

การทดสอบความไวต่อยาไพราซิनाไมด์ของเชื้อวัณโรคอย่างรวดเร็วจากการเปลี่ยนสีบนชุดทดสอบ
biphasic media



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

RAPID COLORIMETRIC TESTING FOR PYRAZINAMIDE SUSCEPTIBILITY OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY A BIPHASIC MEDIA ASSAY



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

| | |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การทดสอบความไวต่อยาไพราซิโนไมด์ของเชื้อวัณโรคอย่างรวดเร็วจากการเปลี่ยนสีบนชุดทดสอบ biphasic media |
| โดย | น.ส.วราภรณ์ เกื้อนสุวรรณ |
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร |

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ชาญวิทย์ ตริพุทธรัตน์)

วราภรณ์ เกื้อนสุวรรณ : การทดสอบความไวต่อยาไพราซิनाไมด์ของเชื้อวัณโรคอย่างรวดเร็ว
จากการเปลี่ยนสีบนชุดทดสอบ biphasic media. (

RAPID COLORIMETRIC TESTING FOR PYRAZINAMIDE SUSCEPTIBILITY OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY A BIPHASIC MEDIA ASSAY) อ.ที่ปรึกษาหลัก :

รศ. ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : นพ.เจริญ ชูโชติถาวร

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (PZA) ด้วยวิธีมาตรฐาน (culture-based susceptibility tests) นั้นทำได้ยาก เนื่องจากสภาวะเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เกิดผลลบและผลบวกหลง การศึกษานี้มุ่งเน้นศึกษาและพัฒนาชุดทดสอบสำหรับใช้วินิจฉัยเชื้อดื้อยา PZA ในเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ด้วยชุดทดสอบ colorimetric biphasic medium assay ที่ผสม Nicotinamide (NIC-CBMA) ความเข้มข้น 250, 500, 1000 และ 2000 µg/mL และวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา PZA ในยีน *pncA*, *rpsA* และ *panD* ผลการทดสอบในเชื้อวัณโรคคือยาทั้งหมด 150 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อดื้อยา PZA 40 สายพันธุ์ และเชื้อไวต่อยา PZA 110 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 พบว่าความเข้มข้นของ NIC ≥ 1000 µg/mL เหมาะสมสำหรับใช้วินิจฉัยเชื้อดื้อยา PZA ด้วยวิธี NIC-CBMA ซึ่งมีความไวของชุดทดสอบเท่ากับ 100% ความจำเพาะเท่ากับ 96.36% เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 นอกจากนี้พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา PZA จำนวน 28 แบบ ในเชื้อจำนวน 37 จาก 40 สายพันธุ์ที่ดื้อยา PZA เป็นการกลายพันธุ์แบบ Nonsynonymous 57.89% การกลายพันธุ์แบบ Indels 21.05% การกลายพันธุ์บริเวณ Promoter 13.16% การกลายพันธุ์แบบ Nonsense 5.26% และการกลายพันธุ์แบบ Double mutation 2.63% นอกจากนี้พบการกลายพันธุ์ใหม่จำนวน 4 แบบ แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *rpsA* และ *panD* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา ชุดทดสอบ NIC-CBMA เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยา PZA ที่รวดเร็วและให้ผลที่น่าเชื่อถือ ชุดทดสอบมีราคาไม่แพงและสามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งที่มีอยู่ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำวันเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมในการรักษาวัณโรคคือยาหลายขนาน และสามารถลดการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้

| | | |
|------------|-------------------------------|----------------------------------|
| สาขาวิชา | วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล | ลายมือชื่อนิสิต |
| | ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา | |
| | ภูมิคุ้มกัน | |
| ปีการศึกษา | 2562 | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก |
| | | ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม |

5976670237 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Mycobacterium tuberculosis, biphasic medium assay, Pyrazinamide, pncA

Waraporn

Thuansuwan

:

RAPID COLORIMETRIC TESTING FOR PYRAZINAMIDE SUSCEPTIBILITY OF

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY A BIPHASIC MEDIA ASSAY. Advisor: Assoc. Prof.

NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D. Co-advisor: Charoen Chuchottaworn, M.D.

Standard culture-based pyrazinamide (PZA) susceptibility tests are difficult to perform as a result of acidic conditions in culture media leading to false susceptible and resistant. In this study, a novel colorimetric biphasic medium assay was developed for the rapid detection of PZA resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide (NIC-CBMA) at four different concentrations (250, 500, 1000 and 2000 µg/mL), and analyzed mutations associated with PZA resistance in *pncA*, *rpsA* and *panD* genes. From 150 multidrug-resistant tuberculosis strains, 40 PZA-resistant (PZA^R) and 110 PZA-susceptible (PZA^S) were identified by BACTEC MGIT 960. While using a concentration of NIC ≥1000 µg/mL as the cutoff for defined resistance, NIC-CBMA demonstrated sensitivity of 100%, specificity of 96.36% compared to the BACTEC MGIT 960 method. DNA sequencing of the *pncA* gene revealed 28 different mutations in 37 out of 40 PZA^R isolates comprising of 57.89% of nonsynonymous mutations, 21.05% of Indels mutations, 13.16% of mutations in the promoter region, 5.26% of nonsense mutations and 2.63% of double mutations. Four novel *pncA* mutations were detected. But no mutations associated PZA resistance were detected in the *rpsA* and *panD* genes. The NIC-CBMA serves as a rapid and reliable test for PZA susceptibility testing. The test is not expensive, easily prepared in laboratory using the existing medias and may be applied for routine diagnosis, which could guide an appropriate treatment for multidrug-resistant tuberculosis patients and reduces the transmission.

Field of Study: Molecular Science of Medical Student's Signature

Microbiology and Immunology

Academic Year: 2019

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จากความอนุเคราะห์และความช่วยเหลือจากคณะบุคคลต่าง ๆ อันได้แก่ รองศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้กรุณามอบความรู้ คำแนะนำ ติดตามความก้าวหน้าวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการเขียนรายงานและรูปเล่มวิทยานิพนธ์ รวมไปถึงได้สนับสนุนและมอบโอกาสให้ผู้วิจัยได้มีประสบการณ์ในการทำวิจัยและนำเสนอผลงานในต่างประเทศ ได้ให้ความช่วยเหลือและความเอาใจใส่ในทุกด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาแนะนำแนวทางหัวข้อในการทำวิทยานิพนธ์ กรุณามอบความรู้ คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ไขปัญหาตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ Yasuhiko Suzuki รองศาสตราจารย์ Chie Nakajima และบุคลากรทุกท่านที่ Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำแนะนำ สนับสนุน ดูแลและช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ณ ประเทศญี่ปุ่น

ขอขอบพระคุณนางสาวสุมล เต็มเศรษฐเจริญและนางจิรกานต์ ปุญญโสพรรณ หัวหน้าห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและห้องปฏิบัติการมัยโคแบคทีเรีย สถาบันโรคทรวงอก ที่ได้อนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ แนวความคิด และประสบการณ์ในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วนจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช งบประมาณ 2560 (ครั้งที่ 22) สัญญาเลขที่ CU-GR_60_43_37_02 ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยและคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาโทหาบัณฑิตเสนอผลงานวิชาการในต่างประเทศ และ ทุนสนับสนุนนิสิตไปทำวิจัยในต่างประเทศ ภายใต้ทุนเสริมรากฐานการวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ณ Division of Bioresources, Research Center for Zoonosis Control มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ระยะเวลา 1 เดือน

ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้านเพื่อศึกษาต่อ และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ณ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาต่าง ๆ จึงขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

วารารณณ์ เกื้อนสุวรรณ

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| | ค |
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ค |
| | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ง |
| กิตติกรรมประกาศ..... | จ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| สารบัญตาราง..... | ฌ |
| สารบัญรูปภาพ..... | ฎ |
| บทที่ 1..... | 1 |
| บทนำ..... | 1 |
| 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 2. คำถามการวิจัย..... | 6 |
| 3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... | 7 |
| 4. สมมติฐานการวิจัย..... | 7 |
| 5. ขอบเขตของงานวิจัย..... | 7 |
| 6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 8 |
| บทที่ 2..... | 10 |
| เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 10 |
| 1. ประวัติศาสตร์ของวัณโรค..... | 10 |
| 2. อุบัติการณ์และระบาดวิทยาของวัณโรค..... | 11 |
| 3. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อวัณโรค..... | 14 |

| | |
|---|----|
| 4. การติดเชื้อและพยาธิสภาพของวัณโรคปอด | 16 |
| 5. การรักษาวัณโรคและยาต้านวัณโรค | 18 |
| 6. วัณโรคดื้อยา | 20 |
| 7. การตรวจวินิจฉัยวัณโรค | 23 |
| 8. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค (Drug susceptibility testing: DST) | 32 |
| 9. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยา..... | 39 |
| 10. รีดอกซ์อินดิเคเตอร์ (redox indicator)..... | 43 |
| 11. ยา Pyrazinamide (PZA, Z)..... | 48 |
| 12. นิโคตินาไมด์ (Nicotinamide: NIC)..... | 50 |
| 13. อุบัติการณ์การดื้อยา Pyrazinamide..... | 53 |
| 14. กลไกการดื้อยา Pyrazinamide | 54 |
| 15. การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรค..... | 56 |
| บทที่ 3 | 62 |
| วิธีดำเนินการวิจัย..... | 62 |
| 1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน | 62 |
| 2. เครื่องมือ..... | 63 |
| 3. การออกแบบงานวิจัย | 64 |
| 4. วิธีการทดลอง | 65 |
| บทที่ 4..... | 82 |
| ผลการดำเนินการวิจัย..... | 82 |
| 1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา..... | 82 |
| 2. ความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit..... | 85 |
| 3. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> โดยวิธีการต้ม | 88 |
| 4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>pncA</i> ด้วยเทคนิค PCR..... | 88 |

| | |
|--|-----|
| 5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>pncA</i> ด้วยเทคนิค DNA Sequencing..... | 89 |
| 6. การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit โดย การลดปริมาณเชื้อในการทดสอบความไวต่อยา (AST inoculum)..... | 96 |
| 7. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> ด้วยเทคนิค PCR..... | 98 |
| 8. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> ด้วยเทคนิค DNA Sequencing..... | 99 |
| 9. ผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยชุดทดสอบ Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay (NIC-CBMA)..... | 100 |
| 10. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ(Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของการทดสอบ ความไวต่อยา Pyrazinamide..... | 112 |
| บทที่ 5..... | 114 |
| อภิปรายและสรุปผล..... | 114 |
| บทที่ 6..... | 129 |
| สรุปผลการทดลอง..... | 129 |
| ภาคผนวก ก..... | 132 |
| ภาคผนวก ข..... | 135 |
| บรรณานุกรม..... | 141 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 149 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 กลไกการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรค | 22 |
| ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อและระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด..... | 27 |
| ตารางที่ 3 แสดงการแยกพิสูจน์เชื้อวัณโรค (MTB) ออกจากเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่น ๆ (NTM)..... | 28 |
| ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($\mu\text{g/mL}$) ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค | 37 |
| ตารางที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด biphasic media ชนิดต่าง ๆ..... | 43 |
| ตารางที่ 6 แสดงงานวิจัยที่ใช้เทคนิค colorimetric redox indicator assay ในการทดสอบความไวต่อยาแบบพีโนไทป์ | 48 |
| ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide | 61 |
| ตารางที่ 8 การจำแนกเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ออกจากเชื้อในกลุ่ม <i>M. tuberculosis complex</i> (MTBC) โดยการทดสอบทางชีวเคมี | 68 |
| ตารางที่ 9 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้..... | 71 |
| ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของเทคนิค NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 | 81 |
| ตารางที่ 11 รูปแบบการดื้อยาต้านวัณโรคของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Absolute concentration..... | 84 |
| ตารางที่ 12 ผลความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit | 87 |
| ตารางที่ 13 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> ในเชื้อวัณโรคทั้งหมด 122 สายพันธุ์ .91 | |
| ตารางที่ 14 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> ในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (47 สายพันธุ์) | 92 |
| ตารางที่ 15 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> ในเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (75 สายพันธุ์) | 93 |

| | |
|--|-----|
| ตารางที่ 16 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> ที่พบในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (38 สายพันธุ์)..... | 94 |
| ตารางที่ 17 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> ที่พบในเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (14 สายพันธุ์)..... | 96 |
| ตารางที่ 18 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit ตามวิธีมาตรฐานและวิธีการลดปริมาณเชื้อในการทดสอบความไวต่อยา (AST inoculum)..... | 97 |
| ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์กับการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> | 98 |
| ตารางที่ 20 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpsA</i> และ <i>panD</i> ที่พบในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide และไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | 100 |
| ตารางที่ 21 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ redox indicator (STC) ในชุดทดสอบ NIC-CBMA..... | 103 |
| ตารางที่ 22 การหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA..... | 104 |
| ตารางที่ 23 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน <i>pncA</i> ยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> | 111 |
| ตารางที่ 24 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดทดสอบ NIC-CBMA เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit..... | 112 |
| ตารางที่ 25 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดทดสอบ NIC-CBMA เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit ที่ลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ลง..... | 113 |
| ตารางที่ 26 สรุปผลการทดสอบการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อตรวจด้วยวิธี BACTEC MGIT960 PZA kit และชุดการทดสอบ NIC-CBMA และการหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีน <i>pncA</i> , ยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> | 135 |



