวต่อยาต่อไป

สรุป

ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *M. tuberculosis* complex (MTBC) และ Non-tuberculous mycobacteria (NTM) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ เครื่องแสดงผลบวก จำนวน 480 ตัวอย่าง และยืนยันผลการทดสอบของกลุ่มเชื้อ MTBC จำนวน 458 ตัวอย่าง และ NTM จำนวน 22 ตัวอย่าง แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี Immunochromatography (ICA) พบว่ามีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 97.38, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) เท่ากับร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 64.71 และค่าความถูกต้องแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 97.50 เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อวิธีมาตราฐาน (Gold standard) แต่เกิดผลลบปลอมแต่ไม่พบการเกิดผลบวกปลอม ในการทดสอบพบผลลบปลอมที่เกิดขึ้นน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อมีการกลายพันธุ์ของยีน mpt64 ที่สร้างโปรตีน MPT64 ซึ่งมักเกิดกับตัวอย่างที่ดื้อยาวัณโรค แต่ไม่พบการเกิดผลบวกปลอมอาจเนื่องมาจากการจำแนกเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างของ NTM ค่อนข้างน้อย จึงทำให้ไม่พบผลปลอมแม้แต่รายเดียว

จากการศึกษาด้วยอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร PNB 500 µg/ml กับกลุ่มเชื้อที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960™ เครื่องแสดงผลบวก จำนวน 480 ตัวอย่าง โดยเป็นกลุ่มเชื้อ MTBC จำนวน 458 ตัวอย่าง และกลุ่มเชื้อ NTM จำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่าในกลุ่มเชื้อ MTBC และกลุ่มเชื้อ NTM การทดสอบพบการเกิดผลลบปลอมแต่ไม่พบการเกิดผลบวกปลอมเช่นกัน มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 98.91, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ

100, ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) เท่ากับร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 81.48 และค่าความถูกต้อง แม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 98.96 ด้วยค่าความถูกต้อง แม่นยำ มีประสิทธิภาพที่สูงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อวิธีมาตราฐาน (Gold standard) วิธีการตรวจที่ง่าย เพราะสามารถทำไปพร้อมๆกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการชันสูตรวัณโรคที่จะนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มเชื้อ MTBC ก่อนทำการทดสอบความไวต่อยาเพราะค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 98.91, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100 เพราะค่าความถูกต้องแม่นยำสูงถึงร้อยละ 98.96 แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดสอบนี้มีผลลบปลอมเกิดขึ้นซึ่งน่าจะเกิดจากการหยดเชื้อที่มีค่าความเข้มข้นสูงเกินไป(Over inoculum) หรือเกิดการจากการปนเปื้อนระหว่างการทำการทดสอบ (คน, อุปกรณ์และสิ่งแวดล้อม) หรือมีการผสม (Mix) ของกลุ่มเชื้อ MTBC กับ NTM

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้อำนวยการกองวัณโรค พญ.ผลิน กมลวัทน์ ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในการดำเนินงานให้ประสบผลสำเร็จ ขอขอบพระคุณอาจารย์ดร.พงษ์วิทย์ บัวล้อมใบ ที่ให้คำแนะนำ ปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ด้วยความเอาใจใส่อย่างดี และขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงาน, เจ้าหน้าที่ทุกท่านของกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจ ให้ความความสะดวกในการค้นคว้าหาข้อมูล และการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ จึงขอขอบคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย คุณค่าทั้งหลายที่ได้รับจากรายงานการศึกษานี้ ผู้เขียนขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทีแด่บิดามารดาและบูรพาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอนรวมทั้งผู้มีพระคุณทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค สำนักวัณโรค. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ.2561:National tuberculosis control programme guideline, Thailand, 2018. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2561.

2. World Health Organization. GLI Practical Guide to TB Laboratory Strengthening 2017.

3. กรมควบคุมโรค สำนักโรคติดต่อนำโดยแมลง. คู่มือเบื้องต้น สำหรับนักวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุข: กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2558.

4. กรมควบคุมโรค กองวัณโรค. แนวทางบริหารจัดการและการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการด้านวัณโรค: Management and practice guideline for tuberculosis laboratory . กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2562.

5. กรมควบคุมโรค กองวัณโรค. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ.2564: National tuberculosis control programme guideline Thailand 2021. กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2564.

6. Salman H. Siddiqi. and Sabine Rusch-Gerdes. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT), FIND. July 2006

7. Fujiki A. TB bacteriology examination to stop TB.RIT Japan, 2005.

8. World Health Organization. GLI Mycobacteriology Laboratory Manual, First Edition, April 2014

9. กรมควบคุมโรค สำนักวัณโรค.แผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560-2564. 2017.
10. กรมควบคุมโรค กองวัณโรค. กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ.2564