การพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้านอณูชีววิทยา

ชนัฏตรี ก่ำดี (วท.ม.)
ธนิดา เหรียญทอง (วท.ม.)
และ สมศักดิ์ เหรียญทอง (วท.ม.)
สำนักวัณโรค

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นสาเหตุหลักของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตในหลายประเทศทั่วโลก ประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 22 ประเทศที่มีการระบาดของวัณโรคสูง และปัจจุบันวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) เป็นภาระหนักที่กำลังขยายตัวออกไปเพิ่มขึ้น จำเป็นที่จะต้องพัฒนาและสนับสนุนเทคโนโลยีและกลยุทธ์ใหม่ที่จะช่วยให้เพิ่มความสามารถของโปรแกรมการป้องกัน การวินิจฉัย และการรักษา เริ่มมีการตรวจวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาเพิ่มมากขึ้นโดยผลตรวจจากห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพจะเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรคของผู้ป่วย การประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอกจึงเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญของระบบประกันคุณภาพเพื่อให้ผลตรวจมีความถูกต้อง แม่นยำ ตามมาตรฐานวิชาชีพ และเป็นมาตรฐานสากลเดียวกัน อย่างไรก็ตาม การควบคุมคุณภาพภายนอกสำหรับการตรวจด้วยเทคนิคนี้ยังไม่มีหน่วยงานที่เปิดให้บริการในประเทศ ดังนั้น กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติจึงได้เริ่มการพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาโดยใช้วิธี Dry Tube Culture Spot (DCS) ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างชุดตรวจคุณภาพ คือ เชื้อที่ความเข้มข้นเทียบเท่ากับ Macfarland No.1 หรือปริมาณเชื้อเท่ากับ 10(7) เซล/มิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร และการเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจโดยเตรียมตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง ๆ ละ 100 หลอด แล้วสุ่มมาทดสอบร้อยละ 12 รวมตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนเพื่อทดสอบด้วยเทคนิค Line Probe Assay: Genotype (HAIN test) และ Xpert MTB/RIF อย่างละ 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐานร้อยละ 100 และ ร้อยละ 97 ตามลำดับ

คำสำคัญ : การควบคุมคุณภาพภายนอก, วิธีอณูชีววิทยา, เชื้อวัณโรค

Development of the quality of diagnostic test for rapid molecular biology of Mycobacterium.

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

Abstract

Mycobacterium tuberculosis or TB is a leading cause of both morbidity and mortality in many countries worldwide. Thailand is one of the highest TB-burden countries and currently the estimate of the multi-drug resistant TB (MDR-TB) burden is increasing overtime. To response to fight against Mycobacterium tuberculosis epidemic in Thailand, it is a need to develop and support new technologies and strategies that would allow the expansion of prevention, diagnosis and treatment programs. Molecular technique for detecting Mycobacterium tuberculosis is an efficient tool for diagnosis and treatment of Mycobacterium tuberculosis. In Thailand, this technique has been increasingly used for diagnosis Mycobacterium tuberculosis. The high quality of laboratory results can have a positive impact on diagnosis. The External Quality Assessment (EQA) is one of the major mechanisms of to ensure the quality of laboratory according to professional standards and other international standards. However, no any agency in the country runs the EQA program for TB molecular technique. Therefore, the national TB reference laboratory has developed the EQA sample for TB molecular diagnosis test for using in external quality assessment program for TB molecular test in Thailand. To prepare the EQA sample, Dry Tube Culture Spot (DCS) is selected. The concentration of TB bacilli is by comparing with Macfarland No.1 and equal 107cell/ml. Using 0.1 ml of this solution is put in the tube and dry. We use 5 difference stains of TB to prepare DCS. Each stain was prepared 100 tubes and then random for checking 12 tubes (12%). The just in total of 60 tubes; 30 tubes were performed by using LPA: Genotype (HAIN test) and other 30 tubes using Xpert MTB/RIF test for rechecking. The result showed that 100% and 97% in comparable with standard by using LPA genotype (HAIN test) and Xpert MTB/RIF test, respectively.