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

| | |
|---|----|
| ภาพที่ 1 แผนที่แสดงอุบัติการณ์วัณโรค (ต่อประชากรแสนคน) ในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกในปี พ.ศ. 2561..... | 12 |
| ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> (ซ้าย) และลักษณะของเชื้อเมื่อย้อมด้วยสีทนกรดตามวิธี Ziehl Neelsen ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ขวา) | 15 |
| ภาพที่ 3 แสดงการเพาะเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด biphasic media ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ โดยใช้เชื้อความเข้มข้น 10^7 ถึง 10^0 CFU/mL (ขวดที่ 1 ถึง 8 ตามลำดับ) | 42 |
| ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร MTT เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases..... | 44 |
| ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร MTS เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วย PES | 45 |
| ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร CTC เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases | 45 |
| ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร TTC เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases | 46 |
| ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร STC..... | 47 |
| ภาพที่ 9 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>M. fortuitum</i> ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่ใช้ STC ในการตรวจวัดการเจริญ..... | 47 |
| ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสี Resazurin เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenase | 48 |
| ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของยา Pyrazinamide ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Nicotinamide (A) และยา Pyrazinamide เปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปพร้อมทำงานเป็น Pyrazinoic acid โดยเอนไซม์ Pyrazinamidase ที่ควบคุมการสร้างโดยยีน <i>pncA</i> (B) | 49 |
| ภาพที่ 12 กลไกและเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา Pyrazinamide | 50 |
| ภาพที่ 13 ลักษณะโครงสร้างของ Nicotinamide, Nicotinic acid, ยา Pyrazinamide และยา Isoniazid..... | 52 |
| ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยา Hydrolysis ของสาร Nicotinamide (NAM) และ Pyrazinamide (PZA) ด้วยเอนไซม์ Pyrazinamidase ได้ Nicotinic acid (NA) และ Pyrazinoic acid (POA) | 52 |

| | |
|--|-----|
| ภาพที่ 15 แสดงภาพจำลองโมเลกุลของเอนไซม์ Pyrazinamidase (a) และ Nicotinamidase (b) ในการจับกับ Nicotinamide (NAM)..... | 53 |
| ภาพที่ 16 แสดงอุบัติการณ์การดื้อยา Pyrazinamide ในเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> จากภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก..... | 54 |
| ภาพที่ 17 แผนภูมิแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide สามารถพบได้ตลอดทั้งยีน <i>pncA</i> โดยส่วนใหญ่พบในตำแหน่งโคดอนที่ 3-17, 61-85 และ 132-142..... | 55 |
| ภาพที่ 18 แสดงชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่ประกอบด้วยอาหาร biphasic medium 5 หลอด มีความเข้มข้นของ Nicotinamide เท่ากับ 0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ตามลำดับ | 77 |
| ภาพที่ 19 แสดงจำนวนสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาต้านวัณโรคแต่ละชนิด..... | 83 |
| ภาพที่ 20 แสดงจำนวนเชื้อวัณโรคดื้อยาแต่ละประเภทที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอก | 85 |
| ภาพที่ 21 สัดส่วนการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> (150 สายพันธุ์) เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit..... | 86 |
| ภาพที่ 22 แสดงจำนวนวัณโรคที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide แยกตามประเภทของสายพันธุ์ดื้อยา | 87 |
| ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>pncA</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่มีขนาดของผลผลิตเท่ากับ 871 คู่เบส บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้น Agarose 1.5%..... | 89 |
| ภาพที่ 24 แผนผังแสดงจำนวนเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ทำการทดสอบความไวต่อยา PZA ด้วยวิธี MGIT และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>pncA</i> ด้วยเทคนิค DNA Sequencing..... | 90 |
| ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>rpsA</i> และ <i>panD</i> ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่มีขนาดของผลผลิตเท่ากับ 1,601 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้น Agarose 1.5 % | 99 |
| ภาพที่ 26 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของสาร Nicotinamide ต่อ redox indicator (STC)..... | 101 |
| ภาพที่ 27 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ของเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> H37Rv เมื่อป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| ภาพที่ 28 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ของเชื้อ <i>M. bovis</i> BCG ATCC 37534 เมื่อป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน..... | 106 |
| ภาพที่ 29 จำนวนเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> และค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA..... | 107 |
| ภาพที่ 30 แสดงจำนวนเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> ที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน BECTEC MGIT PZA kit และความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA | 108 |



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) ซึ่งเป็นโรคที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุข โดยมีผลกระทบต่อสุขภาพและเศรษฐกิจทั่วโลกมานานกว่า 200 ปี องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ประกาศให้วัณโรคเป็นภาวะฉุกเฉินที่ต้องการการแก้ไขอย่างเร่งด่วนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถควบคุมสถานการณ์การแพร่ระบาดได้ โดยในปี พ.ศ. 2561 คาดประมาณว่ามีผู้ติดเชื้อรายใหม่ทั่วโลกประมาณ 10 ล้านคน ในจำนวนนี้ 8.6% มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วยและมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้ประมาณ 1.5 ล้านคน ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปแอฟริกา สำหรับประเทศไทยองค์การอนามัยโลกจัดให้อยู่ในกลุ่ม 14 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรค ปัญหาวัณโรคร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวีและปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานสูง โดยคาดการณ์ว่ามีผู้ติดเชื้อรายใหม่ 106,000 รายหรือคิดเป็นอัตราอุบัติการณ์ 153 ต่อประชากรแสนคน สูงกว่าประเทศตะวันตกบางประเทศถึง 30 เท่า ทำให้ต้องสูญเสียรายได้กว่า 1,500 ล้านบาทต่อปี (1) โดยกลุ่มประชากรที่มีภาวะเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น ผู้ป่วยโรคเรื้อรังหรือผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ผู้ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ต้องขังในเรือนจำ แรงงานข้ามชาติ เป็นต้น วัณโรคสามารถติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศโดยการหายใจเอาละอองเสมหะที่เกิดจากการไอ จามของผู้ป่วย เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วระบบภูมิคุ้มกันจะทำหน้าที่ป้องกันการเจริญของเชื้อ ทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีอาการผิดปกติ มีเพียง 10% เท่านั้นที่จะป่วยเป็นวัณโรค (Active TB) เรียกระยะที่ผู้ป่วยไม่มีอาการและไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ว่า วัณโรคระยะแฝง (Latent TB) โดยทั่วโลกมีผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงประมาณ 1.7 พันล้านคนหรือคิดเป็นร้อยละ 23 ของประชากรโลก (2)

วัณโรคสามารถเป็นได้ทุกอวัยวะ แต่ที่พบมากที่สุดคือวัณโรคปอด คิดเป็น 80% ของวัณโรคทั้งหมด อาการแสดงของวัณโรคปอดมีมากมายและไม่จำเพาะ เช่น อาการไอเรื้อรัง เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีไข้หรือเหงื่อออกตอนกลางคืน เจ็บหน้าอกและหายใจลำบาก ส่วนการติดเชื้อวัณโรคนอกปอดทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ได้มากมายขึ้นกับตำแหน่งอวัยวะที่ติดเชื้อ เช่น วัณโรคสมองจะมีอาการ

ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน และอาการคอแข็ง ส่วนวัณโรคกระดูกสันหลังจะพบกระดูกสันหลังผิดปกติและอ่อนแรงที่ขาทั้งสองข้าง เป็นต้น (3) ในปัจจุบันวัณโรคสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการกินยาติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 เดือนสำหรับเชื้อที่ไวต่อยา และ 9 ถึง 20 เดือนสำหรับวัณโรคที่ดื้อยา โดยยารักษาวัณโรคแบ่งเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ ยาวัณโรคแนวที่ 1 (First line drugs) ได้แก่ ยา Isoniazid (H) ยา Rifampicin (R) ยา Pyrazinamide (Z) ยา Ethambutol (E) และ ยา Streptomycin (S) ยากลุ่มนี้จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดและผลข้างเคียงของยาน้อย เหมาะสำหรับผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ที่ไม่มีความเสี่ยงต่อการดื้อยา ยาวัณโรคแนวที่ 2 (Second line drugs) เช่น ยา Capreomycin (Cm) ยา para-aminosalicylic acid (PAS) ยา Cycloserine (Cs) ยา กลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ ยา Kanamycin (Km) ยา Amikacin (Am) ยา กลุ่ม Fluoroquinolones ได้แก่ ยา Levofloxacin (Lfx) ยา Moxifloxacin (Mfx) เป็นต้น ยากลุ่มนี้ใช้ในการรักษาวัณโรคดื้อยา ซึ่งมีผลข้างเคียงของยาสูงและมีราคาแพงกว่ายารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (5)

สถานการณ์ของวัณโรคดื้อยาเป็นปัญหาที่พบมายาวนานกว่า 50 ปี และกำลังเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบต่อ การควบคุมวัณโรค โดยมีการรายงานพบวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistant tuberculosis: MDR-TB) คือเชื้อที่ดื้อต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษา ได้แก่ ยา Isoniazid และยา Rifampicin พร้อมกัน และเมื่อมีการนำยากลุ่ม Fluoroquinolones มาใช้ในปี พ.ศ. 2533 ก็ทำให้เกิดปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensive drug resistant tuberculosis: XDR-TB) ซึ่งหมายถึงเชื้อ MDR-TB ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Fluoroquinolones และยากลุ่ม Second-line injectable พร้อมกัน โดยในปี พ.ศ. 2561 องค์การอนามัยโลกคาดว่า มีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา Rifampicin (RR-TB) ประมาณ 484,000 รายทั่วโลก ในจำนวนนี้ 78% เป็นผู้ป่วย MDR-TB และ 6.2% เป็นผู้ป่วย XDR-TB ทำให้การรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ทำได้ยากขึ้น (1) ความเสี่ยงต่อการป่วยเป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (risk of developing MDR-TB) ส่วนใหญ่เกิดจากระบบการดูแลรักษาและควบคุมวัณโรคที่ไม่มีประสิทธิภาพ เช่น ความสามารถในการวินิจฉัย MDR-TB ไม่ดีพอ การสัมผัสกับผู้ป่วย MDR-TB การเลือกใช้สูตรยาในการรักษาไม่เหมาะสมรวมทั้งขาดระบบการดูแลกำกับ การรับประทานยาที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ป่วยได้รับยาไม่สม่ำเสมอหรือขาดยา เชื้อจึงเกิดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อดื้อยา (6) การรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ต้องใช้ระยะเวลายาวนานและค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ผู้ป่วยมีโอกาสรักษาหายเพียง 56% เนื่องจากผลข้างเคียงของยาสูง (1) ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและควบคุมสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยา โดยทางเลือกหนึ่งคือ ผู้ป่วยควรได้รับการตรวจ

วินิจฉัยรูปแบบการดื้อยาที่รวดเร็ว นำเชื้อถือ และครอบคลุมยารักษาวัณโรคแต่ละชนิดก่อนได้รับการรักษา เพื่อให้แพทย์ใช้เป็นแนวทางในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมแก่ผู้ป่วย (7, 8)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีบทบาทสำคัญในการช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยวัณโรคและควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรค โดยการตรวจเสมหะหาเชื้อติดสีทึบกรด (Acid fast bacilli: AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวของเชื้อต่อยารักษาวัณโรค ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคได้รับการค้นหาและการรักษาที่เหมาะสม ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยารักษาวัณโรคให้มีประสิทธิภาพและให้ผลรวดเร็ว เช่น ยา Isoniazid และยา Rifampicin ในขณะที่ยาบางชนิดยังขาดวิธีการทดสอบที่มีประสิทธิภาพและไม่นิยมทำในงานประจำ โดยเฉพาะยา Pyrazinamide (9) ซึ่งเป็นยาวัณโรคแนวที่ 1 ที่สำคัญ องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้เป็นยาหลักร่วมกับยาชนิดอื่นในการรักษาวัณโรคที่ไวต่อยาและวัณโรคดื้อยา เนื่องจากยามีคุณสมบัติ Sterilizing activity สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อที่ไม่เจริญแบ่งตัว (Non-replicating persisters) ซึ่งไม่ตอบสนองกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น ๆ ทำให้ลดระยะเวลาการรักษาจากเดิม 9 ถึง 12 เดือนเหลือเพียง 6 เดือน และสามารถลดอัตราการกลับเป็นโรคซ้ำ (10) ดังนั้นการวินิจฉัยความไวต่อยา Pyrazinamide จึงมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสูตรยามาตรฐานระยะสั้น 6 เดือนนั้นจะได้ผลสัมฤทธิ์เฉพาะในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวต่อยา Pyrazinamide (Pyrazinamide-susceptible tuberculosis: Z^S-TB) เท่านั้น ในกรณีที่เป็นเชื้อที่ดื้อเฉพาะยา Pyrazinamide (Pyrazinamide-resistant tuberculosis: Z^R-TB) การใช้สูตรยามาตรฐานระยะสั้น 6 เดือน ไม่สามารถใช้รักษาวัณโรคให้หายขาดได้ หากเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ยังไวต่อยา Pyrazinamide (Pyrazinamide-susceptible-MDR-TB: Z^S-MDR-TB) สามารถใช้สูตรยาในการรักษาเพียง 9 เดือน จากสูตรเดิมที่ใช้เวลาในการรักษาถึง 2 ปี แต่หากเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (Pyrazinamide-resistant-MDR-TB: Z^R-MDR-TB) มักให้ผลการรักษาไม่ดีขึ้น การรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนานจึงควรแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Z^R-MDR-TB และ Z^S-MDR-TB เพื่อที่จะสามารถพิจารณาเลือกใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยให้เหมาะสม (11) อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ของยา Pyrazinamide ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าเมื่อยาแพร่เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วเอนไซม์ Pyrazinamidase (PZase) ที่สร้างขึ้นจากเชื้อวัณโรคจะเปลี่ยนยาเป็น Pyrazinoic acid (POA) ที่สามารถไปยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเชื้อ เช่น ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและกรดไขมัน ยับยั้งการสร้าง Pantothenate และ Co-enzyme A ครอบคลุมการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด (10, 12)

ในปัจจุบันพบการรายงานการดื้อต่อยา Pyrazinamide ไม่มากนัก เนื่องจากการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน (Conventional culture medium) ทำได้ยาก ซับซ้อน การทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันหรือทดสอบซ้ำ ๆ อาจให้ผลที่แตกต่างกัน ผลการทดสอบจึงมีความน่าเชื่อถือต่ำ (13) โดยวิธีที่นิยมทำกันมี 2 วิธี ได้แก่ วิธี Proportion method ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Lowenstein-Jensen medium หรือ Middlebrook 7H10 ที่มียาเข้มข้น 25 ถึง 50 $\mu\text{g/mL}$ กับอาหารที่ไม่มียา โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มี pH 5.5 เพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการออกฤทธิ์ของยา ที่สภาวะนี้เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้เกิดผลลบลวง (False susceptible) และอีกวิธีหนึ่งคือการทดสอบด้วยวิธี Radiometric susceptibility ของเครื่องกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460TB ซึ่งตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดสารกัมมันตภาพรังสีคาร์บอน 14 ในอาหารเหลวชนิด 7H12 radiometric medium ที่มียาเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ที่ pH 6.0 ในสภาวะนี้จะไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค จึงให้ผลการทดสอบที่มีความน่าเชื่อถือ (4) ต่อมามีการพัฒนาชุดทดสอบที่ปลอดภัยกว่าคือเครื่อง BACTEC MGIT 960 ซึ่งวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยตรวจจับการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเมื่อเชื้อเจริญเติบโตและมีการใช้ออกซิเจน ให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือเช่นเดียวกัน ทางสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) จึงแนะนำให้เป็วิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (14, 15) ข้อเสียของวิธีเหล่านี้คือต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง ไม่เหมาะกับประเทศที่มีรายได้น้อยและห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก และเกิดผลลบลวง (False resistance) จากการเติมเชื้อปริมาณมากลงในอาหารทดสอบได้ (10, 12, 16) ต่อมาเริ่มมีการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยาแบบวิธีจีโนมไทป์ คือการตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น ยีน *pncA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Pyrazinamidase (Pzase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกระตุ้นให้ยาอยู่ในรูปที่พร้อมทำงานได้ เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ประมาณ 70% ถึง 97% จะพบการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ (10, 17) โดยสามารถพบรูปแบบการกลายพันธุ์ได้หลากหลายตลอดทั้งยีน เช่น การแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวในบริเวณดีเอ็นเอที่ถอดรหัส (Missense และ Nonsense) การแทรกเข้าและขาดหายไปของดีเอ็นเอ (Indels) (9) เป็นต้น นอกจากนี้มีการรายงานพบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide บนยีนใหม่ ๆ เช่น ยีน *rpsA* ที่ถอดรหัสเป็นโปรตีน Ribosomal S1 ซึ่งเป็นหนึ่งในตำแหน่งเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา หรือยีน *panD* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์

