# การประยุกต์ใช้ TB FastAmp ในการค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบ ระหว่างปี 2556-2560 : ผลจากห้องปฏิบัติการชันสูตรสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี

จันทร์ฉาย คำแสน วทม.*, สมชาย ภานุมาศวิวัฒน์ พบ.**, บรรณศาสตร์ ไชยพรรณนา วทบ.**, วิษณุ แก้วศรี วทบ.***, วิภาวดี เจียรกุล วทบ.*

* ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000

** โรงพยาบาลราษีไศล อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ 33160

*** โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชเดชอุดม อำเภอเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี 34160

# Abstract: Modified TB Fast Amp to Finding Negative Acid Fast Stain in Tuberculosis' Patient during 2013-2017: Reports of Pathological Laboratory of Regional Medical Science Center 10th Ubon Ratchathani

Khamsaen J, Panumaswiwat S, Chaipanna B, Khewsri W, Jearakul W

* Regional Medical Science Center 10th Ubonratchathani, Mueang Ubon Ratchathani, Ubon Ratchathani, 34000

** Rasisalai Hospital, Rasi Salai, Si Saket, 33160

*** Detudom Crown's Prince Hospital, Det Udom, Ubon Ratchathani, 34160

(E-mail: junchay.k@dmsc.mail.go.th)

Tuberculosis is an infectious disease that continues to be a public health problem in many countries around the world. In 2015, it is the second leading cause of death in the world. 1.8 million people died from the disease and 10.4 million have been infected. The improvement in patient monitoring and patient screening, as well as patients with smear-negative tuberculosis is important. By 2014, the World Health Organization reports that only 63 per cent (6 million) of the 9.6 million people were detected. It means that 37 per cent of all tuberculosis patients are unlikely to be detectable. The aim of this study was to identify smear-negative tuberculosis patients with using TB Fast Amp. 385 patients were reported from Public Health Laboratory of Medical Science Center 10 Ubon Ratchathani during 2013 to 2017. The positive results were 59 cases, 15.32%. Negative results were 326 cases, 84.68% 5-years old minimum, 91-years old maximum, 204 males, 52.99%, 181 females, 47.01%. There were 25 home-related patients, 17.24% and 120 no home-sickness, 82.76%. 35.8 cases had previous tuberculosis treatment, 24.82%. 106 cases had no previous tuberculosis treatment, 75.18%. The results from the TB FastAmp study could help to find out negative-smear tuberculosis patients 15.32%. Then this molecular technique should be used for the detection of tuberculosis in clinical trials, especially in countries with limited resources.

**Keyword:** Tuberculosis, Negative acid fast stain, TB FastAmp



## บทคัดย่อ

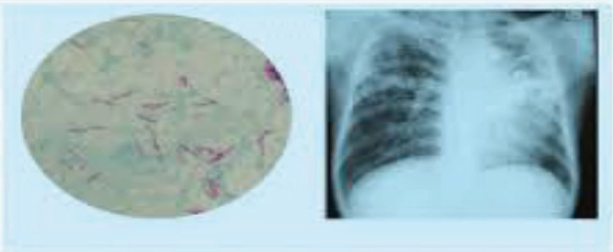
วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดเชื้อที่ยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของหลายประเทศทั่วโลก เป็นสาเหตุการตายอันดับสองของโลก ในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ 1.8 ล้านคน และมีผู้ป่วยจำนวน 10.4 ล้านคน ดังนั้นในการดูแลและควบคุมวัณโรค รวมถึงการปรับปรุงการตรวจสอบผู้ป่วยและการตรวจหาผู้ป่วยรวมทั้งผู้ป่วยที่มีเชื้อวัณโรคแต่ให้ผล smear-negative จึงมีความสำคัญ ในปี พ.ศ. 2557 องค์การอนามัยโลกรายงานว่ามีเพียง ร้อยละ 63 (6 ล้านคน) จาก 9.6 ล้านคน ซึ่งหมายความว่าทั่วโลก ร้อยละ 37 ของจำนวนผู้ป่วยวัณโรคที่คาดว่าจะไม่สามารถตรวจพบได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล TB Fast Amp รายงานจากห้องปฏิบัติการชันสูตรสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ระหว่าง พ.ศ. 2556 ถึง พ.ศ. 2560 จำนวน 385 ราย ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่าให้ผลบวก จำนวน 59 ราย ร้อยละ 15.32 อายุต่ำสุด 5 ปี สูงสุด 91 ปี เป็นชาย จำนวน 204 ราย ร้อยละ 52.99 เป็นหญิง จำนวน 181 ราย ร้อยละ 47.01 มีผู้ป่วยร่วมบ้าน จำนวน 25 ราย ร้อยละ 17.24 ไม่มีผู้ป่วยร่วมบ้าน จำนวน 120 ราย ร้อยละ 82.76 เคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน จำนวน 35 ราย ร้อยละ 24.82 ไม่เคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน จำนวน 106 ราย ร้อยละ 75.18 สรุปผลจากการศึกษา เทคนิค TB FastAmp สามารถช่วยค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 15.32 ดังนั้นน่าจะเป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาที่จะเข้ามามีบทบาทและใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับการตรวจสอบเชื้อวัณโรคในตัวอย่างทางคลินิก แบบรู้ผลเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด

