ประสิทธิภาพของวิธี Microplate 7H11 agar proportion เพื่อการเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยาในภาคเหนือตอนบน ประเทศไทย

Efficiency of Microplate 7H11 Agar Proportion Method for Drug-Resistant Tuberculosis Surveillance in Upper Northern Thailand

วุฒิชัย ปัญญาสิทธิ์ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)	**Wutthichai Panyasit B.Sc. (Medical Technology)**
เจียรนัย ขันติพงศ์ วท.ม. (พิษวิทยา)	**Jiaranai Khantipongse M.Sc. (Toxicology)**
ณทิพรดา เนติรัตน์ วท.ม. (จุลชีววิทยา)	**Nathiprada Netirat M.Sc. (Microbiology)**
รจนา พงศ์สารารักษ์ วท.ม. (ชีวเคมี)	**Rodjana Pongsararuk M.Sc. (Biochemistry)**
อภิวดี ทองสง วท.ม. (นิติวิทยาศาสตร์)	**Apiwadee Tongsong M.Sc. (Forensic Science)**

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ Office of Disease Prevention and Control Region 1 Chiang Mai.

Received: Jul 16, 2020 **Revised:** Oct 19, 2020 **Accepted:** Dec 29, 2020

บทคัดย่อ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาวัณโรคดื้อยาที่มีประสิทธิภาพ ถือเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้การรักษาและควบคุมวัณโรคประสบผลสำเร็จ ปัจจุบันหลักการทางอณูชีววิทยามีบทบาทสำคัญแต่มีข้อจำกัดด้านงบประมาณทำให้การตรวจบางกลุ่มเสี่ยงวัณโรคดื้อยา ต้องใช้วิธีแบบเดิมโดยอาหารแข็งเพื่อลดเวลาการรอผล และลดพื้นที่ในการเพาะเชื้อ การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการทดสอบโดยใช้ microplates ในการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นชนิด Middlebrook 7H11 เพื่อทดแทนวิธีมาตรฐานของ Canetti ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Löwenstein–Jensen (LJ) ตัวอย่างทดสอบคือเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง จำนวน 219 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า การตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรค วัณโรคดื้อยาหลายขนาน วัณโรคที่ดื้อต่อยา Rifampicin, Streptomycin และ Ethambutol ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด การตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา isoniazid ได้ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ เท่ากับร้อยละ 100.0, 98.7, 95.6, และ100.0 ตามลำดับ และมีค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮนของการตรวจวิเคราะห์ เท่ากับ 0.9 ด้วยวิธีใหม่และ LJ medium สามารถรายงานผลได้ภายใน 28 และ 42 วัน โดยมีระยะเวลาการรายงานผลเฉลี่ย 24 และ 36 วัน ตามลำดับ โดยสรุปการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธีใหม่นี้ ให้ผลการทดสอบที่เร็วกว่า ใช้พื้นที่ในการเพาะเชื้อน้อยกว่าและมีประสิทธิภาพที่ดีเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยาในพื้นที่ที่มีความชุกของโรคสูง เพื่อให้กลุ่มเสี่ยงวัณโรคดื้อยาทั้งหมดได้รับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

คำสำคัญ: วัณโรค, วัณโรคดื้อยาหลายขนาน, การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

ABSTRACT

Efficiency laboratory tests for the diagnosis of drug-resistant TB is the main factor for success in TB treatment and control. Currently, Molecular biology techniques is an important role in the diagnosis. However, due to the high cost of the biomolecule technique for testing, some risk groups of drug-resistant tuberculosis still use the conventional method on solid media. This study developed a drug susceptibility testing using microplates containing the Middlebrook 7H11 agar for reducing turn-around time and the incubation space, aimed to compare the Canetti using Löwenstein–Jensen (LJ) medium and new method. 219 bacterial colonies on solid media were parallelly tested by two methods. Comparison showed that the results of the two assays perfect agreement for detection of TB, MDR-TB, rifampicin, streptomycin and streptomycin resistant isolates. The sensitivity, specificity, positive predictive values, negative predictive values and Cohen's kappa coefficient were 100.0%, 98.7%, 95.6%, 100.0% and 0.9 respectively for detection of isoniazid resistant isolates. Time required for DST between new method and standard method is 28 and 42 days, average time is 24 and 36 days, respectively. The results showed high efficacy of this new method by comparing with standard method. In addition, this new method can reduce turn-around time and the incubation space. It is likely to be useful in high-endemic areas for surveillance as well as for the detection of drug-resistant tuberculosis in all risk groups.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB), Antimycobacterial susceptibility testing (AST)