Keyword : External Quality Assessment, Molecular technique, Mycobacterium tuberculosis

บทนำ

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

การย้อมเสมหะด้วยสี AFB เป็นเทคนิควิธีที่รวดเร็วสำหรับวินิจฉัย เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มของเชื้อไมโครแบคทีเรียม รวมทั้งเชื้อวัณโรค แต่ต้องใช้ทักษะและประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเทคนิคนี้ก็มีข้อจำกัดด้านความไวที่ต่ำ ปัจจุบันความก้าวหน้าด้านการวินิจฉัยวัณโรคและการตรวจการดื้อยาจะใช้การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (Liquid culture Method) หรือชุดตรวจทางอณูชีววิทยาโดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพต่อการค้นหาผู้ติดเชื้อซึ่งจะมีผลกระทบโดยตรงในการป้องกันวัณโรค

ปัจจุบันมีหน่วยงานบริการทางการแพทย์ สังกัดภาครัฐและภาคเอกชนเปิดให้บริการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาให้แก่ผู้ป่วยเพิ่มขึ้นโดยชุดตรวจที่ใช้มีหลักการ เช่น Line Probe Assay(LPA), Real time PCR และ In house จากการสนับสนุนของสำนักวัณโรค และโครงการกองทุนโลก ด้านวัณโรค ทำให้มีการขยายการตรวจวินิจฉัยวัณโรคที่รวดเร็วและยืนยันผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคดื้อยาหลายขนานด้วยโดย Real time PCR สนับสนุน Xpert MTB/RIF และ Line Probe Assay (LPA) สนับสนุนเครื่อง GT-Blot 48 (เครื่องวิเคราะห์พันธุกรรมแบบอัตโนมัติ) โดยส่วนใหญ่การตรวจวินิจฉัยด้วยเครื่อง Gene Xpert จะอยู่ที่โรงพยาบาลขนาดใหญ่แต่สำหรับ LPA: Genotype (HAIN test) จะอยู่ที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคระดับเขต ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีคุณภาพสูงจะมีผลกระทบเชิงบวกต่อผลการดำเนินงานโครงการและระบบการดูแลสุขภาพอื่น ๆ ส่งผลให้มีการพัฒนาด้านคุณภาพ ความคุ้มค่า และความยั่งยืนในระยะยาวของระบบสุขภาพของประชาชนไทย การประกันคุณภาพ (Quality Assurance) เช่น การควบคุมคุณภาพ (Quality Control) การทดสอบความสามารถและสมรรถภาพเป็นกระบวนการที่เป็นระบบสำหรับการตรวจสอบและปรับปรุงการปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ[3]

กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข โดยการสนับสนุนแหล่งทุนและวิชาการจากศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข (ศรทส.) เพื่อพัฒนาและเสริมสร้างระบบประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการวัณโรคโดยมีการศึกษาการพัฒนาชุดตรวจสำหรับใช้ในการควบคุมคุณภาพของการตรวจวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาแห่งชาติ ซึ่งดำเนินการโดยกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยา

สมมติฐานของการทดสอบ

- การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยาโดยได้ผลการทดสอบถูกต้องตรงตามเชื้อมาตรฐานทุกหลอด
- การประเมินคุณภาพการตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยาในการหาเชื้อ Mycobacterium ได้ถูกต้องตรงกับเชื้อมาตรฐานมากกว่าร้อยละ 90

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- สามารถผลิตชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ด้วยวิธีอณูชีววิทยาสำหรับใช้ในโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการด้านการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยาแห่งชาติ

- เพื่อการประเมินคุณภาพการตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยาในการหาเชื้อ Mycobacterium ได้ถูกต้องตรงกับเชื้อมาตรฐาน

วิธีการดำเนินการทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างที่ใช้ในกระบวนการวิจัยนี้ จะเป็นตัวอย่างที่เก็บรักษาอยู่ในคลังสายพันธุ์อ้างอิงเชื้อวัณโรคสำนักวัณโรค[5] โดยเป็นเชื้อ Mycobacterium ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ทั้งนี้จะไม่มีการร้องขอผู้ให้บริการผู้ป่วยเก็บตัวอย่างเพิ่ม

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยา ซึ่งจัดเตรียมโดยกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. วิธีทดสอบในการทำให้เชื้อตาย
2. วิธีทดสอบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างชุดตรวจคุณภาพ
3. วิธีทดสอบในการเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ

ขั้นตอนที่ 1 วิธีในการทำให้เชื้อตาย และวิธีการเตรียมตัวอย่าง[6]

เตรียมตัวอย่างจากเชื้อ Mycobacterium จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ ให้เชื้อมีการเจริญเติบโตและมีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ โดยดำเนินการดังนี้

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

1.2 เขี่ยเชื้อใส่ในหลอดแก้ว screwcap tube ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรที่บรรจุลูกแก้ว (glass beads) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ประมาณ 7-8 ลูก และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 หยด (ประมาณ 25 ไมโครลิตร)

1.3 นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า vortex mixer นาน 30 วินาที (จนโคโลนีของเชื้อแตกกระจายตัว)