Aspartate alpha-decarboxylase มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง β -alanine ที่เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ Pantothenate และ Co-enzyme A ซึ่งเป็นเป้าหมายหนึ่งในการออกฤทธิ์ของยา (12) แต่พบได้ไม่บ่อยในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide จึงนิยมตรวจหาการดื้อยานี้ โดยการหาตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ด้วยเทคนิค DNA sequencing ซึ่งให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว มีความไวในการทดสอบประมาณ 83% ถึง 90% (9, 18) แต่เทคนิคดังกล่าวต้องอาศัยเครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง อันเป็นข้อจำกัดของการใช้งานโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาและสามารถวินิจฉัยการดื้อยาจากกลไกกลายพันธุ์บนยีน *pncA* เพียงกลไกเดียวเท่านั้น ปัจจุบันมีวิธีการทดสอบความไวต่อยาที่พัฒนาขึ้นให้มีประสิทธิภาพดีและลดข้อจำกัดของวิธีมาตรฐาน เรียกว่า non-commercial methods เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและราคาไม่แพง แต่วิธีเหล่านี้มีแนวโน้มจะเกิดความผิดพลาดได้มาก เนื่องจากขาดการวางมาตรฐานการทดสอบ จึงต้องอาศัยการอบรมและการฝึกปฏิบัติที่พอเหมาะ อย่างไรก็ตามองค์การอนามัยโลกได้ตรวจสอบและยอมรับเทคนิคที่สามารถใช้ได้ในห้องปฏิบัติการระดับอ้างอิง ได้แก่ วิธี Microscopic observation drug susceptibility assay (MODS) ซึ่งเป็นการตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพิเศษ เทคนิค Colorimetric redox indicator เป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนสีของ redox indicator ที่สัมพันธ์กับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตในอาหารทดสอบผสมยา และเทคนิค Nitrate reductase assay (NRA) เป็นการตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคจากความสามารถของเชื้อในการทำปฏิกิริยารีดิวส์ไนเตรท ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารทดสอบ (19, 20) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อวัณโรคที่ใช้สำหรับการทดสอบความไวต่อยามีหลายประเภท เช่น อาหารชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium (LJ) ที่มีความจำเพาะสูงแต่ให้ผลการทดสอบที่ล่าช้า หรืออาหารชนิดเหลว Middlebrook 7H9 medium ที่มีความไวสูงแต่มีราคาแพงกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อวัณโรคบางสายพันธุ์ไม่เจริญหรือเจริญได้ไม่ดีในอาหารแข็งและบางสายพันธุ์ไม่เจริญหรือเจริญได้ไม่ดีในอาหารเหลว (21) จึงได้มีการพัฒนาอาหารผสมชนิดแข็งและเหลว biphasic medium ที่สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งมีราคาถูกกว่าการใช้อาหารทดสอบสำเร็จรูป (22) อย่างไรก็ตามยังมีการประยุกต์ใช้ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide จำนวนน้อย เนื่องจากต้องปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะกรด ต่อมาจึงมีการศึกษาและพัฒนาวิธีทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยใช้ Nicotinamide (NIC) ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกันทดแทน โดย NIC จะออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้ในสภาวะค่า pH เป็นกลาง จึงสามารถลดความผิดพลาดของผลการทดสอบที่มี

สาเหตุจากสภาวะกรดของอาหารทดสอบที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยมีการนำมาประยุกต์ใช้กับวิธี Resazurin microtiter assay (REMA) ซึ่งให้ความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 98% (23) และเทคนิค NRA ให้ความไว 93.8% และความจำเพาะ 97.7% (24)

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นศึกษาและพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ให้มีประสิทธิภาพ โดยใช้อาหารทดสอบชนิด Colorimetric biphasic medium ที่ผสม Nicotinamide สำหรับใช้วินิจฉัยเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide โดยไม่จำเป็นต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะกรด ทำให้ลดอัตราการเกิดผลบวกและลบลง อีกทั้งเป็นอาหารทดสอบที่เตรียมได้ง่าย มีราคาถูก เหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานประจำวัน โดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือหรืออุปกรณ์จำเพาะที่มีราคาแพง สามารถประยุกต์ใช้สำหรับการทดสอบความไวต่อยาโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งวินิจฉัยหาการกลายพันธุ์ของยีนที่ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยา Pyrazinamide ได้แก่ ยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้เทคนิค DNA sequencing เพื่อให้เข้าใจกลไกการดื้อยาในระดับยีน นอกจากนี้ยังศึกษาถึงอัตราความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคในสถาบันโรคทรวงอก ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการดื้อยา Pyrazinamide และใช้เป็นแนวทางในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน สามารถลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาจากการได้รับยาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่เพียงพอ

2. คำถามการวิจัย

- 2.1 สามารถพัฒนาชุดทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้เทคนิค Nicotinamide-colorimetric biphasic media assay (NIC-CBMA) ได้อย่างไร
- 2.2 ชุดทดสอบ NIC-CBMA มีประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเท่าใดเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit
- 2.3 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยจากสถาบันโรคทรวงอกเป็นอย่างไร
- 2.4 อัตราความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคดื้อยาในสถาบันโรคทรวงอกเป็นเท่าใด

3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 3.1 เพื่อพัฒนาชุดทดสอบ NIC-CBMA สำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis*
- 3.2 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit
- 3.3 เพื่อศึกษาหารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pnca* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยจากสถาบันโรคทรวงอก
- 3.4 เพื่อศึกษาถึงอัตราความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคดื้อยาในสถาบันโรคทรวงอก

4. สมมติฐานการวิจัย

- 4.1 ชุดทดสอบ NIC-CBMA สามารถใช้สำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้
- 4.2 ชุดทดสอบ NIC-CBMA มีประสิทธิภาพในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้เทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit
- 4.3 สามารถพบรูปแบบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide ในยีน *pnca* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Pyrazinamide
- 4.4 อัตราความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide มีมากขึ้นในเชื้อวัณโรคดื้อยาในสถาบันโรคทรวงอก

5. ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 150 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเชื้อทั้งหมดเพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอกที่ผ่านการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT64 (SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid test, บริษัท Standard Diagnostics จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้) และได้รับการวินิจฉัยเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน

(MDR-TB) ด้วยวิธี Absolute concentration ในยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Ethambutol ยา Streptomycin ยา Kanamycin ยา Ofloxacin ยา Levofloxacin และยา Moxifloxacin ทำการเก็บเชื้อดังกล่าวตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 ถึง พ.ศ. 2561 เชื้อทุกสายพันธุ์นำมาทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของเชื้อบริเวณยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค DNA sequencing และพัฒนาชุดทดสอบ Nicotinamide-colorimetric biphasic media assay (NIC-CBMA) สำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยการหาความเข้มข้นวิกฤตของ Nicotinamide ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide นำผลการทดสอบของ NIC-CBMA มาเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และการดื้อยาโดยเทคนิค DNA sequencing เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค NIC-CBMA ที่ได้พัฒนาขึ้น

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 6.1 ได้วิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว สามารถอ่านและแปลผลได้ง่าย มีความไวความจำเพาะเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit
- 6.2 ได้วิธีทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่สามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ ราคาถูกและไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ทำให้ผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่าง ๆ ได้รับการตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide เพื่อรับการรักษาที่ถูกต้องเหมาะสม ลดอัตราการรักษาล้มเหลว อัตราการเสียชีวิต และช่วยควบคุมอัตราการเกิดวัณโรคดื้อยาหลายขนานได้
- 6.3 ทราบรูปแบบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอก เพื่อให้เข้าใจกลไกการดื้อยาในระดับยีน
- 6.4 ทราบถึงอัตราความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคในสถาบันโรคทรวงอก ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการดื้อยา Pyrazinamide และใช้เป็นแนวทางใน

การเลือกสูตรยาที่เหมาะสมในการรักษาวัณโรคคือยาหลายขนาน สามารถลดโอกาสการเกิด
เชื้อดื้อยาจากการได้รับยาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่เพียงพอ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ประวัติศาสตร์ของวัณโรค

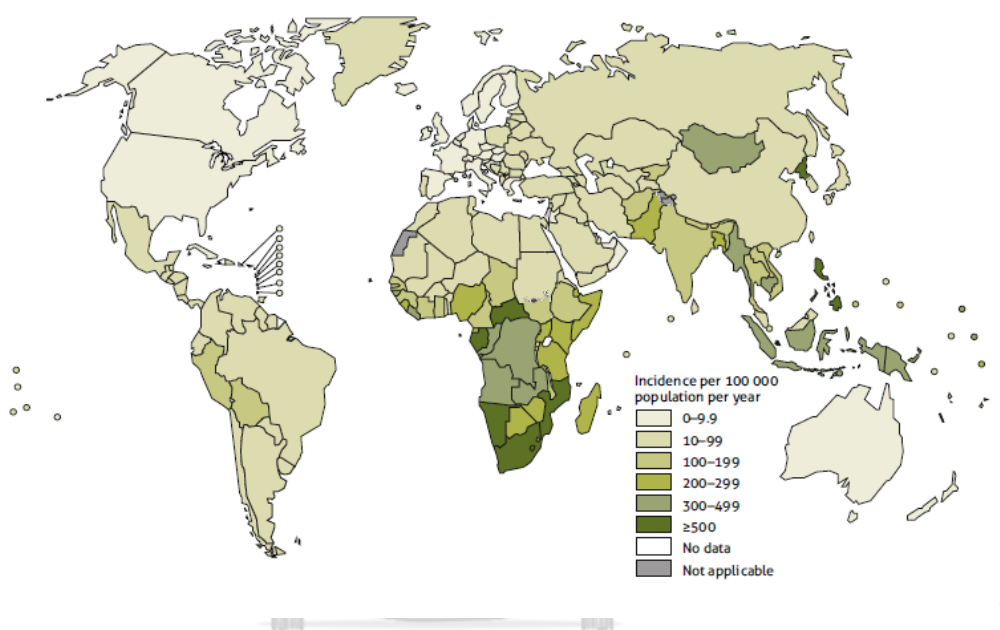
วัณโรคเป็นโรคเก่าแก่ที่คุกคามชีวิตมนุษยชาติมาเป็นเวลานาน โดยมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และโบราณคดียืนยันว่าเป็นสาเหตุการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตของบรรพบุรุษมาตั้งแต่ 9000 ปีก่อนคริสตศักราช เช่น การค้นพบลักษณะของวัณโรคกระดูกในศพที่ขุดพบในประเทศอิสราเอลและการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในกระดูกสันหลังมัมมี่ที่ประเทศอียิปต์ (25, 26) ราว 400 ปีก่อนคริสตศักราช Hippocrates บิดาการแพทย์ยุคกรีกได้บันทึกเกี่ยวกับวัณโรคว่าเป็นโรคที่พบบ่อยและทำให้ผู้ป่วยส่วนใหญ่เสียชีวิต ต่อมา Aristotle นักปรัชญากรีกโบราณเชื่อว่าโรคนี้มีการติดต่อผ่านทางอากาศ โดยสังเกตว่ามีการแพร่ระบาดจากคนสู่คนและพบมากในชุมชนแออัด อย่างไรก็ตามวัณโรคไม่ได้เป็นปัญหาสำคัญในยุคนั้น จนกระทั่งประมาณปี พ.ศ. 2143 ถึง พ.ศ. 2343 (ค.ศ. 1600 ถึง 1800) ซึ่งเป็นยุคการปฏิวัติอุตสาหกรรมในประเทศตะวันตก มีการเพิ่มขึ้นของประชากรและความแออัดในเขตเมือง ในขณะที่ระบบสาธารณสุขและสุขอนามัยยังไม่ดีพอ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของวัณโรคในยุโรปและทางตอนเหนือของสหรัฐอเมริกาอย่างกว้างขวาง ประชากรส่วนใหญ่จะติดเชื้อและ 1 ใน 4 ของผู้เสียชีวิตในขณะนั้นมีสาเหตุมาจากวัณโรค เนื่องจากยังไม่ทราบสาเหตุและวิธีการรักษาวัณโรค ผู้ป่วยจะเข้าพักในสถานพักฟื้น (Sanitarium) เป็นเวลานานเพื่อรอให้ร่างกายฟื้นตัวแต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเสียชีวิต (27) การวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคนั้นเริ่มจาก Girolamo Fracastora นายแพทย์ชาวอิตาลีได้กล่าวว่า วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากการติดเชื้อโรคที่อาศัยอยู่ในร่างกายผู้ป่วยและเรียกโรคนี้นี้ว่า “phthisis” หมายถึง โรคที่ทำให้ผู้ป่วยมีลักษณะผอมแห้ง โดย Fransiscus Sylvius นักกายวิภาคศาสตร์ชาวอิตาลีได้ค้นพบรอยโรคในเนื้อปอดที่เรียกว่า “tubercles” ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ. 2425 (ค.ศ. 1882) Robert Koch นายแพทย์ชาวเยอรมันเป็นคนแรกที่ค้นพบเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของวัณโรคซึ่งในขณะนั้นเรียกว่า “tubercle bacilli” ทำให้เริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับวัณโรคอย่างเป็นระบบ ทราบสาเหตุ พยาธิกำเนิด ระบาดวิทยา รวมถึงวิธีการรักษาโรค จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2464 สามารถผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคตัวแรกได้สำเร็จซึ่งใช้ระยะเวลาในการพัฒนาวัคซีนถึง 13 ปี โดยนักแบคทีเรียวิทยาชาวฝรั่งเศส Albert Calmette และ Camille