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) จัดอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex เป็นโรคติดต่อที่มีมานานและเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก ในรายงานขององค์การอนามัยโลก ปี 2562 ประเทศไทยจัดอยู่ 1 ใน 14 ประเทศที่มีปัญหาจำนวนผู้ป่วยวัณโรคสูง ทั้งผู้ป่วยวัณโรค (TB) วัณโรคที่มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย (TB/HIV) และวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) (World Health Organization [WHO], 2019) ประเทศไทยได้ทำแผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560-2564 หนึ่งในมาตรการคือการค้นหาและคัดกรองวัณโรคดื้อยาหลายขนานให้ครอบคลุมและรวดเร็ว โดยผู้ป่วยวัณโรคที่มีผลยืนยันแบคทีเรียวิทยาต้องมีผลการทดสอบความไวต่อยาชนิดไรแฟมพิซิน (Rifampicin) เป็นอย่างน้อย (สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2560)

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีสองหลักการคือ การตรวจทางด้านฟีโนไทป์ (Phenotypic method) หรือวิธีเดิม (Conventional method) และเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology method) ที่มีขั้นตอนและการให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วกว่า แต่ข้อจำกัดด้านงบประมาณทำให้การคัดกรองวัณโรคดื้อยาในบางกลุ่มเสี่ยงต้องตรวจด้วยวิธีเดิมในอาหารแข็งเท่านั้น (Solid media) (กองวัณโรค กรมควบคุมโรค

กระทรวงสาธารณสุข, 2562) (สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ, 2562)

วิธีมาตรฐาน (Gold standard) ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยอาหารแข็งมี 2 วิธี แตกต่างกันที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Middlebrook 7H10 หรือ 7H11 agar media และ Löwenstein–Jensen (LJ) medium ที่ต้องใช้พื้นที่มากและระยะเวลาในการเพาะเชื้อนานกว่าอาหารประเภทวุ้น (agar media) ไม่เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีตู้หรือห้องเพาะเชื้ออย่างจำกัด และด้วยระยะเวลาการเพาะเชื้อที่นาน 21-42 วัน ยังส่งผลให้การรายงานผลมีความล่าช้าอาจทำให้การปรับเปลี่ยนการรักษาไม่ทันท่วงทีและไม่มีประสิทธิภาพ บางห้องปฏิบัติการทั้งในไทยและต่างประเทศเลือกใช้อาหารประเภทวุ้นที่มีระยะเวลาการอ่านผลเร็วกว่า คืออ่านผลภายใน 21-28 วัน และใช้ microplate แทน quadrant petri dishes ในการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อประหยัดพื้นที่แต่ยังคงประสิทธิภาพไม่ต่างจากวิธีมาตรฐาน (Nguyen *et al*., 2015; Wedajo *et al*., 2014)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วย LJ medium ตามวิธีของ Canetti (WHO, 2018) และวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่คือ Microplate 7H11 agar proportion

วิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง กลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ส่งทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่ห้องปฏิบัติการของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 เชียงใหม่ ทั้งหมด 219 ตัวอย่าง เป็นเสมหะ จำนวน 186 ตัวอย่าง และตัวอย่างชนิดอื่น 33 ตัวอย่าง ส่งตรวจตั้งแต่เดือน ธันวาคม 2562 ถึง มีนาคม 2563

ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบคือ เชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งชนิด LJ หรือ 2% Ogawa และให้ผลพบเชื้อ Acid-fast bacilli (AFB) ด้วยการย้อมวิธี Ziehl Neelsen

หลักการดำเนินการศึกษา

ใช้ 12-well microplates ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นชนิด Middlebrook 7H11 กับวิธีทดสอบมาตรฐานของ Canetti ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LJ ที่ผลิตและควบคุมคุณภาพจากห้องปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ กองวัณโรค ในการพิสูจน์เชื้อวัณโรค ด้วยหลักการ para-nitrobenzoic acid (PNB) method และการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคคือ isoniazid, rifampicin, streptomycin และ ethambutol ด้วยหลักการ proportion method อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองประเภทถูกทดสอบด้วยเชื้อตัวอย่างเดียวกันที่ถูกเตรียมให้ได้ความเข้มข้นมาตรฐาน ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการความปลอดภัยระดับ 2 และใช้ข้อปฏิบัติตามที่กำหนดสำหรับความปลอดภัยระดับ 3 (biosafety level 2 enhanced) โดยใช้ความเข้มข้นของยาต้านวัณโรค (ตารางที่ 1)