1.4 เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 5-7 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เชื้อที่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่มตกตะกอน

1.5 ดูดสารละลายแขวนตะกอนส่วนบน ประมาณ 3 มิลลิลิตรใส่ Tube screwcap 3 dram

1.6 เทียบกับความขุ่นมาตรฐาน MacFarland No.1 โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^7 เซล/มิลลิลิตร (Stock MTB)

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

1.7.1 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจาก Stock MTB จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screwcap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 1 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^6 เซล/มิลลิลิตร

1.7.2 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screwcap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจาก เชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 2 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^5 เซล/มิลลิลิตร

1.7.3 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 2 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screwcap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 3 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^4 เซล/มิลลิลิตร

1.7.4 ดูดสารละลายแขวนตะกอนจากขวดที่ 3 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ใส่ Tube screwcap 3 dram ที่บรรจุน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ขวดที่ 4 ผสมให้เข้ากันดีจะได้สารละลายแขวนตะกอนที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^3 เซล/มิลลิลิตร

1.8 นำทุกหลอดไปต้มฆ่าเชื้อที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที[7]

1.9 นำเชื้อที่มีความเข้มข้น MacFarland No.1 และผ่านการต้มฆ่าเชื้อแล้วมาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (LJ media) และชนิดเหลว (BBL MGIT) โดยหยด ตัวอย่าง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และตัวอย่าง ๆ ละ 0.5 มิลลิลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1.10 นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่เครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติและบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 42 วัน (6 สัปดาห์) และนาน 8 สัปดาห์ ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างชุดตรวจคุณภาพ

นำตัวอย่างเชื้อจากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค[8] โดยเป็นเชื้อวัณโรค และเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 5 ตัวอย่าง โดย

2.1 ดำเนินการเหมือนข้อ 1.1 ถึง 1.8 แล้วนำเชื้อจากข้อ 1.8 ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น จำนวนตัวอย่างละ 2 หลอด โดยใส่ Cryovial tube ละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยวิธีอณูชีววิทยาคือ Real time PCR และ Line Probe Assay (LPA) เพื่อทดสอบว่าทุกตัวอย่างทุกความเข้มข้นมีเชื้อ

2.2 นำเชื้อจากข้อ 1.8 ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้นมาทำเป็น Filter Dry Tube Culture Spot (FDCS) โดยหยดตัวอย่าง ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษ Watmann No.3 ซึ่งมีขนาด 0.5 ตารางนิ้ว ที่บรรจุอยู่ใน Cryovial tube ให้ทั่ว

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

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

2.5 ทำการละลายตัวอย่างโดยนำหลอด Filter Dry Culture Spot ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น เติมน้ำปราศจาก DNA 1.2 มิลลิลิตร อบที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง คั้นกระดาษกรองออก และผสมส่วนที่เหลือให้เข้ากัน แบ่งตัวอย่างออกตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยเทคนิค Real time PCR : Xpert MTB/RIF และอีกหนึ่งหลอดส่งทำ LPA: Genotype (HAIN test)

2.6 นำหลอด Dry Tube Culture Spot ทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้น เติมน้ำปราศจาก DNA 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งตัวอย่างออกตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจด้วยเทคนิค Real time PCR: Xpert MTB/RIF และอีกหนึ่งหลอดส่งทำ LPA: Genotype (HAIN test)

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบวิธีในการเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ

เตรียมตัวอย่างจากเชื้อ MTB และ NTM จำนวน 5 ตัวอย่าง จากคลังอ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค[7] ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ ที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์โดยเตรียมเป็น Dry Tube Culture Spot (DCS) เป็นตัวอย่างละ 100 หลอด และมีการสุ่ม ร้อยละ 12 ของแต่ละตัวอย่าง เพื่อทดสอบ Homogenous testing และReproducibility testing ตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

3.1 ดำเนินการซ้ำเหมือนข้อ 1.1 ถึง 1.6 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 107 เซล/มิลลิลิตร (Stock MTB) ให้มีปริมาตรประมาณ 12 มิลลิลิตร

3.2 นำทุกหลอดไปต้มฆ่าเชื้อที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

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

3.4 สุ่มมาร้อยละ 12 เพื่อทดสอบความสม่ำเสมอของการเตรียมโดยแบ่งทดสอบทั้งเทคนิค Real time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: Genotype (HAIN test) ที่สำนักวัณโรค มูลนิธิวิจัยวัณโรคดื้อยา ศิริราชพยาบาล และสถาบันโรคทรวงอก