**คำสำคัญ:** วัณโรค สเมียร์ลบ, TB FastAmp

## บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis-TB) เกิดจากเชื้อวัณโรค ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียรูปแท่ง (bacilli) ที่มีการเจริญเติบโตหรือการแบ่งตัวช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไปชนิดอื่นๆ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้มีชื่อว่า "ไมโครแบคทีเรีย" ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดวัณโรคได้ แต่สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยและก่อปัญหามากที่สุดในมนุษย์คือ เชื้อ "ไมโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส" (Mycobacterium tuberculosis) หรือบางครั้งเรียกว่า "เชื้อเอเอฟบี" (Acid fast bacilli : AFB) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ทนกรดได้ อาการของวัณโรคจะแบ่งออกเป็น 2 ระยะใหญ่ๆ ได้แก่ วัณโรคระยะแฝง (Latent TB) คือระยะที่เมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อแล้วแต่ยังไม่มีอาการแสดงใดๆ เนื่องจากเชื้อยังไม่ได้รับการกระตุ้น แต่เชื้อก็ยังคงอยู่ในร่างกายและสามารถก่อให้เกิดอาการจนเข้าสู่ระยะแสดงอาการได้ วัณโรคระยะแสดงอาการ (Active TB) คือ ระยะที่เชื้อวัณโรคได้รับการกระตุ้นจนแสดงอาการออกมาส่วนใหญ่

แสดงที่ปอด ซึ่งเรียกว่า “วัณโรคปอด” อาการแสดงที่สำคัญคือ อาการไข้และไอเรื้อรังเป็นเวลานาน เริ่มแรกมีอาการคล้ายไข้หวัด หรือหลอดลมอักเสบ ระยะแรกไอแห้งๆ ต่อมาไอมีเสมหะเป็นสีเหลืองหรือเขียว อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เหงื่อออกในเวลากลางคืน (Night sweats) น้ำหนักตัวลดอย่างรวดเร็ว อาจมีอาการไอเป็นเลือด ในรายมี่มีอาการหอบเหนื่อยมานานอาจมีอาการนิ้วบุ้ม (Clubbing of fingers) บางรายที่ไม่แสดงอาการมักจะตรวจพบโดยบังเอิญจากการเห็นจุดในปอดจากภาพถ่ายเอ็กซเรย์[1]