Guérin ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคของวัว (*Mycobacterium bovis*) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล จนได้เชื้อที่ไม่สามารถก่อโรคได้แต่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อวัณโรคได้และตั้งชื่อวัคซีนว่า Bacillus Calmette-Guérin หรือวัคซีน BCG ต่อมาในปี พ.ศ. 2486 และ พ.ศ. 2487 ได้มีการค้นพบยารักษาวัณโรค ได้แก่ ยา Streptomycin (S) และยา para-aminosalicylic acid (PAS) ตามลำดับ ทำให้การควบคุมวัณโรคได้ผลดียิ่งขึ้น และในปี พ.ศ. 2495 เริ่มมีการนำยา Isoniazid (H) มาใช้ร่วมในสูตรยารักษาวัณโรคด้วย ทำให้สามารถรักษาโรคให้หายขาดได้ถึง 90% แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการรักษานานถึง 24 เดือน ในปี พ.ศ. 2503 ได้มีการนำยา Ethambutol (E) มาใช้แทนยา PAS ซึ่งสามารถลดผลกระทบจากการใช้ยาและลดระยะเวลาในการรักษาลงจาก 24 เดือนเหลือเพียง 18 เดือน ความก้าวหน้าต่อมาคือการคิดค้นยา Rifampicin (R) ซึ่งเมื่อนำมาใช้ร่วมในสูตรยารักษาวัณโรคแล้วพบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาให้หายขาดได้ถึง 95% และลดระยะเวลาการรักษาเหลือเพียง 8 ถึง 9 เดือน ต่อมามีการนำยา Pyrazinamide (Z, PZA) มาใช้ร่วมด้วยทำให้สามารถลดระยะเวลาในการรักษาลงเหลือเพียง 6 เดือน เนื่องจากยานี้มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อที่อาศัยอยู่ในเซลล์ macrophage ในโพรงปอดซึ่งมีสถานะเป็นกรดและไม่ตอบสนองกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาและการควบคุมวัณโรคให้ได้ผลดียิ่งขึ้น (26) ในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา ประเทศในแถบยุโรปและญี่ปุ่น ต่างให้ความสำคัญในการขจัดโรคนี้นี้ ทำให้อุบัติการณ์ของโรคลดลงต่อเนื่อง 3% ถึง 7% ต่อปี หรือมีอุบัติการณ์ของโรคต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากร (1, 28) แต่ในปี พ.ศ. 2524 วัณโรคได้กลับมาเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญอีกครั้ง หลังจากที่มีการแพร่ระบาดของโรคเอดส์และการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis: MDR-TB) ซึ่งคือต่อยารักษาวัณโรคที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ ยา Isoniazid และยา Rifampicin ทำให้การรักษาและการควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรคเป็นไปได้ยากยิ่งขึ้น วัณโรคจึงยังคงเป็น 1 ใน 10 สาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้คนทั่วโลกด้วยจำนวนผู้เสียชีวิตกว่าหนึ่งล้านคนต่อปี (1)

2. อุตบัติการณ์และระบาดวิทยาของวัณโรค

จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2561 มีผู้ติดเชื้อวัณโรครายใหม่ทั่วโลกประมาณ 10 ล้านคนหรือคิดเป็นอุบัติการณ์ 130 คนต่อแสนประชากร และมีผู้ป่วยวัณโรคที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอดส์ร่วมด้วยเสียชีวิตประมาณ 1.2 ล้านคน และเสียชีวิตกว่า 251,000 คนในผู้ป่วยที่มี

การติดเชื้อไวรัสเอชไอวีด้วย วัณโรคสามารถพบได้ทุกประเทศทั่วโลกและพบได้ทุกช่วงอายุ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ประมาณ 90% มีอายุมากกว่า 15 ปี โดยพบว่า 57% เป็นเพศชาย ในขณะที่ผู้ป่วย 32% เป็นเพศหญิง และอีก 11% เป็นผู้ป่วยเด็กอายุต่ำกว่า 15 ปี โดยพบอุบัติการณ์สูงในประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้คิดเป็น 44% ในทวีปแอฟริกาคิดเป็น 24% ประเทศแถบแปซิฟิกตะวันตกคิดเป็น 18% และพบอุบัติการณ์เพียงเล็กน้อยในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียนคิดเป็น 8% สหรัฐอเมริกา คิดเป็น 3% และยุโรปคิดเป็น 3% (ภาพที่ 1) (1)



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงอุบัติการณ์วัณโรค (ต่อประชากรแสนคน) ในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลกในปี พ.ศ. 2561

CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากสถิติอัตราการตายจากวัณโรค (TB mortality rate) พบว่ามีอัตราลดลงเป็นลำดับเฉลี่ยประมาณ 3% ต่อปีหรือลดลงกว่า 42% ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 ถึง พ.ศ. 2561 ในขณะที่อุบัติการณ์วัณโรค (TB incidence) จากทั่วโลกมีอัตราลดลงเฉลี่ย 2% ต่อปีเช่นกัน สาเหตุที่ทำให้อัตราการตายและอุบัติการณ์วัณโรคลดลงคือ การดำเนินงานตามแผนงานการควบคุมวัณโรคที่มีประสิทธิภาพและสภาพความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น โดยเฉพาะในประเทศที่มีการพัฒนาแล้ว อย่างไรก็ตามอัตราการอุบัติการณ์และอัตราการตายจากวัณโรคมีการลดลงอย่างช้า ๆ โดยหากจะบรรลุเป้าหมายตามยุทธศาสตร์ยุติวัณโรค (The End TB Strategy) ที่มีเป้าหมายลดอุบัติการณ์วัณโรคให้ต่ำกว่า 10 ต่อแสนประชากรโลกภายในปี พ.ศ. 2578 นั้นจำเป็นต้องลดอุบัติการณ์ลง 90% จากปี พ.ศ. 2558 ซึ่งมีอุบัติการณ์วัณโรค 10.4 ล้านคนหรือคิดเป็นอัตราการลดลงเฉลี่ย 5% ถึง 6% ต่อปี (1)

สำหรับสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2561 คาดการณ์ว่าจะมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 106,000 รายหรือคิดเป็น 153 ต่อประชากรแสนคน ลดลงจากเดิมที่คาดการณ์ไว้ในปี พ.ศ. 2560 ซึ่งเท่ากับ 108,000 ราย หรือคิดเป็นอัตรา 156 คนต่อแสนประชากร ในขณะที่ระบบรายงานผลการดำเนินงานวัณโรคพบมีผู้ป่วยขึ้นทะเบียนรักษาเพียง 80,160 ราย คิดเป็นอัตราการตรวจพบ 74% ในขณะที่อัตราการรักษาสำเร็จอยู่ที่ 84% ซึ่งต่ำกว่าเป้าหมายที่ควรมีอัตราการรักษาสำเร็จอยู่ที่ 90% (1) ประเทศไทยจึงได้กำหนดแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ พ.ศ. 2560-2564 โดยมีวัตถุประสงค์ในการลดอัตราอุบัติการณ์ของวัณโรคลง 12.5% ต่อปี จาก 171 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2557 ให้เหลือ 88 ต่อแสนประชากร เมื่อสิ้นปี พ.ศ. 2564 เพื่อให้สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ยุติวัณโรคที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลก (29)

ปัญหาของวัณโรคที่ความรุนแรงยิ่งขึ้นจากการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยา หลังจากมีการพบเชื้อที่ดื้อต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษา ได้แก่ ยา Rifampicin (R) เรียกว่า Rifampicin-resistant TB: RR-TB) และหากดื้อต่อยา Isoniazid (H) รวมด้วยจะเรียกว่าวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistant TB: MDR-TB) ต่อมาเมื่อมีการนำยากุ่มอื่น ๆ มาใช้ในการรักษาก็ทำให้เกิดปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensive drug resistant TB: XDR-TB) ตามมาซึ่งหมายถึงเชื้อที่ดื้อต่อยา Isoniazid และยา Rifampicin ร่วมกับยาในกลุ่ม Fluoroquinolones และยากุ่ม Second-line injectable drugs จากรายงานขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ. 2562 (Global Tuberculosis Report 2019) คาดว่าทั่วโลกมีอุบัติการณ์ผู้ป่วย MDR/RR-TB ประมาณ 484,000 ราย โดยพบว่าเป็นผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 3.4% และผู้ป่วยที่มีประวัติรักษาวัณโรคมาก่อนประมาณ 18% เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ในจำนวนนี้ 5% ถึง 10% เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (XDR-TB) สำหรับประเทศไทยคาดการณ์ว่ามีอุบัติการณ์ MDR/RR-TB ประมาณ 4,000 ราย พบในผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 2.3% และในผู้ป่วยที่เคยรับการรักษามาก่อนพบได้ประมาณ 24% จากรายงานผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี 2560 พบว่ามีผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยเป็น MDR-TB จำนวน 1,312 ราย และ XDR-TB จำนวน 29 รายเท่านั้น (1) สะท้อนให้เห็นถึงการค้นหาและการรายงานผู้ป่วยที่ต่ำกว่าความจริง อาจเนื่องมาจากการเข้าถึงการวินิจฉัยเชื่อดื้อยายังต่ำและระบบการรายงานวัณโรคดื้อยาหลายขนานยังไม่ครอบคลุมในทุกโรงพยาบาล โดยสาเหตุสำคัญที่ทำให้วัณโรคยังคงมีการแพร่ระบาดเกิดจากการระบาดของโรคเอดส์ การอพยพย้ายถิ่นของแรงงานข้ามชาติ การเพิ่มขึ้นของชุมชนเมืองและชุมชนแออัดในขณะที่ระบบ

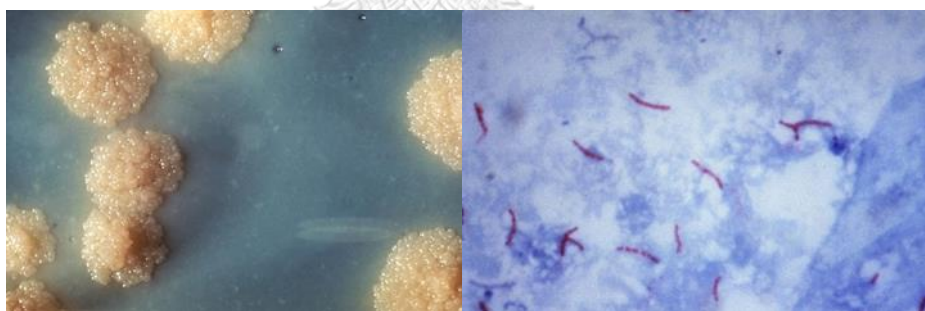
บริการสาธารณสุขยังขาดประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากไม่สามารถเข้าถึงการรักษาและขาดการติดตามการรักษา เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยามากขึ้นและที่สำคัญคือการละเลยวิธีปฏิบัติตามมาตรการการควบคุมป้องกันโรคที่มีประสิทธิภาพ (7)

3. ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อวัณโรค

วัณโรคมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *M. tuberculosis* และพบจำนวนน้อยที่เกิดจากเชื้อ *M. Africanum*, *M. Bovis*, *M. canetti* และ *M. microti* โดยเชื้อกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียก่อโรคในวงศ์ *Mycobacteriaceae* มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อยยาว 2 ถึง 4 ไมครอนและกว้าง 0.2 ถึง 0.5 ไมครอน ไม่มี flagella หรือ cilia จึงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล โครงสร้างภายในเซลล์มีลักษณะเช่นเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป แต่มีลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์โปรคาริโอตอื่น ๆ คือ โครงสร้างเชิงซ้อนของสาร mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan (mAGP) ประกอบด้วยโมเลกุลที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ peptidoglycan เป็นส่วนที่อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ถัดออกมาเป็น arabinogalactan และชั้นนอกสุดเป็นชั้นของกรดไขมัน mycolic จำนวนมาก ซึ่งไขมันเหล่านี้ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติไม่ยอมให้สีย้อมผ่าน ทนต่อการทำลายของกรดและด่าง จึงทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้มีคุณสมบัติดื้อสีทนกรด (Acid-fast bacilli: AFB) (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังทนต่อการทำลายของ แอนติบอดี คอมพลีเมนต์และกระบวนการ lethal oxidation ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดได้ภายในเซลล์ macrophage โครงสร้างของผนังเซลล์ยังมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ประกอบด้วย 1. ไขมัน ที่ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของไขมันหลายชนิด เช่น phospholipid จะกระตุ้นให้เกิด humoral immunity และ caseous necrosis ส่วนกรดไขมัน mycolic เมื่อรวมกับ muramyl dipeptide ที่อยู่ใน peptidoglycan จะทำให้เกิดเป็น granuloma สาร trehalose dimycolate (cord factor) มีคุณสมบัติยับยั้งการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวและทำให้เกิด chronic granuloma สารขี้ผึ้ง (wax D) มีคุณสมบัติเป็น Freund's complete adjuvant (CFA) จะกระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิไวเกินแบบล่าช้า (delayed hypersensitivity) 2. โปรตีน ซึ่งอยู่ในรูปของ lipoprotein เป็นตัวกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีและกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทูเบอร์คิวลิน (tuberculin reaction) 3. polysaccharide เช่น

arabinogalactan สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะภูมิไวเกินแบบเกิดทันทีทันใด (immediate hypersensitivity) (3, 25, 30)

เชื้อวัณโรคเจริญเติบโตได้ในภาวะที่มีออกซิเจน (obligate aerobe) มีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างช้าโดยใช้เวลาในการแบ่งตัวต่อ 1 ครั้งนาน 15 ถึง 20 ชั่วโมง สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีในรูปร่างไฮสโตและอยู่เป็นอิสระ (facultative intracellular parasite) เชื้อวัณโรคเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีไขมันสูง อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จึงใช้ไข่แดงเป็นส่วนผสมหลัก และใช้ glycerol หรือ pyruvate เป็นแหล่งคาร์บอน มี glutamate หรือ asparagine เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น สูตรอาหารชนิดแข็ง Lowenstein-Jensen medium และ Ogawa เป็นต้น โดยลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งจะสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อภายใน 2 ถึง 4 สัปดาห์ ลักษณะโคโลนีแห้งขรุขระคล้ายดอกกะหล่ำ (cauliflower-like colony) มีสีครีมหรือสีฟางข้าว (cream/buff colored) (ภาพที่ 2) ส่วนในอาหารชนิดเหลว เช่น อาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมหลัก Middlebrook's medium เชื้อจะเจริญเป็นกลุ่มใช้เวลาประมาณ 1 ถึง 2 สัปดาห์ เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเชื้อเรียงตัวอยู่รวมกันเป็นเส้นคล้ายเกลียวเชือก (serpentine cords) โดยเจริญได้ดีในภาวะมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ถึง 10% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (3)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* (ซ้าย) และลักษณะของเชื้อเมื่อย้อมด้วยสีทนกรดตามวิธี Ziehl Neelsen ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ขวา)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ก่อวัณโรคจัดอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ซึ่งมีความสามารถในการก่อโรครุนแรง (high virulence) ประกอบด้วยเชื้อที่มีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์ 9 ชนิด ได้แก่ *M. tuberculosis* ทำให้เกิดโรคในคนเป็นส่วนใหญ่ *M. africanum* ทำให้เกิดโรคในคนเช่นกันแต่พบมากในทวีปแอฟริกา *M. bovis* ก่อโรคในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะวัวจะติดต่อสู่มนุษย์ได้โดยการใกล้ชิดกับสัตว์หรือดื่มนมวัวที่เป็นโรค *M. microti* ทำให้เกิดโรคในสัตว์ฟันแทะ เช่น หนู กระรอก เป็นต้น *M. caprae* ทำให้เกิดโรคในแพะ *M. pinnipedii* ก่อโรคในแมวน้ำ