3.5 คำแนะนำการเตรียมตัวอย่างก่อนทำการตรวจ

3.5.1 ตัวอย่างที่ได้รับเป็นตัวอย่างเชื้อที่อบแห้ง ก่อนทำการตรวจต้องทำละลายเชื้อก่อนโดยใช้น้ำกลั่นที่ให้มากับตัวอย่างใส่ในตัวอย่าง ๆ ละ 500 ไมโครลิตร

3.5.2 ผสมตัวอย่างให้ละลายโดยใช้ Vortex Mixer จากนั้นปั่นตัวอย่างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วอย่างน้อย 5,000 รอบ/นาที อย่างน้อย 5 นาที เพื่อให้ตกตะกอน มิฉะนั้นอาจทำให้ผลการตรวจเกิดความผิดพลาดและตัวอย่างอาจไม่พอสำหรับการตรวจ

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

3.5.4 ให้ดำเนินการตรวจตัวอย่าง EQA เช่นเดียวกับงานประจำวันตามขั้นตอนปกติที่ท่านทำการตรวจตัวอย่างทั่วไป และทำการตรวจโดยผู้ที่ปฏิบัติงานประจำวันในห้องปฏิบัติการเท่านั้น

3.6 ทุกห้องปฏิบัติการดำเนินการเหมือนกัน และเมื่อดำเนินการทดสอบแล้วเสร็จส่งผลกลับมายังกลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตร วัณโรคแห่งชาติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

- ค่าร้อยละ (Percentage) ใช้สำหรับอธิบายเปรียบเทียบข้อมูลทั่วไป

- ค่ามัชฌิมาเลขคณิตหรือ ค่าเฉลี่ย (Mean) อธิบายให้ทราบถึงภาพกว้างของข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจคุณภาพการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacterium ที่รวดเร็วด้วยวิธีอณูชีววิทยา ซึ่งจะวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การทำให้เชื้อตาย ผลการทดสอบทุกตัวอย่างภายหลังจากต้มฆ่าเชื้อที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อทุกตัวอย่างที่มีความเข้มข้น MacFarland No.1 แสดงว่าเชื้อถูกฆ่าตาย

2. ปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างชุดตรวจคุณภาพ จากทุกตัวอย่าง ทุกความเข้มข้นใส่ Cryovial tube ละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 2 หลอด ที่ผ่านกระบวนการ Filter Dry Culture Spot (FDCS) และ Dry Tube Culture Spot แล้วส่งทดสอบด้วย Real time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA:Genotype (HAIN test) พบว่าเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MacFarland No.1 หรือ 10^7 เซล/มิลลิลิตร สามารถตรวจวินิจฉัยได้ถูกต้องทุกตัวอย่าง แต่เชื้อที่ถูกเจือจางไป 10^{-1} หรือเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^6 เซล/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบทั้ง Real time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: Genotype (HAIN test) พบว่าสามารถตรวจวินิจฉัยได้บางตัวอย่าง และเมื่อนำเชื้อที่ถูกเจือจางตั้งแต่ 10^{-2} เป็นต้นไป หรือมีความเข้มข้นของเชื้อ 10^5 เซล/มิลลิลิตร เป็นต้นไป

ทดสอบทั้ง Real time PCR: Xpert MTB/RIF และ LPA: Genotype (HAIN test) ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยได้ ดังนั้นความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการนำมาทำการประเมินคุณภาพจึงเลือกใช้เชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ MacFarland No.1 หรือ 10^7 เซล/มิลลิลิตร และด้วยวิธี Dry Tube Culture Spot เพราะมีขั้นตอนการดำเนินงานไม่ยุ่งยากแต่ได้ผลเหมือนกัน

3. การเตรียมเชื้อในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการส่งตรวจ ผลดังตาราง

ตารางแสดงผลการทดสอบ Homogenous testing และ Reproducibility

เชื้อมาตรฐาน		วิธีการทดสอบ (ร้อยละ)					
		LPA: HAIN MTBDRplus test			Xpert MTB/RIF		
		MTB; INH/RIF: S/S	MTB; INH/RIF:R/R	NTM	MTB; RIF : S	MTB; RIF : R	MTB not detect
MTB	INH/RIF: S/S	12(40)			11(37)		1(SPC error(3))
	INH/RIF: R/R		12(40)			12(40)	
NTM				6(20)			6(20)

หมายเหตุ S: Susceptible R: Resistant

จากตารางการทดสอบ Homogenous testing และ Reproducibility testing โดยทำการทดสอบที่กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค มูลนิธิวัณโรคดื้อยา ศิริราชพยาบาล และสถาบันโรคทรวงอก พบว่าด้วยเทคนิค LPA: Genotype (HAIN test) จำนวน 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐานคิดเป็นร้อยละ 100 สำหรับ Xpert MTB/RIF 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐาน 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97