ที่มา ttps://sites.google.com/site/tbknowledge/what-is-tuberculosis/what-tb-is

**ภาพที่ 1** เชื้อวัณโรคและภาพเอกซเรย์ปอด

วัณโรคจัดว่าเป็นโรคติดต่อที่พบได้บ่อยชนิดหนึ่ง ติดต่อโดยการสูดหายใจเอาเชื้อเข้าไปในปอด พบได้มากในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยเอดส์ ผู้ที่มีภูมิต้านทานโรคต่ำ และมักพบในผู้ที่มีฐานะยากจนหรืออยู่กันอย่างแออัด วัณโรคถือเป็น 1 ใน 10 สาเหตุการเสียชีวิตของคนทั่วโลก โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้เปิดเผยสถิติล่าสุดในปี พ.ศ. 2558 ว่ามีผู้ที่ป่วยทั่วโลกทั้งหมด 10.4 ล้านคน และมีผู้ที่เสียชีวิตจากวัณโรคมากถึง 1.8 ล้านคน ส่วนผู้ติดเชื้อวัณโรคที่อยู่ในระยะแฝง ซึ่งยังไม่แสดงอาการพบว่ามีมากถึง 1 ใน 3 ของประชากรทั่วโลก องค์การอนามัยโลกได้จัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 22 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูงมากมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 แล้ว รายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อวัณโรคของสำนักวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข เมื่อปี พ.ศ. 2555 พบผู้ป่วย 137 รายต่อประชากร 100,000 คน หรือประมาณ 90,000 คนต่อปี (ในการนี้เป็นเชื้อดื้อยาประมาณ 1,900 คน) และเสียชีวิต 16 รายต่อประชากร 100,000 คน[2-3] นโยบายของกระทรวงสาธารณสุข ปี 2560 โดยกรมควบคุมโรคมีเป้าหมายที่จะลดอุบัติการณ์วัณโรคลง 20% ภายในปี 2560 และยุทธศาสตร์สาธารณสุขชายแดน พ.ศ. 2560 - 2564 มีเป้าหมายที่จะค้นหาผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้น[4]

การวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ **การย้อมเชื้อวัณโรคจากเสมหะ** เป็นการตรวจที่ต้องทำในผู้ป่วยทุกรายที่สงสัยว่าเป็นวัณโรคเพื่อช่วยยืนยันการวินิจฉัย **การนำเสมหะไปเพาะหาเชื้อ** เป็นวิธีที่สามารถตรวจพบเชื้อได้สูงถึง 80-90% ของผู้ป่วย และสามารถช่วยให้แพทย์สั่งจ่ายยาที่ให้การรักษาที่ดีที่สุดสำหรับผู้ป่วยได้ แต่การตรวจนี้ต้องใช้เวลาประมาณ 2 เดือนจึงจะทราบผลและบอกได้ว่ายาชนิดใดดีที่สุดสำหรับผู้ป่วย **การตรวจเลือด** เป็นการตรวจที่ช่วยบอกได้ว่าผู้ป่วยมีเชื้อวัณโรคในร่างกายหรือไม่ อีกทั้งยังช่วยยืนยันได้ว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะแฝงหรือระยะแสดงอาการ **การตรวจหาเชื้อวัณโรคในระยะแฝง** (Interferon gamma release assay: IGRA) เป็นการตรวจหาเชื้อวัณโรคในระยะแฝงที่สามารถระบุได้ว่าผู้ป่วยมีเชื้อวัณโรคภายในร่างกายหรือไม่ **การทดสอบระดับโมเลกุลสำหรับวัณโรคที่เรียกว่าการทดสอบการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิก** (nucleic acid test (NAT) or nucleic acid amplification test (NAAT) ) อาจทำได้ร่วมกับการทำ AFB smear NAAT *ตรวจจับส่วนประกอบ* ทางพันธุกรรมของ mycobacterium โดยขยาย/จำลองชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ การทดสอบเหล่านี้สามารถช่วยลดระยะเวลาสำหรับการวินิจฉัยวัณโรค มีความไวและความจำเพาะสูง วิธีการตรวจดังกล่าวนี้ ได้แก่ Gene Xpert MTB/RIF assay เทคนิค Real-time PCR, Line probe assay (LPA) และ เทคนิค LAMP[5-6]

ยุทธศาสตร์ขององค์การอนามัยโลก (WHO End TB Strategy) แนะนำให้มีการวินิจฉัยวัณโรคและการทดสอบความไวต่อยา (DST) โดยเน้นถึงบทบาทที่สำคัญของห้องปฏิบัติการในยุคหลัง 2015 เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคและความไวต่อยาได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง การวิเคราะห์โมเลกุลบนพื้นฐานของเทคนิคการขยายตัวของกรดนิวคลีอิก เช่น ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์ (PCR) ได้รับการพัฒนาขึ้นสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคอย่างรวดเร็วและกำลังดำเนินการในประเทศกำลังพัฒนา การตรวจวิเคราะห์โมเลกุลเชิงพาณิชย์ Loopamp ™ MTBC Detection Kit ได้รับการพัฒนาโดย Eiken Chemical Company Ltd (Tokyo, Japan) เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคจากเชื้อ Mycobacterium tuberculosis complex (TB-LAMP) TB-LAMP เป็นการทดสอบด้วยตนเองที่ต้องใช้เวลาในการปฏิบัติน้อยกว่าสองชั่วโมงและสามารถอ่านด้วยตาเปล่าได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากความต้องการด้านโครงสร้างพื้นฐานที่จำกัด และความสะดวกในการใช้งาน TB-LAMP จึงได้รับการตรวจสอบว่าเป็นการทดสอบวินิจฉัยอย่างรวดเร็วสำหรับจุดที่มีทรัพยากรจำกัด[7-8]

ฝ่ายมัยโคแบคทีเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ได้นำเทคนิค TB-LAMP มาพัฒนาตั้งแต่ปี 2552 เรียกเทคนิคนี้ว่า TB Fast Amp และถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ให้ห้องปฏิบัติการชันสูตรสาธารณสุขศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ในการค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบ โดยในขั้นตอนการตรวจสอบปฏิกิริยาจะนำไปทำ gel electrophoresis แทนการอ่านด้วยตาเปล่าภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

## วัตถุและวิธีการ

**ตัวอย่าง**

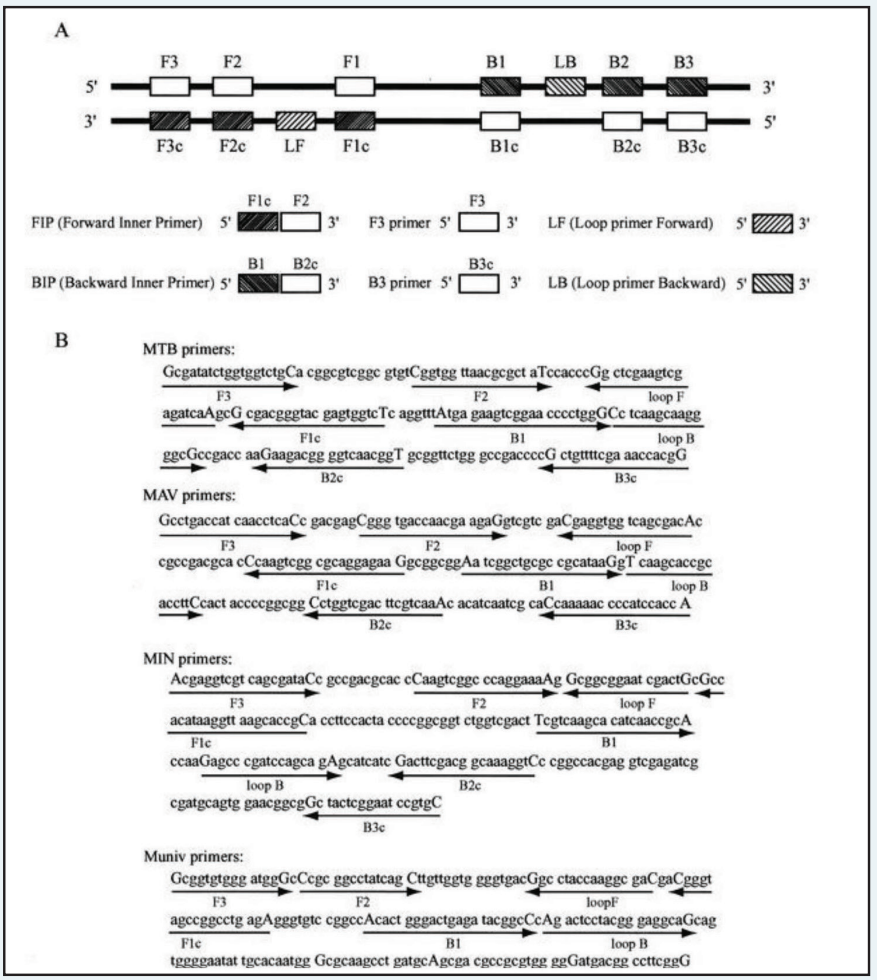
เสมหะจากผู้สงสัยติดเชื้อวัณโรคที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ AFB แล้วให้ผลลบ ที่มีผลการเอกซเรย์ปอด และมีอาการทางคลินิกไม่แน่ชัด จากโรงพยาบาลต่างๆ ในเขตสุขภาพที่ 10 จำนวน 385 ตัวอย่าง