M. Oryzidis, *M. mungji* และ *M. canettii* เชื้อกลุ่มนี้มีความแตกต่างในคุณสมบัติทางชีวเคมีแต่มีความคล้ายคลึงกันในรหัสพันธุกรรมถึง 99% ซึ่งการจำแนกสปีชีส์ไม่มีความสำคัญในเชิงการรักษา แต่มีความสำคัญในการศึกษาระบาดวิทยา (25, 31) ในปี พ.ศ. 2541 ได้มีการศึกษาหาลำดับเบสทั้งหมดของสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ทำให้เริ่มมีการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคจากทั่วโลก สามารถจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกเป็น 6 เชื้อสาย ได้แก่ Euro-American, Indo-Oceanic, East-Asian (Beijing strains), West-African 1, West-African 2 และ East-African-Indian ซึ่งบางเชื้อสายพบว่ามีมีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยความรุนแรงที่ส่งผลให้เชื้อติดต่อยาเพิ่มขึ้น เช่น สายพันธุ์ East-Asian (Beijing strains) เป็นต้น (25)

4. การติดเชื้อและพยาธิสภาพของวัณโรคปอด

เชื้อวัณโรคสามารถก่อให้เกิดโรคได้ในทุกอวัยวะ แต่ที่พบบ่อยคือ วัณโรคปอด พบได้ประมาณ 80% ของวัณโรคทั้งหมด ซึ่งสามารถติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศ เมื่อผู้ป่วยวัณโรคไอหรือจาม จะมีเชื้อวัณโรคประมาณ 1 ถึง 3 เซลล์ปนออกมากับละอองเสมหะ (droplets nuclei) ละอองฝอยขนาดใหญ่จะตกสู่พื้นแต่หากหายใจเข้าไปมักติดอยู่บริเวณทางเดินหายใจส่วนบนและไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ ในขณะที่ละอองฝอยขนาดเล็กประมาณ 1 ถึง 5 ไมครอน สามารถลอยอยู่ในอากาศได้นานหลายชั่วโมง เมื่อผู้รับเชื้อสูดหายใจเข้าไปจะตกลงไปในถุงลมปอด (alveoli) และสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามผู้ที่ได้รับเชื้อส่วนใหญ่ 90% จะไม่ป่วยเป็นวัณโรค เนื่องจากร่างกายสามารถกำจัดหรือยับยั้งเชื้อได้ เรียกว่า การติดเชื้อแฝง (Latent infection) ซึ่งผู้ป่วยจะไม่มีอาการและไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่น ผู้ที่ได้รับเชื้อเพียง 10% เท่านั้นที่จะป่วยเป็นวัณโรคระยะแสดงอาการ (Active TB) โดยจำนวนนี้ประมาณ 5% จะป่วยภายใน 2 ปีแรก (2, 25) ซึ่งมีปัจจัยส่งเสริมที่ทำให้เกิดโรคภายหลังจากการสัมผัสเชื้อ ได้แก่ ปริมาณและระยะเวลาในการได้รับเชื้อ โดยพบว่าผู้ที่ป่วยเป็นวัณโรคประมาณ 30% เป็นผู้ที่เคยสัมผัสใกล้ชิดกับผู้ป่วยวัณโรคหรือเป็นผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน และปัจจัยเรื่องภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยโรคเอดส์ โรคเรื้อรัง โรคพิษสุราเรื้อรัง โรคเบาหวาน ภาวะทุพโภชนาการ เด็กเล็กและผู้สูงอายุ มีความเสี่ยงในการติดเชื้อวัณโรคมากกว่าคนที่ภูมิคุ้มกันปกติ (2)

เมื่อเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายผ่านการหายใจไปยังหลอดลมฝอยและถุงลมในปอด ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยภูมิคุ้มกันด่านแรก คือ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (innate immunity) โดย

เซลล์ alveolar macrophages และเซลล์ dendritic จะจดจำเชื้อวัณโรคผ่านทาง pattern recognition receptors (PRRs) เช่น Toll-like receptors (TLR2, TLR4, TLR9) เป็นต้น เซลล์ macrophage จะจับกินและทำลายเชื้อผ่านกระบวนการ phagosome-lysosome fusion และสภาวะกรดในเซลล์ ถ้าเชื้อมีปริมาณมากหรือมีความรุนแรงในการก่อโรคสูง เชื้อจะสามารถต้านการทำลายจากเซลล์ macrophage ได้ ทำให้เชื้อสามารถอยู่รอดและเกิดการแบ่งตัวภายในเซลล์ macrophage เมื่อเซลล์ตายจากกระบวนการ necrosis เชื้อจะถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์และแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองใกล้เคียง (regional lymph node) หลังจากการติดเชื้อ 2 ถึง 3 สัปดาห์ ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะเจาะจง (adaptive immunity) โดยมีระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ (cell mediated immunity) เป็นตัวการสำคัญ เริ่มจากเซลล์ dendritic จะนำเสนอแอนติเจนของเชื้อให้กับ CD4+ T-cell ส่งผลให้มีการกระตุ้นให้ T-cell ทำงาน (reactive lymphocyte) เซลล์จะสร้าง lymphokines ได้แก่ gamma interferon (IFN- γ) ซึ่งจะไปดึงดูดพร้อมกับกระตุ้น macrophages ให้พร้อมทำลายเชื้อ (activated macrophage) โดยเซลล์นี้จะมีการหลั่งสารต่าง ๆ ได้แก่ tumor necrotic factor (TNF), platelet-derived growth factor (PDGF) ซึ่งเมื่อทำงานร่วมกับ lymphokines (IFN- γ และ interleukin) แล้วจะทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ปอดที่มีลักษณะจำเพาะเรียกว่า tuberculoma หรือ granuloma มีลักษณะเป็นโพรงปิด มีเซลล์เม็ดเลือดขาวล้อมรอบเพื่อทำลายเชื้อและจำกัดไม่ให้เชื้อแพร่กระจาย ต่อมาภายในจะกลายเป็นของชั้นเหลวของเซลล์ที่ตายสะสมและมีเชื้ออยู่เป็นจำนวนมาก เรียกว่า caseous necrosis เชื้อที่อยู่ภายใน granuloma จะเจริญแบ่งตัวอย่างช้า ๆ หรืออาจไม่มีการแบ่งตัว เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดและมีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ เมื่อใดก็ตามที่การทำงานของภูมิคุ้มกันต่ำลง เชื้อที่อยู่ภายใน granuloma จะเพิ่มจำนวนและแตกออก ทำให้เชื้อกระจายออกมาตามหลอดเลือด ปนออกมาในเสมหะของผู้ป่วย เชื้ออาจแพร่กระจายตามหลอดเลือดน้ำเหลือง (lymphatic vessels) ไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ซั้วปอด (hilar lymph node) ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโต และถ้าเชื้อแพร่เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด จะก่อให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะอื่น ๆ ได้ เช่น ไต กระดูก เยื่อหุ้มสมอง ไขสันหลัง ตับ เป็นต้น granuloma ที่มีลักษณะเป็นโพรงอากาศที่มีเชื้ออยู่จำนวนมากนั้นเมื่อนานไปจะมีแคลเซียมมาจับรอบโรค เกิดเป็นรอยโรคในเนื้อปอดเรียกว่า Ghon's focus ซึ่งสามารถเห็นในภาพเอกซเรย์ปอด (25, 30)

การเกิดวัณโรคแบ่งเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ 1. วัณโรคปฐมภูมิ (Primary TB) คือการป่วยเป็นวัณโรคหลังจากการติดเชื้อครั้งแรก พบมากในเด็กหรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เนื่องจากเป็นการได้รับเชื้อในขณะที่ร่างกายยังไม่มีภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ 2. วัณโรคทุติยภูมิ (Secondary TB) คือการป่วยเป็นวัณโรคหลังจากการติดเชื้อมาแล้วหลายปี เมื่อร่างกายอ่อนแอและภูมิคุ้มกันต่ำลง จะกระตุ้นให้เชื้อที่แฝงอยู่ในร่างกายมีการแบ่งตัวขึ้นมาใหม่และทำให้เกิดโรคเรียกว่า endogenous reactivation หรือได้รับเชื้อวัณโรคจากนอกร่างกายเข้าไปใหม่แล้วก่อให้เกิดโรค เรียกว่า exogenous reinfection ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้ป่วยเป็นวัณโรค เช่น โรคเบาหวาน โรคไตเรื้อรัง ภาวะขาดสารอาหาร การสูบบุหรี่หรือดื่มแอลกอฮอล์ การได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ในปัจจุบันการติดเชื้อเอชไอวีเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการป่วยเป็นวัณโรค อาการแสดงของผู้ป่วยวัณโรคส่วนมากไม่ค่อยเด่นชัดในระยะแรก โดยมีอาการแตกต่างกันตามอวัยวะที่เป็น หากเป็นวัณโรคปอด ผู้ป่วยมักไอเรื้อรัง ไอแห้งๆ จะเริ่มไอมีเสมหะหรือไอเป็นเลือดเมื่อเป็นมากขึ้น เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีไข้ตอนเย็น เหงื่อออก เหนื่อยหอบอ่อนเพลีย ส่วนอาการวัณโรคอื่น ๆ จะมีไข้เรื้อรัง และอาการตามอวัยวะที่เป็นโรค เช่น วัณโรคสมองจะมีอาการปวดหัว อาเจียน ซึมลง ชัก วัณโรคกระดูกสันหลังอาจทำให้กระดูกสันหลังคดหรือแตกออกเป็นฝี หากเป็นที่ต่อมน้ำเหลือง จะมีต่อมน้ำเหลืองโต เป็นต้น (5)

5. การรักษาวัณโรคและยาต้านวัณโรค

ในยุคก่อนยาปฏิชีวนะ การรักษาผู้ป่วยวัณโรคทำโดยการให้กินน้ำมันตับปลาและให้ตากแดด โดยจะแยกผู้ป่วยให้เข้าพักในสถานพักฟื้น (Sanitarium) อาจเป็นถ้ำหรือสถานที่ที่มีอากาศบริสุทธิ์ เพื่อให้ร่างกายฟื้นตัวและหายจากวัณโรคเองแต่ผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่จะเสียชีวิต ต่อมาเมื่อเริ่มมีการคิดค้นยารักษาวัณโรคขึ้นในปี พ.ศ. 2486 และ พ.ศ. 2495 คือยา Streptomycin และยา Isoniazid ตามลำดับ ทำให้การรักษาวัณโรคได้ผลดียิ่งขึ้น (28) และในปัจจุบันวัณโรคสามารถรักษาให้หายขาดได้ โดยใช้สูตรยามาตรฐานระยะสั้น 6 เดือน (2HRZE/4HR) ประกอบด้วยการรักษา 2 ระยะ คือ 1. ระยะเข้มข้น (intensive phase) จะใช้ยาที่ออกฤทธิ์แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 2 เดือน ได้แก่ ยา Isoniazid (H) ยา Rifampicin (R) ยา Pyrazinamide (Z) และยา Ethambutol (E) เพื่อช่วยกำจัดเชื้อวัณโรคในปอดให้มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว 2. ระยะต่อเนื่อง (continuous phase) จะใช้ยา Isoniazid และยา Rifampicin ต่อไปเป็นระยะเวลาอีก 4 เดือน เพื่อฆ่าเชื้อวัณโรคแฝง (dormant form) ที่ยังหลงเหลืออยู่ (5) องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ใช้สูตรยานี้ในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคราย

ใหม่ เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาวัณโรค สามารถรักษาผู้ป่วยให้หายขาดได้เกือบ 100% ทั้งนี้ผู้ป่วยจะต้องได้รับขนาดยาที่ถูกต้องเหมาะสมตามน้ำหนักตัว และได้รับยาครบตามระยะเวลาที่กำหนด (32) ปัจจุบันได้จัดยารักษาวัณโรคไว้ 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ ยารักษาวัณโรคชนิดรับประทานแนวที่ 1 (first-line oral drugs: FL-drugs) ได้แก่ ยา Isoniazid (H) ยา Rifampicin (R) ยา Pyrazinamide (Z) และยา Ethambutol (E) จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาดีที่สุดและผลข้างเคียงของยาน้อยสุด กลุ่มที่ 2 คือ ยารักษาวัณโรคชนิดฉีดแนวที่ 2 (second-line injectable drugs: SL-drugs) ได้แก่ ยา Capreomycin (Cm) และยากลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ ยา Kanamycin (Km) ยา Amikacin (Am) และยา Streptomycin (S) ใช้ในการรักษาวัณโรคคือยาโดยเฉพาะยา Km เนื่องจากมีราคาสูงและพบปัญหาการดื้อยาน้อยกว่า กลุ่มที่ 3 คือ ยารักษาวัณโรคกลุ่ม Fluoroquinolones ได้แก่ ยา Levofloxacin (Lfx) ยา Moxifloxacin (Mfx) และยา Ofloxacin (Ofx) มีความสำคัญในการรักษาวัณโรคคือยาหลายขนาน กลุ่มที่ 4 คือ ยารักษาวัณโรคชนิดรับประทานแนวที่ 2 (oral bacteriostatic second-line drugs) ได้แก่ ยา para-aminosalicylic acid (PAS) ยา Cycloserine (Cs) ยา Terizidone (Trd) ยา Ethionamide (Eto) และยา Prothionamide (Pto) กลุ่มที่ 5 คือ ยารักษาวัณโรคคือยาที่มีประสิทธิภาพไม่ชัดเจน (anti-tuberculosis agents with unclear role efficacy in treatment of drug resistant TB) ได้แก่ ยา Clofazimine (Cfz) ยา Linezolid (Lzd) ยา Amoxicillin/clavulanate (Amx/Clv) ยา Thioacetazone (Thz) ยา high-dose isoniazid และยา Clarithromycin (Clr) เนื่องจากประสิทธิภาพของยาไม่ชัดเจน องค์การอนามัยโลกจึงไม่แนะนำให้เลือกใช้ยากลุ่มนี้เป็นยาหลักในการรักษาวัณโรคคือยาแต่มีการแนะนำให้ใช้ยา Bedaquiline (Bdq) และยา Delamanid (Dlm) ซึ่งเป็นยาที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ในรอบ 40 ปีที่ผ่านมา เพื่อใช้ในการรักษาวัณโรคคือยาหลายขนาน (7)