วิธีการทดสอบ

1. อาหารที่ใช้ทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

เตรียม Middlebrook 7H11 agar (Difco, USA) ตามคำแนะนำจากผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมเพิ่มเติมคือ สารอาหาร 10% OADC (BBL) ยาต้านวัณโรค (Sigma; RMP, STM, EMB: China) (Fluka; INH: India) ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและบรรจุลงในหลุมของ 12-well microplate ปริมาตร 3 ml ในแต่ละหลุม ให้ตรงกับชนิดของยาที่บ่งชี้ไว้ (รูปที่ 1) โดยในแต่ละ plate มีหลุมควบคุม (Control, C) ที่ไม่ผสมยาจำนวน 2 หลุม และหลุมที่มียาผสมจำนวนชนิดละ 2 หลุม เก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในที่ทึบแสงอุณหภูมิ 4°C ไม่เกิน 1 เดือน

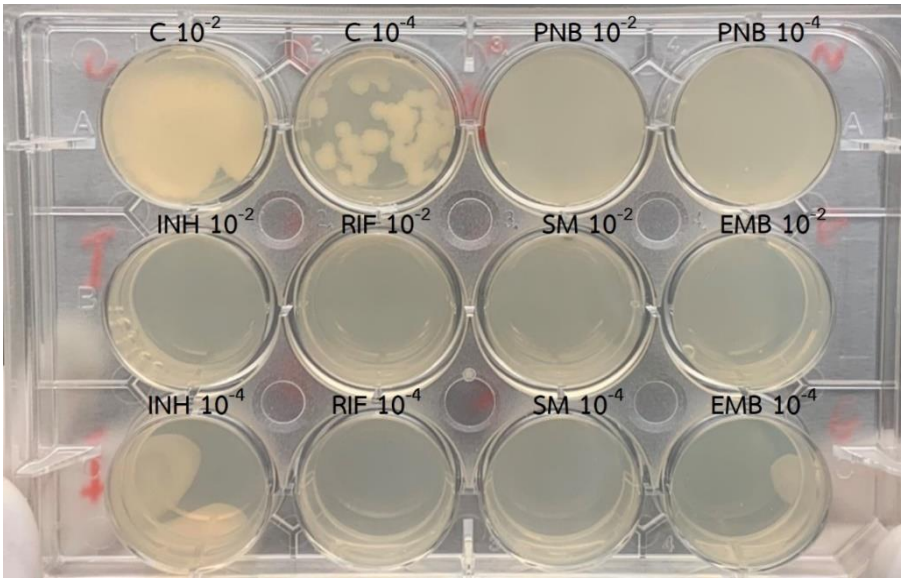
2. การเพาะเชื้อ

เชื้อที่นำมาทดสอบเป็นโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง อายุของเชื้ออยู่ในช่วง 7-14 วัน นำเชื้อใส่ในอาหารเหลวชนิด Middlebrook 7H9 broth ที่มีส่วนผสมของ 0.05% Tween 80 และเม็ดแก้วขนาดเล็ก ตีโคโลนีในหลอดด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ดูดส่วนบนของหลอดนำไปปรับความขุ่นเทียบเท่า McFarland standard No.1

แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-4} เท่า หยดตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2} ลงบนหลุมควบคุม และหลุมที่มียาแต่ละชนิดบน microplates (รูปที่ 1) หลุมละ 1 หยด ทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-4} หยดลงหลุมควบคุมและหลุมที่มียาทุกชนิด ปิด microplate ด้วยเทปกาวเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C และตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2} และ 10^{-4} เท่า ถูกนำไปทดสอบใน LJ medium ตามวิธีมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบผลการศึกษา

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของยา (Critical concentrations) ในส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ (WHO, 2018)

ชื่อยา	ชื่อย่อ	ความเข้มข้นของยา (Critical concentrations) ในส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละประเภท (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	
		Löwenstein–Jensen	Middlebrook 7H11
Rifampicin	RIF	40.0	1.0
Isoniazid	INH	0.2	0.2
Streptomycin	SM	4.0	2.0
Ethambutol	EMB	2.0	7.5
Para-nitrobenzoic acid	PNB	500.0	500.0