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

- Safety cabinet class II
- High speed centrifuge/ Low speed centrifuge
- Heat block
- Water bath
- Electrophoresis set ยี่ห้อ GelMate2000 ประเทศญี่ปุ่น
- Gel document ยี่ห้อ UVITEC Cambridge ประเทศอังกฤษ

**สารเคมีและสารมาตรฐาน**

1. น้ำยาสารเคมีสำหรับลดการปนเปื้อน
   - NALC ยี่ห้อ Fluka สหรัฐอเมริกา
   - NaOH, Na citrate ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ออสเตรีย
   - PBS pH 6.8 (เตรียมจาก $KH_2PO_4$ และ $Na_2HPO_4$ ยี่ห้อ MERCK เยอรมัน)
2. น้ำยาสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ
   - Flexi Gene®DNA Kit ยี่ห้อ QIAGEN สหรัฐอเมริกา
   - Protenase K Kit ยี่ห้อ QIAGEN สหรัฐอเมริกา, Isopropanol, 70% ethanol
   - ปฏิกิริยาการขยายตัวใช้ไพรเมอร์สี่ชนิด ประกอบกันเป็น 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมายดังภาพ
   - FastAmp master mix 1 reaction ประกอบด้วย 10Xbuffer 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTPs 4 ไมโครลิตร, 5M Betaine 3.2 ไมโครลิตร, 100mM $MgSO_4$ 1.2 ไมโครลิตร และ primer mix 1.6 ไมโครลิตร
   - Bst DNA polymerase large fragment ยี่ห้อ BioLabs Inc สหรัฐอเมริกา
   - น้ำยาสารเคมีสำหรับ run gel electrophoresis 0.5XTBE, Agarose



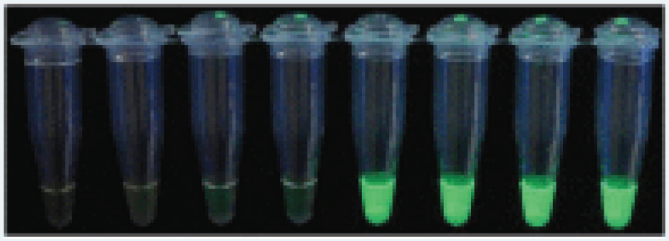

**วิธีวิเคราะห์**[9-10]

ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

1. การลดการปนเปื้อนด้วย NALC-NaOH
   - ตัวอย่างเสมหะ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำยาลดการปนเปื้อน NALC-NaOH 5-10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที
   - เติม phosphate buffer pH 6.8 จนถึงขีดปริมาตร 45 มิลลิลิตร
   - ปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือ Decontaminated sputum
2. การสกัดดีเอ็นเอ วิธี lysis ด้วยเอนไซม์
   - ปิเปต Decontaminated sputum มา 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง
   - เติม FG2 50 ไมโครลิตร และ Proteinase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
   - เติม Isopropanol 50 ไมโครลิตร ปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง
   - เติม 70 % Ethanol 50 ไมโครลิตร ปั่นที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ตากตะกอน DNA ให้แห้ง โดยนำหลอดไปใส่ใน Heat block ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
   - ละลาย DNA ด้วยน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร
3. ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย TB Fast Amp ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส
   - เติมสารละลาย DNA 6 ไมโครลิตร ลงใน TB Fast Amp master mix 14 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที

4. อ่านผลปฏิกิริยาโดย run gel electrophoresis ย้อมสี ethidium bromide และถ่ายภาพ

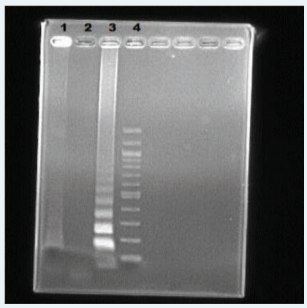
TB-Fast Amp เป็นวิธีการตรวจสารพันธุกรรม DNA โดยใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA เป้าหมาย ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็นล้านเท่าในสภาวะอุณหภูมิเดียว 65 องศาเซลเซียส ส่วนประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยาได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์, dNTP, $Mg_2SO_4$, ไพรเมอร์ 3 คู่ (DNA สายสั้นที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 25 base, เอนไซม์ Bst DNA polymerase, สารพันธุกรรม DNA ต้นแบบ, สาร Betaine และสารเรืองแสงที่ใช้ติดตามตรวจผลผลิตของปฏิกิริยา TB Fast Amp การสังเคราะห์ DNA ของปฏิกิริยา ทำให้เกิดการตกตะกอนของแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต สังเกตเห็นตะกอนขาว หรือการเรืองแสง UV หรือการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาจากสีส้มเป็นสีเขียว โดยการใช้สีย้อม dsDNA เช่นสี SYBR การเรืองแสงหรือความขุ่นสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพที่ 2)