สรุปและอภิปรายผลการทดสอบ

จากการทดสอบว่าเชื้อตายหรือไม่โดยนำเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 เซล/มิลลิลิตร ที่ผ่านการต้มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งและอาหารเลี้ยงของเชื้อทุกตัวอย่างแสดงว่าด้วยวิธีดังกล่าวเชื้อเทลว พบว่าทั้งสองวิธีหลังจากไปอบเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วไม่มีการเจริญเติบโตสามารถฆ่าเชื้อให้ตาย และวิธีการเตรียมตัวอย่างจะเห็นได้ว่าการทดลอบเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 เซล/มิลลิลิตร สามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้ง Filter Dry Culture Spot (FDCS) และ Dry Tube Culture Spot (DCS) จากผลการทดสอบสรุปว่าเลือกใช้เชื้อที่มีความเข้มข้น 10^7 เซล/มิลลิลิตร และ Dry Tube Culture Spot

(DCS) ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการดำเนินงานน้อยกว่าได้แต่ผลการทดสอบเหมือนกัน และเมื่อนำมาทดสอบความเหมาะสมในการเตรียมชุดตัวอย่างคุณภาพโดยทำการทดสอบ Homogenous testing และ Reproducibility testing จากการสุ่มตัวอย่างร้อยละ 12 ซึ่งมีตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่าง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน เพื่อทดสอบด้วยเทคนิค LPA: Genotype (HAIN test) และ Xpert MTB/RIF อย่างละ 30 ตัวอย่างโดยทำการทดสอบที่ กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค มูลนิธิวัณโรคดื้อยา ศิริราชพยาบาล และสถาบันโรคทรวงอก พบว่าด้วยเทคนิค LPA: Genotype

(HAIN test) จำนวน 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐานร้อยละ 100 สำหรับ Xpert MTB/RIF 30 ตัวอย่าง ให้ผลตรงกับเชื้อมาตรฐาน 29 ตัวอย่าง ร้อยละ 97 มีเพียงหนึ่งตัวอย่างที่แสดง SPC error จากการศึกษาการประเมินคุณภาพของ Xpert MTB/RIF ของ South Africa ในปี 2011 โดยนำเชื้อที่ตายแล้วไปหยดบนกระดาษ whatmann จำนวน 25 ไมโครลิตร แล้วตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่มีเครื่อง Xpert MTB/RIF ทั้งหมด 26 แห่ง 274 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่ามี 6 ตัวอย่าง error และ 268 ตัวอย่างให้ผลถูกต้องตรงกัน คิดเป็นร้อยละ 97.8(8) ซึ่งผลสอดคล้องกับชุดตรวจคุณภาพที่พัฒนาขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน และ คุณสมบูรณ์ หนูไข่ ที่ช่วยให้งานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักวัณโรค. **แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ.** กรุงเทพฯ: สำนัก, 2556.
2. สำนักวัณโรค. **แนวทางการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา.** กรุงเทพฯ: สำนัก, 2558.
3. Association of Public Health Laboratory. **External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy.** Washington, DC, 2002.
4. สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย. **หนังสือที่ระลึกครบรอบ 60 ปี สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.** [กรุงเทพฯ] : สมาคม, 2538.
5. บันทึกข้อความ กลุ่มปฏิบัติการอ้างอิงชั้นสูดรวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค ที่ สธ 0438.6/330 วันที่ 14 กันยายน 2558 เรื่อง **ขอความอนุเคราะห์ใช้ตัวอย่างเชื้อจากคลังสายพันธ์อ้างอิงเชื้อวัณโรค สำนักวัณโรค.**
6. ธนิดา เหรียญทอง. **มาตรฐานการปฏิบัติงานการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค.** กลุ่มห้องปฏิบัติการอ้างอิงวัณโรค สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางสัมพันธ์, 2548.
7. ธนิดา เหรียญทอง. **การตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วเพื่อบ่งชี้ลักษณะการเริ่มแสดงออกของการดื้อต่อยาไรแฟมพิซินและไอโซไนอะซิดของเชื้อวัณโรค.** กรุงเทพฯ: สำนักวัณโรค, 2551.
8. L. E. Scott, N. Gous, B. E. Cunningham, B. D. Kana, O. Perovic, L. Erasmus, et al. **Dried Culture Spots for Xpert MTB/RIF External Quality Assessment: Results of a Phase 1 Pilot Study in South Africa.** Journal of Clinical Microbiology. 2011:49(12); 4356-60.