การรักษาวัณโรคให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ในการเลือกให้ยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละคน ได้แก่ การดื้อยา การแพ้ยา พยาธิสภาพและความรุนแรงของโรค ความร่วมมือของผู้ป่วย และการตรวจติดตามการกินยา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการรักษาอย่างมาก เนื่องจากผู้ป่วยต้องรับประทานยาติดต่อกันเป็นเวลานาน องค์การอนามัยโลกจึงแนะนำให้มีการควบคุมกำกับกับการกินยาของผู้ป่วย (Directly Treatment Short Course: DOTS) ในประเทศหรือพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของวัณโรคสูง เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นและลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยา (32)

6. วัณโรคดื้อยา

ปัญหาที่สำคัญของการแพร่กระจายวัณโรคคือการเกิดวัณโรคดื้อยา ทำให้การรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ทำได้ยากและต้องใช้จ่ายในการรักษาสูงกว่าวัณโรคไวต่อยาหลายเท่า การรักษาผู้ป่วยวัณโรคไวต่อยาจะใช้สูตรยามาตรฐานระยะเวลา 6 เดือน มีค่าใช้จ่ายประมาณ 2,000 ถึง 4,000 บาทต่อราย และมีอัตราการรักษาสำเร็จสูง ในขณะที่ผู้ป่วย MDR-TB ต้องได้รับยาอย่างน้อย 20 เดือน มีค่าใช้จ่ายประมาณ 200,000 บาทต่อราย และอัตราการรักษาสำเร็จประมาณ 75% หากเป็นผู้ป่วย XDR-TB จะใช้เวลาการรักษาอย่างน้อย 20 เดือน มีค่าใช้จ่ายในการรักษา 1,200,000 บาทต่อราย และผู้ป่วยมีโอกาสที่จะรักษาให้หายขาดเพียง 50% เนื่องจากผลข้างเคียงของยาสูง (7) ตัวอย่างของอาการไม่พึงประสงค์จากยารักษาวัณโรค เช่น อาการชัก อาการระบบทางเดินอาหาร (คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย) อาการทางจิต (โรคจิต ซึมเศร้า ความคิดฆ่าตัวตาย) ความเป็นพิษต่อไต ตับอักเสบ ปลายประสาทตา อักเสบ และอาการของการสูญเสียเกลือแร่ (ตะคริว ใจสั่น) เป็นต้น การรักษาวัณโรคดื้อยาให้หายขาดจึงเป็นไปได้ยากและเกิดการแพร่กระจายมากขึ้นในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ในปี พ.ศ. 2560 กระทรวงสาธารณสุขจึงได้ประกาศให้ XDR-TB เป็นโรคติดต่ออันตรายตามพระราชบัญญัติโรคติดต่อ พ.ศ. 2558 เพื่อให้มีการดำเนินงานป้องกันควบคุมวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมากอย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (33) การติดเชื้อมวัณโรคดื้อยาแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ 1. Primary drug resistant TB หมายถึง การป่วยเป็นวัณโรคดื้อยาในผู้ป่วยรายใหม่ที่ไม่เคยมีประวัติการรักษามาก่อน โดยได้รับเชื้อสายพันธุ์ดื้อยามาจากผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา และ 2. Acquired drug resistant TB หมายถึง วัณโรคดื้อยาที่เกิดในระหว่างการรักษา ซึ่งก่อนทานยาเป็นวัณโรคที่ไวต่อยาแต่เกิดการดื้อยาหลังได้รับการรักษาแล้ว สาเหตุที่ทำให้เชื้อดื้อยาอาจเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยอัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Rifampicin และยา Isoniazid พบได้ 1 ตัวในเชื้อวัณโรค 10^8 ตัว ส่วนยา Streptomycin ยา Ethambutol และยา para-aminosalicylic acid พบได้ 1 ตัวในเชื้อ 10^6 ตัว ในขณะที่ยา Pyrazinamide พบได้บ่อยคือ 1 ตัวในเชื้อ 10^4 ตัว (34) หากการกลายพันธุ์นั้นเกิดบนยีนที่ใช้ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของยา จะทำให้ยาไม่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทำลายเชื้อ โดยสามารถพบลักษณะการกลายพันธุ์ในหลายรูปแบบ เช่น point mutation, insertion และ deletion เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1 (7) แต่สาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้เกิดเชื้อดื้อยาคือเกิดจากการกระทำของมนุษย์ (man-made phenomenon) เช่น การเลือกใช้ยา

หรือวิธีการรักษาที่ไม่เหมาะสมของแพทย์ ผู้ป่วยรับประทานยาไม่สม่ำเสมอหรือการขาดยา ระบบการ
จัดเก็บหรือการขนส่งยาไม่ดีทำให้ยาเสื่อมสภาพ สาเหตุเหล่านี้สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อเกิดการกลาย
พันธุ์เป็นเชื้อดื้อยามากขึ้น (7, 35)



ตารางที่ 1 กลไกการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อวัณโรค

| ยา | กลไกการออกฤทธิ์ของยา | ยีนที่เกิดการดื้อยา | หน้าที่ของเอนไซม์ที่ยีนควบคุม | ร้อยละที่ทำให้เกิดการดื้อยา |
|------------------|--|---------------------|--|-----------------------------|
| H | ยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ทำให้เชื้อไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ | <i>katG</i> | Catalase-peroxidase | 50-95 |
| | | <i>inhA</i> | Enoyl ACP reductase | 8-43 |
| R | ยับยั้งเอนไซม์ RNA polymerase ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ RNA | <i>rpoB</i> | β -subunit of RNA polymerase | 95 |
| Z | ทำให้ภายในเซลล์ของเชื้อมีสถานะเป็นกรดและรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ | <i>pncA</i> | Nicotinamidase/ Pyrazinamidase | 72-97 |
| E | ยับยั้งเอนไซม์ arabinosyl transferase ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ arabinogalactan ของผนังเซลล์ได้ | <i>embB</i> | Arabinosyl transferase | 47-65 |
| S | จับกับ ribosome ชนิด 30S subunit ที่ ribosomal S12 protein และ 16S rRNA ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนชนิด mRNA ได้ | <i>rpsL</i> | S12 ribosomal protein | 52-59 |
| | | <i>rrs</i> | 16S rRNA | 8-21 |
| | | <i>gidB</i> | rRNA-methyltransferase | |
| Am/ Km/ Cm | จับกับ ribosome ชนิด 30S subunit ที่ 16S rRNA ทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนชนิด mRNA ได้ | <i>rrs</i> | 16S rRNA | 76 |
| FQs | ยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase (topoisomerase II) และ topoisomerase IV ทำให้เซลล์ของเชื้อไม่สามารถแบ่งตัวได้ | <i>gyrA</i> | DNA gyrase subunit A | 75-94 |
| | | <i>gyrB</i> | DNA gyrase subunit B β -subunit of RNA polymerase | |

*หมายเหตุ H หมายถึงยา Isoniazid, R หมายถึงยา Rifampicin, Z หมายถึงยา Pyrazinamide, E หมายถึงยา Ethambutol, S หมายถึงยา Streptomycin, Am/Km/Cm หมายถึงยา Amikacin ยา Kanamycin และยา Capreomycin (Cm), FQs หมายถึงยาในกลุ่ม Fluoroquinolones ได้แก่ ยา Levofloxacin (Lfx) ยา Moxifloxacin (Mfx) และยา Ofloxacin (Ofx)

7. การตรวจวินิจฉัยวัณโรค

หัวใจสำคัญของการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายของวัณโรคคือการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็ว ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้อง ลดการแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น โดยแนวทางการรักษาวัณโรคในปัจจุบันมีความหลากหลายมากขึ้น เช่น ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ ผู้ป่วยวัณโรคเด็ก ผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ป่วยวัณโรคแฝง เป็นต้น เพื่อปรับการรักษาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละประเภท ผลจากห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องจึงเป็นส่วนสำคัญในการให้ข้อมูลที่ใช้เป็นแนวทางการรักษาที่มีประสิทธิภาพ ลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาจากการรักษาที่ไม่เหมาะสม และการวินิจฉัยที่รวดเร็วก็มีส่วนช่วยในการลดการแพร่กระจายเชื้อได้

ในปี พ.ศ.2560 พบว่ามีการรายงานผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลกเพียง 64% จากจำนวนที่คาดประมาณไว้โดยองค์การอนามัยโลก ซึ่งเป็นผลมาจากระบบการรายงานผลยังไม่ครอบคลุมในทุกห้องปฏิบัติการและผู้ป่วยไม่สามารถเข้าถึงการวินิจฉัยได้ โดยเฉพาะในประเทศที่มีรายได้ปานกลางและต่ำ ซึ่งมีข้อจำกัดเรื่องต้นทุนในการจัดซื้อวัสดุอุปกรณ์และการสร้างห้องปฏิบัติการที่มีมาตรฐาน ทำให้ไม่สามารถรองรับเทคโนโลยีการตรวจวิเคราะห์ใหม่ ๆ ได้ โดยการวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1. การตรวจเชื้อแบคทีเรียติดสีทนกรด (Acid fast bacilli: AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) 2. การเพาะเลี้ยงเชื้อและพิสูจน์ยืนยันชนิด (mycobacterial culture and identification) 3. การตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular examination) 4. การตรวจหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker-based methods) (5)

7.1 การตรวจเชื้อแบคทีเรียติดสีทนกรด (Acid fast bacilli: AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคนานกว่า 100 ปี คิดค้นโดย Franz Ziehl และ Frederick Neelsen เป็นวิธีตรวจที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว สะดวก ประหยัด สามารถให้ผลการวินิจฉัยเบื้องต้นได้ โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อในการย้อมติดสีทนกรด ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปมี 2 วิธีได้แก่ Ziehl-Neelsen technique (hot staining) หรือ Kinyoun technique (cold staining) ทั้ง 2 วิธีนี้แตกต่างกันในการย้อมขั้นตอนแรก โดยวิธี Ziehl-Neelsen technique จะต้องใช้ความร้อนในการช่วยให้สี carbol fuchsin ติด

เซลล์ ในขณะที่วิธี Kinyoun technique ไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อนแต่จะเพิ่มความเข้มข้นของสี carbol fuchsin และ phenol มากขึ้น ในขั้นตอนนี้เซลล์ทุกชนิดจะติดสีแดง จากนั้นล้างสีด้วยกรดแอลกอฮอล์ และย้อมทับด้วยสี methylene blue เชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* spp. ซึ่งมีคุณสมบัติติดสีทนกรด จะยังคงติดสีแดงในขณะที่เซลล์อื่น ๆ จะติดสีน้ำเงิน เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (light microscopy) กำลังขยาย 100 เท่า โดยใช้เวลาการอ่านผล 5 ถึง 10 นาที หรือปัจจุบันองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงแบบใช้หลอด LED (light-emitting diode fluorescence microscope) ในการตรวจดูเสมหะที่ย้อมด้วยวิธี fluorescence acid fast staining โดยใช้สีเรืองแสง Auramine O ที่สามารถเพิ่มความไวของการตรวจพบเชื้อมากขึ้น 10% เมื่อเทียบกับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดาที่จะต้องมีย้อมปริมาณ 5,000 ถึง 10,000 ตัวต่อเสมหะ 1 มิลลิลิตร และใช้เวลาในการอ่านผลเร็วกว่า อย่างไรก็ตามการพบเชื้อใน smear ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อวัณโรคกับเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่น ๆ ออกจากกันได้ และไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้อที่พบนั้นเป็นเชื้อที่ยังมีชีวิตหรือตายแล้ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจเสมหะโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) เพื่อยืนยันเชื้อวัณโรคและดูความมีชีวิตของเชื้อ รวมทั้งการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา (5, 36)

7.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อและพิสูจน์ยืนยันชนิด (mycobacterial culture and identification)

การเพาะเลี้ยงเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐาน (reference method) ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค เพื่อตรวจดูความมีชีวิตของเชื้อรวมทั้งสามารถนำไปทำการทดสอบความไวต่อยาต่อได้ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการค้นหาผู้ป่วยได้ดีกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ถึง 50 เท่า โดยในสิ่งส่งตรวจต้องมีเชื้ออย่างน้อย 10 ถึง 100 ตัวต่อเสมหะ 1 มิลลิลิตร (5) แต่วิธีการเพาะเชื้อทำได้ยุ่งยากกว่า ต้องใช้เจ้าหน้าที่ที่ผ่านการฝึกอบรมเป็นอย่างดีและปฏิบัติภายในห้องปฏิบัติการที่ออกแบบให้มีประสิทธิภาพในการป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ ตัวอย่างสำหรับส่งเพาะเชื้อแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ตัวอย่างที่ปราศจากเชื้ออื่นปนเปื้อน เช่น น้ำเจาะจากอวัยวะต่าง ๆ (body fluid) น้ำไขสันหลัง (CSF) เป็นต้น ตัวอย่างเหล่านี้สามารถเพาะเลี้ยงโดยหยอดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ในขณะที่ตัวอย่างที่มีโอกาส

ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น เสมหะ อุจจาระ น้ำล้างกระเพาะอาหารจำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการย่อย (digestion) การกำจัดเชื้อปนเปื้อน (decontamination) และการทำให้เข้มข้น (concentration) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคต่อไป อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีไข่เป็นส่วนผสมหลัก เช่น Lowenstein-Jensen medium และ Ogawa medium เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมหลัก เช่น Middlebrook 7H10 และ Middlebrook 7H11 เป็นต้น โดยสามารถสังเกตเห็นโคโลนีเชื้อเจริญภายใน 2 ถึง 8 สัปดาห์ (37) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว เช่น Middlebrook 7H9 เชื้อจะเจริญภายใน 1 ถึง 6 สัปดาห์ แต่จะไม่สามารถมองเห็นโคโลนีของเชื้อด้วยตาเปล่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวส่วนใหญ่จึงมีการปรับปรุงสูตรเพื่อให้เหมาะสมกับเครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลักการตรวจวัดการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เช่น เครื่อง BACTEC MGIT 960 ของบริษัท Becton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ตรวจหาการเจริญของเชื้อด้วยหลักการของ Oxygen consuming เครื่องกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460 ใช้หลักการของ $^{14}\text{CO}_2$ accumulation เครื่อง BacT/Alert 3D ของบริษัท bioMérieux จำกัด ประเทศฝรั่งเศส ใช้หลักการ CO_2 accumulation เป็นต้น หรือสังเกตการเจริญโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากการเปลี่ยนสีของ redox indicator ด้วยชุดทดสอบ MB redox จากบริษัท Biotest จำกัด ประเทศเยอรมนี ซึ่งการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีความไวสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งถึง 10% แต่ต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง และพบมีอัตราการปนเปื้อนสูงกว่า (38) อย่างไรก็ตามศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) และห้องปฏิบัติการระดับอ้างอิง ต่างแนะนำให้มีการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เนื่องจากเชื้อวัณโรคบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ผสมไข่หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (biphasic medium) ซึ่งเป็นอาหารผสมระหว่างอาหารชนิดแข็งที่ใช้เป็นฐาน (slant) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เป็นส่วนบน เช่น อาหารที่ผสมระหว่าง LJ slant กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook7H9 เป็นต้น ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ ความไวและ

ความจำเพาะในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจากเสมหะโดยตรง วิธีนี้สามารถให้ผลการเพาะเชื้อภายใน 2 สัปดาห์เร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่เพาะเลี้ยงบน LJ medium สามารถเตรียมใช้ตัวเองในห้องปฏิบัติการ ทำให้มีราคาถูกกว่าการเพาะเลี้ยงในเครื่องอัตโนมัติ (22)

นอกจากนี้ยังมีชุดทดสอบสำหรับการเพาะเชื้อที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาขึ้นเองและยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาด เรียกว่า non-commercial methods ซึ่งชุดทดสอบเหล่านี้ต้องทำการทดสอบโดยบุคลากรที่ได้รับการฝึกอบรมเป็นอย่างดี เนื่องจากมีแนวโน้มเกิดความผิดพลาดได้ ยกตัวอย่างเช่น การตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารแข็งโดยดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธี Thin layer agar (TLA) หรือในอาหารเหลวตามวิธี Microscopic observational drug susceptibility assay (MODS) การตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจากการเปลี่ยนสีตามวิธี Colorimetric redox indicator (CRI) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อและระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2 (21)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อและระบบการเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

| อาหารเลี้ยงเชื้อ/ ระบบการเพาะเลี้ยง เชื้อ | ความไว (%) | อัตราการ ปนเปื้อน (%) | เวลาในการ ตรวจพบเชื้อ (วัน) | ข้อดี | ข้อจำกัด |
|---|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|---|
| LJ medium/ Ogawa medium | 74 | 7.27 | 25.5 | -ราคาถูก -สังเกตเห็นโคโลนี ชัดเจน | -ให้ผลการทดสอบช้า -คุณภาพของอาหารขึ้นกับ ส่วนผสม (ไข่) |
| Middlebrook 7H11 medium | 67.3 | 6.85 | 25.1 | -ราคาถูก | -ให้ผลการทดสอบช้า -ความไวของการทดสอบต่ำ |
| BACTEC MGIT 960 system | 89.4 | 9.3 | 12.8 | -ผลการทดสอบรวดเร็ว -ความไวของการ ทดสอบสูง -ทดสอบได้ปริมาณมาก | -ราคาแพง -อัตราการปนเปื้อนสูง -มีค่าบำรุงรักษาเครื่องมือ |
| BACTEC 460 TB system | 92.6 | 4 | 14.4 | -ผลการทดสอบรวดเร็ว -ความไวของการ ทดสอบสูง | -ราคาแพง -มีสารกัมมันตรังสี -มีค่าบำรุงรักษาเครื่องมือ |
| MB/BacT system | 91.6 | 5.9 | 16.6 | -ความไวของการ ทดสอบสูง -ทดสอบได้ปริมาณมาก | -ราคาแพง -มีค่าบำรุงรักษาเครื่องมือ |
| MB redox | 84 | 3.6 | 18.7 | -อ่านผลการทดสอบได้ ง่ายจากการเปลี่ยนสี (redox indicator) | -ราคาแพง |
| TLA | 81.2 | 10.1 | 12.8 | -ราคาถูก -สังเกตเห็นโคโลนี ชัดเจน | -ความไวของการทดสอบต่ำ -อัตราการปนเปื้อนสูง -ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ |
| MODS | 87.6 | 3.35 | 10.9 | -ผลการทดสอบรวดเร็ว -ราคาถูก -ความไวของการ ทดสอบสูง | -ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ -การทดสอบมีความยุ่งยาก |

เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสามารถนำไปจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรค (MTB) ออกจาก เชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ (Nontuberculous Mycobacteria: NTM) โดยวิธีที่ทำได้ง่าย และรวดเร็ว เช่น วิธีอิมมิวโนโครมาโตกราฟี (Immunochromatography) ซึ่งเป็นชุด ทดสอบสำเร็จรูปในการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้แก่ MPT64 antigen (SD Bioline TB Antigen, สาธารณรัฐเกาหลีใต้) หรือ MPB64 antigen (Cappilia TB-Neo Assay, ประเทศสหรัฐอเมริกา) (39) วิธีการทดสอบทางชีวเคมีที่สำคัญ ในการแยกพิสูจน์เชื้อ MTB ได้แก่ 1. การทดสอบ Niacin เชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย สามารถผลิต Niacin ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยารีดอกซ์ของเซลล์ โดยเชื้อ MTB สามารถผลิต Niacin ได้ปริมาณมาก ทำให้มีการสะสมอยู่รอบ ๆ โคลนีสบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้น้ำกลั่นชะ Niacin ออกมาจากโคลนและทดสอบด้วย Niacin strip สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีเหลือง 2. การทดสอบ Nitrate reduction test เชื้อ MTB สามารถรีดิวซ์ Nitrate เป็น Nitrite ได้มากเมื่อเทียบกับเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ ทำให้ได้สารประกอบ Sulfobenzene azo- α -naphthylamine ที่มีสีชมพูแดง 3. การ ทดสอบ Catalase ที่ 68 องศาเซลเซียส เชื้อมัยโคแบคทีเรียเกือบทุกชนิดสามารถสร้าง เอนไซม์ Catalase ได้ แต่เอนไซม์นี้ของเชื้อ MTB จะสูญเสียการทำงานที่เมื่อถูกความร้อน ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที (39) นอกจากนี้ยังมีวิธีการทดสอบเพื่อ จำแนกเชื้อ MTB ออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ (NTM) ดังแสดงในตารางที่ 3 (39)

ตารางที่ 3 แสดงการแยกพิสูจน์เชื้อวัณโรค (MTB) ออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ (NTM)

| คุณสมบัติ | MTB | NTM |
|-------------------------------------|--------------------------------------|---|
| อัตราการเจริญเติบโต | มากกว่า 7 วัน | 3 วันหรือมากกว่า 7 วัน |
| ลักษณะของโคโลนี | โคโลนีแห้ง ขรุขระ คล้ายดอกกระหล่ำ | มีทั้งโคโลนีแห้ง ชื้น ขอบผิว เรียบขรุขระ นูน แผ่ |
| สีของโคโลนี | สีครีมหรือสีฟางข้าว | สีเหลืองเข้ม ส้ม ครีม ขาว |
| Niacin test | บวก | ลบ |
| Nitrate Reduction test | บวก | บวกหรือลบ |
| 68°C Catalase test | ลบ | บวก |
| เจริญใน rho-nitrobenzoic acid (PNB) | ไม่เจริญ | เจริญ |

7.3 การตรวจทางอณูชีววิทยา (molecular examination)

เป็นวิธีที่นิยมมากในปัจจุบันเนื่องจากให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วในการช่วยวินิจฉัยเชื้อวัณโรคพร้อม ๆ กับสามารถตรวจการดื้อยาได้ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถแยกเชื้อที่มีชีวิตออกจากเชื้อที่ตายแล้วที่เกิดจากการรักษาได้ จึงไม่นิยมนำมาใช้เป็นวิธีในการติดตามการรักษา และชุดทดสอบมีราคาแพง จึงอาจเป็นข้อจำกัดของการใช้งานโดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ระดับปานกลางและระดับต่ำ วิธีวินิจฉัยวัณโรคทางอณูชีววิทยาแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เทคนิค Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) เทคนิค Line probe assays (LPAs) เทคนิค DNA sequencing assays โดยมีทั้งชุดทดสอบที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดและชุดทดสอบที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ (In-house methods) (5)

7.3.1 เทคนิค Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) เป็นการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน ชุดทดสอบที่นิยมใช้ เช่น ชุดทดสอบ Amplicor MTB test (บริษัท Roche Diagnostic จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) จะตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ ยีน 16S rRNA จากนั้นตรวจวัด amplified products ด้วยเทคนิค hybridization สามารถทำในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อน (decontamination) และการทำให้เข้มข้น (concentration) แล้ว มีความไวของการทดสอบเท่ากับ 90% ถึง 100% และมีความจำเพาะเท่ากับ 91.3% ถึง 100% ในเสมหะที่ย้อมพบเชื้อชุดทดสอบ AMTD assay โดยใช้เทคนิค isothermal transcription-mediated amplification (TMA) ในการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA และตรวจวัด RNA amplicons ด้วยเทคนิค chemiluminescence มีความไวของชุดทดสอบเท่ากับ 91.7% ถึง 100% ในเสมหะที่ย้อมพบเชื้อ และมีความจำเพาะเท่ากับ 92.1% ถึง 100% ชุดทดสอบ ProbeTec ET Direct TB tests (บริษัท Beckton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้เทคนิค strand displacement amplification (SDA) ในการตรวจเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย IS6110 และ 16S rRNA มีความไวของชุดทดสอบเท่ากับ 98.5% ถึง 100% ในเสมหะที่ย้อมพบเชื้อ

และมีความจำเพาะเท่ากับ 98.9% ถึง 100% ชุดทดสอบ Eiken LAMP assay (บริษัท Eiken Chemical จำกัด ประเทศญี่ปุ่น) โดยใช้เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นการตรวจวิเคราะห์ยีน *gyrB* อ่านผลด้วยตาเปล่าผ่านหลอด ultraviolet light มีความไวในการทดสอบเท่ากับ 97.7% ในเสมหะที่ย้อมพบเชื้อ และมีความจำเพาะเท่ากับ 99% (19, 36)

นอกจากนี้ยังมีชุดทดสอบทางอณูชีววิทยาที่สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคพร้อมกับตรวจหาการดื้อยาได้ เช่น ชุดทดสอบ Xpert MTB/RIF ultra (บริษัท Cepheid จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้เทคนิค Real-time polymerase chain reaction สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคร่วมกับการตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ในเวลาเดียวกัน โดยการเพิ่มจำนวนและตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายคือยีน *rpoB* มีความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อวัณโรคในเสมหะเท่ากับ 88% และ 96% ตามลำดับ (40)

7.3.2 Line Probe Assay เช่น ชุดทดสอบ Genotype MTBDR-plus (บริษัท Hain Lifesciences จำกัด ประเทศเยอรมนี) สามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคพร้อมกับตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Isoniazid และ Rifampicin โดยการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *rpoB* ยีน *katG* และยีน *inhA* ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยหลักการ reverse hybridization ที่มีการตรึงดีเอ็นเอติดตามไว้บนแถบ nitrocellulose membrane หากภายในสิ่งส่งตรวจมีดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะสามารถจับจำเพาะกับดีเอ็นเอติดตามและปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีเกิดขึ้น มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Rifampicin เท่ากับ 98% ความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 84% และ 99% ตามลำดับ ชุดทดสอบ INNO-LiPA Rif-TB kit (บริษัท Innogenetics จำกัด ประเทศเบลเยียม) ใช้หลักการตรวจเช่นเดียวกับชุดทดสอบ Genotype MTBDR-plus แต่เป็นการตรวจหาเชื้อวัณโรคพร้อมกับการตรวจการดื้อยา Rifampicin มีความไวของชุดทดสอบเท่ากับ 82% ถึง 100% และความจำเพาะเท่ากับ 92% ถึง 100% (36)

7.3.3 DNA sequencing assay เป็นการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อมัคโคแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16s rDNA สามารถแยกเชื้อกลุ่ม MTB complex ออกจากเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่น ๆ (Nontuberculous mycobacteria: NTM) ได้ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี Next-generation sequencing (NGS) วิธี Sanger sequencing วิธี Pyrosequencing เป็นต้น นอกจากนี้ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคแล้วยังมีประโยชน์ในการศึกษาด้านระบาดวิทยา สามารถใช้ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยาโดยหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาและเป็นเครื่องมือในการหาหินที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาใหม่ ๆ ได้ (36)

7.4 การตรวจหาสารบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker-based methods)

เป็นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคจากสารน้ำในร่างกาย เช่น ซีรัม พลาสมา หรือปัสสาวะ มีความสำคัญในการวินิจฉัยวัณโรคในเด็ก (pediatric TB patients) วัณโรคนอกปอด (extrapulmonary TB patients) และวัณโรคในผู้ป่วยโรคเอดส์ (HIV comorbid patients) ซึ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากเสมหะได้ยากกว่าผู้ป่วยวัณโรคทั่วไป มีหลายวิธี เช่น วิธี TB LAM Ag ใช้หลักการ Lateral Flow ในการตรวจหา lipoarabinomannan protein ที่ถูกปล่อยออกมาในปัสสาวะของผู้ป่วยวัณโรค สามารถตรวจในผู้ป่วยวัณโรคติดเชื้อเอชไอวีที่มี CD4 ต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อไมโครลิตร แต่เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่ำ วิธี Volatile Organic Compound (VOC) เป็นการตรวจหาสารไอระเหยที่ผลิตจากเชื้อวัณโรคในลมหายใจของผู้ป่วยโดยใช้เครื่อง Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (19) การทดสอบผิวหนังต่อเชื้อวัณโรค (tuberculin skin test: TST) ทำโดยฉีดโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ (purified protein derivative: PPD) เข้าไปได้ผิวหนัง ถ้าร่างกายเคยได้รับเชื้อจะมีการต่อต้านและเกิดการบวมอักเสบจนเกิดรอยนูน หากรอยนูนนั้นมีขนาดมากกว่า 10 มิลลิเมตร ถือว่าการทดสอบให้ผลบวก แสดงว่าเคยสัมผัสเชื้อวัณโรคและมีโอกาสที่จะเป็นวัณโรคได้ในอนาคต การทดสอบ TST อาจให้ผลบวกลงในผู้ที่ได้รับวัคซีน BCG มาก่อน อีกวิธีหนึ่งคือการตรวจ Interferon gamma release assays (IGRA) เป็นวิธีที่ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (CDC) แนะนำให้ใช้