**ผลลบ หลอดที่ 1-4** **ผลบวก หลอดที่ 5-8**

**ภาพที่ 2** ปฏิกิริยาการเรืองแสงจากการย้อมสี

ผู้วิจัยได้ประยุกต์วิธี TB Fast Amp หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากแล้วจะตรวจจับโดยนำไป run gel electrophoresis แล้วถ่ายภาพ ภาพ band DNA TB (ภาพที่ 3)




หลุม 1-2 ผลลบ
หลุม 3 ผลบวก
หลุม 4 100 bp DNA ladder

**ภาพที่ 3** TB FastAmp จากการ run gel

## ผล

ผลการศึกษา TB FastAmp จากห้องปฏิบัติการชันสูตรสาธารณสุข ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 10 อุบลราชธานี ระหว่าง พ.ศ. 2556 ถึง พ.ศ. 2560 ในผู้ป่วยสงสัยวัณโรคที่ผลตรวจสเมียร์เสมหะให้ผลลบของโรงพยาบาลในเขตสุขภาพที่ 10 ข้อมูลจากใบนำส่งตัวอย่าง จำนวน 385 ราย พบว่าเป็นชาย จำนวน 204 ราย ร้อยละ 52.99 เป็นหญิง จำนวน 181 ราย ร้อยละ 47.01 อายุต่ำสุด 5 ปี สูงสุด 91 ปี ไม่ระบุอายุ 33 ราย จำแนกตามช่วงอายุ (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1 ข้อมูลของผู้ป่วยสงสัยวัณโรค ช่วงอายุและเพศ**

| ช่วงอายุ (ปี) | จำนวน (ราย) | เพศ (ราย) | | ร้อยละ |
|---|---|---|---|---|
| | | ชาย | หญิง | |
| < 29 | 14 | 10 | 4 | 3.64 |
| 30-39 | 21 | 15 | 6 | 5.45 |
| 40-49 | 42 | 27 | 15 | 10.91 |
| 50-59 | 55 | 32 | 23 | 14.29 |
| 60-69 | 95 | 45 | 50 | 24.67 |
| > 70 | 125 | 55 | 70 | 32.47 |
| ไม่ระบุอายุ | 33 | 20 | 13 | 8.57 |
| | 385 | 204 | 181 | 100 |

ลักษณะอาการเบื้องต้นที่มาโรงพยาบาล คือ ไอ ไอเรื้อรัง เสมหะปนเลือด เจ็บหน้าอก เบื่ออาหาร Chest X-ray –Infiltration at RLL การวินิจฉัยเบื้องต้น 4 อันดับแรก ได้แก่ Pneumonia, Haemophysis, Bronchitis และ COPD จากจำนวนข้อมูลผู้ป่วยร่วมบ้าน 145 ข้อมูล พบว่ามีผู้ป่วยร่วมบ้าน จำนวน 25 ราย ร้อยละ 17.24 ไม่มีผู้ป่วยร่วมบ้าน จำนวน 120 ราย ร้อยละ 82.76 จากจำนวนข้อมูลการรักษาวัณโรค 141 ข้อมูล พบว่าเคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน จำนวน 35 ราย ร้อยละ 24.82 ไม่เคยรับการรักษาวัณโรคมาก่อน จำนวน 106 ราย ร้อยละ 75.18 แสดงในตารางที่ 2 ผลการตรวจ TB Fast Amp ทางห้องปฏิบัติการ จำนวน 385 ราย พบว่าให้ผลบวก จำนวน 59 ราย ร้อยละ 15.32 (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 2 ข้อมูลผู้ป่วยร่วมบ้านและประวัติการรักษาวัณโรค**

| ข้อมูล | | จำนวน (ราย) | ร้อยละ |
|---|---|---|---|
| 1. ผู้ป่วยร่วมบ้าน | - มี | 25 | 17.24 |
| ให้ข้อมูล 145 ราย | - ไม่มี | 120 | 82.76 |
| รวม | | 145 | 100 |
| 2. เคยรักษาวัณโรค | - เคย | 35 | 24.82 |
| ให้ข้อมูล 141 ราย | - ไม่เคย | 106 | 75.18 |
| รวม | | 141 | 100 |