รูปที่ 1 Middlebrook 7H11 agar ใน 12-well microplate แสดงการเจริญของเชื้อในหลุมควบคุม (C) ที่ความเข้มข้น 10^{-2} ความเข้มข้น 10^{-4} และไม่มีการเจริญของเชื้อในหลุมที่มียา Rifampicin (RIF), Isoniazid (INH), Streptomycin (SM), Ethambutol (EMB), Para-nitrobenzoic acid (PNB)

3. การอ่านผล

ตรวจสอบการปนเปื้อนในช่วงเวลา 5-7 วัน หลังจากเพาะเชื้อ และอ่านผลการเจริญของเชื้อด้วยตาหลังจาก 21 วัน แต่ไม่เกิน 28 วัน ถ้าพบเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลุมควบคุมและไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารหลุมที่มียาชนิด PNB ผลการพิสูจน์เชื้อเป็น MTB ถ้าพบเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลุมควบคุมและเจริญบนอาหารหลุมที่มียาชนิด PNB ผลการพิสูจน์เชื้อเป็น NTM

อ่านผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยนับและบันทึกจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละหลุม คำนวณร้อยละจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในอาหารที่มียาแต่ละชนิดเทียบกับอาหารที่ไม่มีส่วนผสมของยา ผลที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1% หมายถึง เชื้อที่นำมาทดสอบดื้อต่อยาชนิดดังกล่าว (Resistant) หากน้อยกว่า 1% หรือไม่มีเชื้อเจริญในอาหารที่มียาหมายถึงเชื้อมีความไวต่อยา (Susceptible) เพื่อป้องกันผลลบลวงอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มียาที่เจือจาง 10^{-2} ต้องมีเชื้อเจริญ ไม่ต่ำกว่า 50 โคโลนี หากต่ำกว่าสามารถรายงานผลยาเฉพาะที่ Resistant และเพื่อป้องกันผลบวกลวงอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มียาที่เจือจาง 10^{-4} ต้องมีเชื้อเจริญน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 โคโลนี หากมากกว่าสามารถรายงานผลยาเฉพาะที่ Susceptible

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์เปรียบเทียบผลการทดสอบของสองวิธีโดยใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรง ได้แก่ โดยการเปรียบเทียบใช้หลักสถิติสำหรับประเมินความเที่ยงตรง ได้แก่ การหาค่าความไว (Sensitivity) ค่าความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value: PPV) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value: NPV) สัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa; Kappa coefficient) และการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการรายงานผลการทดสอบ

ผลการศึกษา

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรค จากการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรคด้วยหลักการ PNB method โดยใช้วิธี Microplate 7H11 agar proportion และอาหารชนิด LJ ในตัวอย่างจำนวน 219 ตัวอย่าง จากการพิสูจน์เชื้อพบว่าเป็น MTB จำนวน 202 ราย และ NTM จำนวน 17 ราย สอดคล้องกันทั้งหมด (ตารางที่ 2) ผลการศึกษาพบว่า Microplate 7H11 agar สำหรับการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรค มีค่าความไวค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ 100% ให้ค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน 1.000 ที่ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error) เท่ากับ 0.068 เมื่อเปรียบเทียบกับ LJ medium

ผลการตรวจเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน จากการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ในตัวอย่างที่ให้ผลพิสูจน์เชื้อเป็น MTB จำนวน 202 ตัวอย่าง ด้วยหลักการ Proportion method โดยอาหารชนิด Microplate 7H11 agar และ LJ ผลเป็น MDR-MTB 14 ราย และไม่ใช่ MDR-MTB จำนวน 188 ราย สอดคล้องกันทั้งหมด (ตารางที่ 3) ผลการศึกษาพบว่า Microplate 7H11 agar สำหรับการตรวจวิเคราะห์พิสูจน์เชื้อวัณโรคดื้อยามีค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ 100% ให้ค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน 1.000 ที่ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน เท่ากับ 0.070 เมื่อเปรียบเทียบกับ LJ medium