**ตารางที่ 3 ข้อมูลผลการตรวจ TB Fast Amp**

| ข้อมูล | | จำนวน (ราย) | ร้อยละ |
|---|---|---|---|
| ผล TB Fast Amp | - ลบ | 326 | 84.68 |
| | - บวก | 59 | 15.32 |
| | รวม | 385 | 100 |

## วิจารณ์

จากรายงานผลการใช้ LAMP test ช่วยตรวจค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบ ในโรงพยาบาลราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ และโรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชเดชอุดม จังหวัดอุบลราชธานี โดย จันทร์ฉาย[11] ปี 2553-2554 จำนวน 196 ราย พบว่าให้ผลบวก 63 ราย ร้อยละ 32.1 เนื่องจากแพทย์ผู้รับผิดชอบด้านคลินิกวัณโรคตรวจคัดกรองอย่างละเอียด ทำให้ตัวอย่างที่ส่งตรวจมีคุณภาพส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตรวจค้นหาวัณโรคด้วยวิธี LAMP สูง เมื่อเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ให้ผลบวก จำนวน 59 ราย ร้อยละ 15.32 จากรายงานการใช้ LAMP test ตรวจวินิจฉัยวัณโรคนอกปอดในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี โดย จันทร์ฉาย[12] ปี 2554 จำนวน 354 ราย พบว่าให้ผลบวก 14 ราย ร้อยละ 3.95 จากการศึกษา TB Fast Amp ในผู้ป่วยสงสัยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบสามารถค้นพบผู้ป่วยได้มากขึ้น แต่ยังไม่ได้นำเทคนิคไปใช้อย่างแพร่หลายอาจเนื่องจากไม่ได้ระบุในข้อแนะนำในการตรวจวินิจฉัยของประเทศ

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่องค์การอนามัยโลกและศูนย์ควบคุมป้องกันโรคสหรัฐอเมริกาแนะนำสำหรับการตรวจเชื้อวัณโรค เนื่องจากให้ผลตรวจเร็วและมีวิธีตรวจที่ง่าย วิธีการใช้ไพรเมอร์ตั้งต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 3 คู่ โดยปฏิกิริยาสังเคราะห์จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิเดียว จึงไม่ต้องใช้เครื่อง thermal cycler ที่มีราคาแพง[3,5]

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยจณิสรา[9] ได้พัฒนาวิธี สรุปผลการศึกษาว่าสามารถตรวจเชื้อวัณโรคได้อย่างจำเพาะ และมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง มีวิธีการที่ง่าย จำนวนเชื้อต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ประมาณ 9 เซลล์ Kaewpinit[10] สรุปข้อดีของวิธี LAMP Klayut[13] พบว่าการใช้ไพรเมอร์หลายคู่ทำให้การออกแบบค่อนข้างยาก ต่อมามีการพัฒนาวิธี non-LAMP ขึ้น คล้ายวิธี LAMP แต่ใช้ไพรเมอร์เพียงคู่เดียวเหมือนวิธีพีซีอาร์ เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรค งานวิจัยนี้ทดสอบประสิทธิภาพของวิธี non-LAMP และ LAMP ในการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรค ผลการทดสอบ ด้วยวิธี non-LAMP

และ LAMP ให้ผลตรวจตรงกัน มีค่าความไวร้อยละ 100 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานเพาะเชื้อ วิธี non-LAMP และ LAMP ให้ผลตรวจตรงกัน มีค่าความไวร้อยละ 87 สรุปผลวิธี non-LAMP และ LAMP ที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคได้ มีความไวสูง มีวิธีการตรวจที่ง่าย ได้ผลรวดเร็ว และมีราคาถูก เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการทั่วไปสามารถนำไปปฏิบัติเพื่อการตรวจวินิจฉัยวัณโรคได้ผลเร็ว

## สรุป

สรุปผลจากการศึกษา เทคนิค TB Fast Amp สามารถช่วยค้นหาผู้ป่วยวัณโรคในกลุ่มสเมียร์ลบได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 15.32 ทั้งนี้ขึ้นกับการตรวจคัดกรองอย่างละเอียดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจค้นหา TB Fast Amp เป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาที่เข้ามามีบทบาทในการทดสอบเชื้อวัณโรค M. tuberculosis ในตัวอย่างทางคลินิก มีข้อดีต่างๆ คือ 1) มีความรวดเร็วและ ประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA ภายใต้สภาวะที่ อุณหภูมิคงที่ 2) มีความจำเพาะสูงเพราะใช้ primers 6 ชุดที่ จำเพาะต่อ 6 ตำแหน่ง จะช่วยลด background จากการเกิด non specific ได้ 3) เป็นวิธีการที่ง่าย ในการทดสอบ สามารถใช้กับเครื่องมือพื้นฐานทั่วๆ ไปได้ เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block น่าจะเป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาที่จะเข้ามามีบทบาทและใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับการตรวจสอบเชื้อวัณโรคในตัวอย่างทางคลินิก แบบรู้ผลเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่คลินิกวัณโรค ผู้บริหาร โรงพยาบาลในเขตสุขภาพที่ 10 ที่ให้ความร่วมมือและสนับสนุนให้การดำเนินงานลุล่วงไปด้วยดี

## References

1. MedThai. Tuberculosis; Symptoms, causes, treatment. [Cited 2017 Oct 19]; Available from: https://medthai.com/Tuberculosis /
2. James McIntosh. Tuberculosis: Causes, Symptoms, and Treatments. [Cited 2017 Oct 19]; Available from http://www.medicalnewstoday.com/articles/8856.php/Accessed July 20, 2017.
3. World Health Organization. Tuberculosis. [Cited 2017 Oct 19]; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/Accessed July 20, 2017.
4. Bureau of Policy and Strategy Ministry of Public Health. Border health strategy 2017-2023. [Cited 2017 Oct 13]; Available from: https//: bps.moph.go.th/new_bps/sites/default/ files/1.%20 border_health_strategy.pdf
5. Labtestonline. AFB-Culture. [Cited 2017 Oct 13]; Available from: https://labtestsonline.org/understanding/analytes/afb-culture/tab/test. Accessed July 20, 2017.
6. Silairat S. New technique for Tuberculosis diagnosis. [Cited 2017 Oct 14]; Available from: http://www.wongkarnpat.com/viewpat.php?id=1789#.WeRnmI-0PDc
7. Stop-TB Partnership. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2010.
8. CDC. Update Guidelines for the use of nucleic acid amplification test in diagnosis of Tuberculosis. [Cited 2017 Oct 13]; Available from: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5801a3.htm. Accessed August 20, 2017.
9. Rudeeaneksin J, BoonChu S, Tunchau H, Sawanpanyalert P, Kamolwat A . Fast tuberculosis examination using LAMP test, direct sputum examination and identification of the infection Growing up. Journal of Public Health, Vol. 19, No. 2 (March-April 2010), pages 300 - 310.
10. Kaewpinit T, Santiwattanakul S, Chansiri K. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for Tuberculosis diagnosis. Journal of Medicine and Health Sciences (Vol. 20 No.1 April 2013) p. 13-20.
11. Khamsaen J, Panumaswiwat S, Chaipanna B, Ittitummaboon P, Kaewsri W, Jearakul W, et al. The result of using LAMP test helps detect TB patients in the negative smear group in Rasrisalai hospital, Sri Sa Ket and Det Udom Crown Prince Hospital, Ubon Ratchathani. The 35th Medical Technology Conference. April 26-29, 2011 at Sunee Hotel and Convention Center Ubon Ratchathani. (Poster presentation)
12. Khamsaen J, Teerawattanasuk N, Petsuksiri B, Rudeeaneksin J, Aramruang P, Jearakul W, et al. Use of LAMP test for diagnosis of ex-pulmonary tuberculosis In Sunpasitthiprasong Hospital Ubon Ratchathani. The 19th Congress of Medical Sciences, 17-19 August 2011, at the Miracle Grand Hotel, Nonthaburi Province. (Poster presentation)
13. Klayut W, Srisangngam S, Rudeeaneksin J, BoonChu S, Noppornphan K. Comparison of non-LAMP and LAMP test. Isothermal amplification, A new method for tuberculosis testing. [Cited 2017 Aug 25]; Available from: https://nih.dmsc.moph.go.th/KM/59/research2559/poster/wipat.pdf