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค จากการทดสอบความไวต่อยาทั้ง 4 ชนิด จำนวน 202 ตัวอย่าง ด้วยหลักการ Proportion method โดยใช้ Microplate 7H11 agar และ LJ medium พบผลสอดคล้อง 200 ตัวอย่าง และไม่สอดคล้อง 2 ตัวอย่างได้แก่ การทดสอบความไวต่อยา isoniazid ให้ผล Resistance ด้วยการทดสอบโดยใช้ Microplate 7H11 agar medium ในขณะที่ทดสอบด้วย LJ medium ให้ผล Susceptible (ตารางที่ 4)

ผลการศึกษาระยะเวลาการทดสอบ ระยะเวลาการทดสอบนับตั้งแต่วันที่เริ่มทดสอบจนกระทั่งรายงานผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วย Microplate 7H11 agar medium จากการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 202 ตัวอย่าง สามารถรายงานผลได้ทั้งหมดภายใน 28 วัน เวลาเฉลี่ย 24 วัน ในขณะที่การทดสอบด้วย LJ medium สามารถรายงานผลได้ทั้งหมดภายใน 42 วัน เวลาเฉลี่ย 36 วัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการพิสูจน์เชื้อวัณโรคด้วยวิธี PNB ใน Microplate 7H11 agar และ LJ medium

Microplate 7H11 agar medium	Löwenstein–Jensen medium		
	MTB	NTM	Total
MTB	202	0	202
NTM	0	17	17
Total	**202**	**17**	**219**

MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, Nontuberculous mycobacteria

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบผลการทดสอบหาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) โดยใช้ Microplate 7H11 agar และ LJ medium

Microplate 7H11 agar medium	Löwenstein–Jensen medium		
	MDR-TB	Not MDR-TB	Total
MDR-TB	14	0	14
Not MDR-TB	0	188	188
Total	**14**	**188**	**202**

MDR-TB, Multidrug resistant tuberculosis

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค โดยใช้ Microplate 7H11 agar และ LJ medium

Microplate 7H11 agar	Löwenstein–Jensen			Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %	k (± SE)
	Resistance	Susceptible	Total					
INH-Resistance	43	2	45	100.0	98.7	95.6	100.0	0.971
INH-Susceptible	0	157	157					(0.901- 1.000)
Total	**43**	**159**	**202**					
RMP-Resistance	21	0	21	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000
RMP-Susceptible	0	181	181					(0.930-1.000)
Total	**21**	**181**	**202**					

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค โดยใช้ Microplate 7H11 agar และ LJ medium (ต่อ)

Microplate 7H11 agar	Löwenstein–Jensen			Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %	k (± SE)
	Resistance	Susceptible	Total					
SM-Resistance	34	0	34	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000
SM-Susceptible	0	168	168					(0.930-1.000)
Total	**34**	**168**	**202**					
EMB-Resistance	6	0	6	100.0	100.0	100.0	100.0	1.000
EMB-Susceptible	0	196	196					(0.930-1.000)
Total	**6**	**196**	**202**					

EMB, ethambutol; INH, isoniazid; RMP, rifampicin; SM, Streptomycin; k, Cohen's kappa coefficient; SE,standard error; PPV, Positive predictive value; NPV, Negative predictive value

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบระยะเวลาการรายงานผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค โดยใช้ Microplate 7H11 agar และ LJ medium

เวลาการรายงานผล (วัน)	Microplate 7H11 agar medium		Löwenstein–Jensen medium	
	จำนวน (ราย)	การออกผลสะสม	จำนวน (ราย)	การออกผลสะสม
≤ 21	48	23.8 %	0	0.0 %
22 - 28	154	100.0 %	15	7.4 %
29 - 32	-	-	16	15.3 %
33 - 35	-	-	78	54.0 %
36 - 42	-	-	93	100.0 %

อภิปรายผล

จากการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ MTB ทางด้านฟีโนไทป์ หรือวิธีเดิมด้วยหลักการ Proportion method ของอาหารชนิด Microplate 7H11 agar และ LJ ที่เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าการตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรค ด้วยหลักการ PNB method จำนวน 219 ตัวอย่าง การตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Rifampicin, Streptomycin และ Ethambutol จำนวน 202 ตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด มีเพียงการทดสอบพิสูจน์เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid พบ 2 ตัวอย่าง ให้ผล Resistance ด้วยการทดสอบใน Microplate 7H11 agar medium ในขณะที่ทดสอบใน LJ medium ให้ผล Susceptible พิจารณาความสอดคล้องของสถิติแคปปาตามแนวทางของ McHugh (2012) ถือว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องมากที่สุด

จากการศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาการรายงานผลของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคพบว่า

การทดสอบด้วย Microplate 7H11 agar และ LJ medium สามารถรายงานผลได้ภายใน 28 และ 42 วัน โดยมีระยะเวลาการรายงานผลเฉลี่ย 24 และ 36 วัน ตามลำดับ และการเปรียบเทียบพื้นที่ในการเพาะเชื้อพบว่า การทดสอบด้วย Microplate 7H11 agar และ LJ medium ใช้พื้นที่ในการเพาะเชื้อเท่ากับ 257 และ 536 ตารางเซนติเมตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ

โดยสรุปการประเมินประสิทธิภาพของวิธี Microplate 7H11 agar proportion ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค พบว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานของ Canetti โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LJ medium นอกจากนี้การใช้อาหารชนิด Microplate 7H11 agar สามารถรายงานผลได้เร็วกว่าและใช้พื้นที่ในการเพาะเชื้อลดลง 2 เท่า สะดวกในการใช้ตู้เพาะเชื้อขนาดเล็ก ทำให้ผู้ป่วยได้รับผลการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้อง รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ และลดภาระงานของห้องปฏิบัติการในการเพาะเชื้อและการติดตามอ่านผล

ข้อเสนอแนะ

การใช้ LJ medium ในตรวจพิสูจน์เชื้อวัณโรคและการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค มีข้อดีกว่าการใช้ Microplate 7H11 agar คือ ลักษณะและสีของโคโลนีของเชื้อที่เจริญบน LJ medium จะสามารถช่วยในการจำแนกเชื้อวัณโรค (MTB) ออกจากเชื้อ Nontuberculous mycobacteria (NTM) ได้เบื้องต้น อย่างไรก็ดีหากพบผลการพิสูจน์เชื้อไม่สอดคล้องกันระหว่างโคโลนีของเชื้อจากตัวอย่างที่นำมาทดสอบและหลังการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ต้องมีการตรวจสอบพิสูจน์เชื้อวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยา หรือวิธีการทดสอบหาโปรตีน MPT64 ด้วยหลักการ immunochromatographic assay (ICA) เพิ่มเติม

กรณีที่ห้องปฏิบัติการมีจำนวนตัวอย่างที่ทดสอบไม่มากหรือมีทรัพยากรเพียงพอควรใช้ Quadrant petri dishes ในการบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีมาตรฐานที่แนะนำโดยโดยองค์การอนามัยโลก (WHO, 2018) วิธีใหม่โดยใช้ Microplate แนะนำสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนตัวอย่างมากและทรัพยากรมีอย่างจำกัด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวสายใจ สมิทธิการ หัวหน้ากลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ กองวัณโรคและคณะ ที่ให้การฝึกอบรมการตรวจวิเคราะห์และสนับสนุนชุดทดสอบ LJ medium และขอขอบคุณ นายศักรินทร์ จันทร์วงค์ ผู้ริเริ่มและวางรากฐานการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี Microplate 7H11 agar ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2562). แนวทางบริหารจัดการและการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการด้านวัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์.

สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. (2562). คู่มือแนวทางปฏิบัติในการขอรับค่าใช้จ่ายเพื่อบริการสาธารณสุข ปีงบประมาณ 2563. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: หจก.แสงจันทร์การพิมพ์.

สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2560). แผนปฏิบัติการระดับชาติด้านการต่อต้านวัณโรค พ.ศ. 2560-2564. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์.

McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. Biochemia medica: Biochemia medica, 22(3), 276-282.

Nguyen, V. A. T., Nguyen, H. Q., Vu, T. T. *et al.* (2015). Reduced turn-around time for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing with a proportional agar microplate assay. Clinical Microbiology and Infection, 21(12), 1084-1092.

Wedajo, W., Schön, T., Bedru, A. *et al.* (2014). A 24-well plate assay for simultaneous testing of first and second line drugs against Mycobacterium tuberculosis in a high endemic setting. BMC research notes, 7(1), 1-8. [cited 2019 Aug 9]; Available from: URL: http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/512

World Health Organization [WHO]. (2019). Global tuberculosis report 2019 [online]. [cited 2019 Oct 18]; Available from: URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

World Health Organization [WHO]. (2018). Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis [online]. [cited 2019 Oct 17]; Available from: URL: https://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_drug_susceptibility_testing/en/