ในการวินิจฉัยวัณโรคระยะแฝง (latent TB infection) โดยการบ่มตัวอย่างเลือดกับ PPD ได้แก่ แอนติเจน ESAT-6 และแอนติเจน CFP-10 ซึ่งเป็นแอนติเจนที่ไม่พบในวัคซีน BCG จึงไม่สามารถทำให้เกิดผลบวกหลง จากนั้นวัดปริมาณ interferon gamma (IFN- γ) ที่ปลดปล่อยมาจากเม็ดเลือดขาว lymphocyte ที่ถูกกระตุ้น โดยใช้หลักการของ enzyme-linked immunosorbent assay (41) ผลบวกแสดงถึงการติดเชื้อหรือได้รับเชื้อวัณโรค ข้อดีของการตรวจ IGRA คือ ประหยัดเวลา เนื่องจากสามารถทำการตรวจให้ผลได้ในครั้งเดียว ผู้ป่วยไม่ต้องเข้ามาพบแพทย์หลายครั้ง และไม่เกิดผลบวกหลงจากการได้รับวัคซีน BCG มาก่อน นอกจากนี้การวินิจฉัยวัณโรคนอกปอดทำได้โดยการตรวจเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ การตรวจด้วยวิธีซีทีสแกน (CT Scan) เอ็มอาร์ไอ (MRI) หรือ อัลตราซาวด์ ซึ่งทำให้เห็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อวัณโรคตามอวัยวะต่าง ๆ หรือการตรวจน้ำไขสันหลัง (Lumbar Puncture) ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการของวัณโรคที่สมองและระบบประสาท (19, 36)

8. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค (Drug susceptibility testing: DST)

การวินิจฉัยวัณโรคคือยาทำโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยนำเสมหะหรือส่งสิ่งตรวจที่มีเชื้อวัณโรคมาทดสอบว่าเชื้อมีความไวต่อการรักษาด้วยยาใดและต่อยาใด เพื่อช่วยเป็นแนวทางหรือข้อมูลในการเลือกให้ยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วย การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

8.1 การทดสอบความไวต่อยาแบบวิธีฟีโนไทป์ (Phenotypic drug susceptibility test)

การทดสอบความไวต่อยาแบบวิธีฟีโนไทป์ (Phenotypic DST) เป็นการดูความสามารถของเชื้อในการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมยารักษาวัณโรคในความเข้มข้นระดับหนึ่งที่เชื้อวัณโรคคือยาเท่านั้นสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ มีวิธีการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ 1. การทดสอบความไวต่อยาแบบตรง (Direct DST) ทำโดยทดสอบความไวต่อยาของเชื้อที่อยู่ในสิ่งส่งตรวจโดยตรงจึงเหมาะสมกับสิ่งส่งตรวจที่ตรวจพบเชื้อ AFB จำนวนมาก สามารถให้ผลการทดสอบรวดเร็วเนื่องจากลดขั้นตอนในการเพาะเชื้อ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อก่อนการทดสอบและไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อที่ใช้ในการ

ทดสอบได้ เทคนิคที่สามารถทำการทดสอบความไวต่อยาแบบตรง เช่น เทคนิค Microscopic observation drug susceptibility (MODS) เทคนิค Thin layer agar (TLA) ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ในการตรวจติดตามการเจริญของเชื้อเพื่อดูว่าดื้อยาปฏิชีวนะหรือไม่ (19) เป็นต้น 2. การทดสอบความไวต่อยาแบบอ้อม (Indirect DST) ซึ่งเป็นการทดสอบกับเชื้อวัณโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ (pure colony) แล้ว จึงให้ผลการทดสอบซ้ำกว่าการตรวจแบบ Direct DST แต่สามารถเลือกทำการทดสอบเฉพาะเชื้อ MTB เท่านั้น และสามารถกำหนดปริมาณเชื้อได้ตามวิธีที่มาตรฐาน (42) โดยวิธีการทดสอบความไวต่อยาสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

- 8.1.1 วิธี Proportional ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวต่อยา ทำการทดสอบโดยเพาะเชื้อที่ทราบจำนวนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียา หลังบ่มเพาะเชื้อ 3 ถึง 4 สัปดาห์อ่านผลโดยการนับจำนวนโคโลนีที่เจริญและนำมาคำนวณหาสัดส่วนของโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่มียาหารด้วยจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารที่ไม่มียา หากมากกว่าเท่ากับ 1% จะถือว่าเป็นเชื้อดื้อต่อยาต้านวัณโรคชนิดนั้น ๆ (42)
- 8.1.2 วิธี Absolute concentration ทำการทดสอบโดยเพาะเชื้อปริมาณ 2,000 ถึง 10,000 โคโลนี ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียาผสมอยู่ หากเชื้อสามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่มียามากกว่า 20 โคโลนีขึ้นไป แสดงว่าเชื้อดื้อต่อยาต้านวัณโรคชนิดนั้น ๆ เนื่องจากการทดสอบ 2 วิธีที่กล่าวมาจะต้องอาศัยการนับจำนวนโคโลนีจึงนิยมทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เช่น Löwenstein-Jensen (LJ) สามารถทดสอบในยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (First line-DST) และยารักษาวัณโรคแนวที่ 2 (Second line-DST) ใช้เวลาในการอ่านผล 4 ถึง 6 สัปดาห์ หรือ อาหารที่มีวุ้น เช่น Middlebrook 7H10/7H11 ที่ใช้เวลาในการอ่านผล 4 สัปดาห์ (42)
- 8.1.3 วิธี Resistance ratio ทำการทดสอบโดยหาความเข้มข้นของยาที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimal inhibitory concentration: MIC) ซึ่งนิยมทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook 7H9

- 8.1.4 วิธีการทดสอบความไวต่อยาด้วยเครื่อง BECTEC MGIT 960 ของบริษัท Becton Dickinson จำกัด สามารถทดสอบความไวต่อยาจากสิ่งส่งตรวจได้ทั้งวิธีแบบตรงและแบบอ้อม เป็นเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติที่สามารถทดสอบความไวต่อยา Streptomycin ยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Ethambutol และ ยา Pyrazinamide ได้ โดยใช้หลักการของ Oxygen consuming ที่กั้นหลอดจะมีสีฟลูออเรสเซนซ์ที่จับอยู่กับออกซิเจน หากมีการเจริญของเชื้อออกซิเจนจะถูกนำไปใช้ ส่งผลให้สารฟลูออเรสเซนซ์หลุดออกมาเป็นอิสระและสามารถตรวจวัดการเปล่งแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต โดยหลอดทดสอบ Mycobacterial growth indicator tube (MGIT) จะบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Middlebrook 7H9 Broth ปริมาณ 7 มิลลิลิตร ก่อนการทดสอบจะต้องเติมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ได้แก่ oleic acid, bovine albumin, dextrose และ catalase การทดสอบความไวต่อยาทำได้โดยเฉพาะเชื้อลงในหลอดทดสอบที่มียาและหลอดควบคุมที่ไม่มียา (Growth control tube) เครื่องจะทำการอ่านและแปลผลเมื่อหลอดควบคุมมีหน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) มากกว่า 400 หากหลอดที่มียามีค่า Growth unit มากกว่า 100 ถือว่า เชื้อดื้อต่อยานั้น ๆ ข้อดีของการตรวจด้วยเครื่อง BACTEC MGIT 960 คือ ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วภายในระยะเวลา 4 ถึง 13 วัน ข้อเสียของวิธีนี้คือพบอัตราการปนเปื้อนสูงและชุดเครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง (43)
- 8.1.5 วิธีแบบ non-commercial เป็นวิธีทดสอบความไวต่อยาที่พัฒนาขึ้นใหม่ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย มีราคาถูก และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการที่ขาดเครื่องมือ อุปกรณ์หรือชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับการทดสอบความไวต่อยาที่มีราคาแพง แต่การทดสอบด้วยวิธีเหล่านี้จะต้องมีความระมัดระวังในการทำการทดสอบ การอ่านและแปลผล เนื่องจากยังขาดการวางมาตรฐานให้เป็นที่ยอมรับ อย่างไรก็ตามองค์การอนามัยโลกได้มีการตรวจสอบและอนุมัติให้ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการระดับอ้างอิง (20) ได้แก่

- 8.1.5.1 วิธี Microscopic observation drug susceptibility (MODS) เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยาทั้งแบบโดยตรงและแบบอ้อม โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ผสมยาและไม่ผสมยา และใช้กล้องจุลทรรศน์ในการตรวจติดตามการเจริญของเชื้อเพื่อดูว่าตัวยามีฤทธิ์ฆ่าเชื้อหรือไม่ ให้ผลการทดสอบภายใน 10 ถึง 14 วัน มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Rifampicin อยู่ที่ 98% และ 99% ตามลำดับ และมีความไวในการตรวจการดื้อยา Isoniazid อยู่ที่ 91% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน conventional indirect proportion DST ที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ medium ซึ่งการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีนี้ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope (20)
- 8.1.5.2 วิธี Nitrate reductase assays (NRA) สามารถทำการทดสอบความไวต่อยาทั้งแบบโดยตรงและแบบอ้อม โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ผสมยาและไม่ผสมยา จากนั้นวัดความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสีจากความสามารถของเชื้อ MTB ที่ทำปฏิกิริยาลดไนเตรทลง ซึ่งต้องมีขั้นตอนในการเติมน้ำยาสำหรับการตรวจวัดหลังจากการเพาะเชื้อแล้ว อาจส่งผลให้เกิดการฟุ้งกระจายของเชื้อวัณโรคได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Rifampicin อยู่ที่ 97% และ 100% ตามลำดับ และมีความไวในการตรวจการดื้อยา Isoniazid อยู่ที่ 97% และ 99% ตามลำดับ (20)
- 8.1.5.3 วิธี Colorimetric redox indicator (CRI) เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยาแบบอ้อม โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ผสมยาและไม่ผสมยาใน microtiter plate และใช้ redox indicator ในการตรวจหาการเจริญเติบโตของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อที่เจริญได้ในอาหารทดสอบแสดงถึงการดื้อต่อยาของเชื้อ มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Rifampicin อยู่ที่ 98% และ 99% ตามลำดับ และมี

ความไวในการตรวจการดื้อยา Isoniazid อยู่ที่ 97% และ 98% ตามลำดับ
(20)

การทดสอบความไวต่อยาแต่ละวิธีมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของยาในการทดสอบแตกต่างกัน โดยคู่มือสำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคขององค์การอนามัยโลก ได้กำหนดค่าความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 (44)



ตารางที่ 4 แสดงความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($\mu\text{g/mL}$) ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

| ยา | ความเข้มข้นสุดท้ายของยาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($\mu\text{g/mL}$) | | | |
|-----|--|------------------|------------------|----------------------------|
| | Löwenstein-Jensen | Middlebrook 7H10 | Middlebrook 7H11 | BACTEC MGIT liquid culture |
| R | 40.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| H | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.1 |
| E | 2.0 | 5.0 | 7.5 | 5.0 |
| Z | - | - | - | 100 |
| LFX | 2.0 | 1.0 | - | 1.0 |
| MFX | 1.0 | 0.5 | 0.5 | 0.25 |
| BDQ | - | - | 0.25 | 1.0 |
| LZD | - | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| CFZ | - | - | - | 1.0 |
| CS | - | - | - | - |
| TRD | - | - | - | - |
| DLM | - | - | 0.016 | 0.06 |
| AMK | 30.0 | 2.0 | - | 2.0 |
| S | 4.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 |
| ETO | 40.0 | 5.0 | 10.0 | 5.0 |
| PTO | 40.0 | - | - | 2.5 |
| PAS | - | - | - | - |

*หมายเหตุ R หมายถึงยา Rifampicin, H หมายถึงยา Isoniazid, E หมายถึงยา Ethambutol, Z หมายถึงยา Pyrazinamide, LFX หมายถึงยา Levofloxacin, MFX หมายถึงยา Moxifloxacin, BDQ หมายถึงยา Bedaquiline, LZD หมายถึงยา Linezolid, CFZ หมายถึงยา Clofazimine, CS หมายถึง ยา Cycloserine, TRD หมายถึงยา Terizidone, DLM หมายถึงยา Delamanid, AMK หมายถึงยา Amikacin, S หมายถึงยา Streptomycin, ETO หมายถึงยา Ethionamide, PTO หมายถึงยา Prothionamide, PAS หมายถึงยา para-aminosalicylic acid

8.2 การตรวจวินิจฉัยการดื้อยาด้วยวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic drug susceptibility test)

นอกจากการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการพิสูจน์เชื้อวัณโรคแล้ว ยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยาได้ด้วย โดยเทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ เทคนิค NAATs และ DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ชุดทดสอบมักมีราคาแพง โดยวิธีการตรวจที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก มี 2 วิธี คือ 1. เทคนิค real-time PCR (Xpert MTB/ RIF assay) 2. เทคนิค amplification and reverse hybridization (Line probe assay: LPA)

8.2.1 เทคนิค Real-time PCR ได้แก่ ชุดทดสอบ Xpert MTB/RIF ultra (บริษัท Cepheid จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) เป็นเครื่องตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติที่องค์การอนามัยโลกได้ให้การรับรองในปี ค.ศ. 2013 ให้เป็นวิธีในการวินิจฉัยวัณโรคแทนการตรวจดูเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากสามารถตรวจหาเชื้อวัณโรคร่วมกับการตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ได้ในเวลาเดียวกัน มีความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อวัณโรคเท่ากับ 88% และ 96% ตามลำดับ (40) และความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อต่อยา Rifampicin เท่ากับ 96% และ 98% ตามลำดับ โดยในตัวอย่างเสมหะต้องมีเชื้ออย่างน้อย 16 ตัวต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาในการวินิจฉัยรวดเร็วภายใน 90 นาที แต่ชุดทดสอบมีราคาแพง และมีค่าบำรุงรักษาเครื่องมือทุกปี (40)

8.2.2 Line Probe Assay เช่น ชุดทดสอบ Genotype MTBDR-plus (บริษัท Hain Lifesciences จำกัด ประเทศเยอรมนี) ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 2008 ซึ่งใช้เทคนิค DNA strip reverse-hybridization ในการตรวจหาการดื้อต่อยา Isoniazid และยา Rifampicin เพื่อวินิจฉัยเชื้อ MDR-TB หรือชุดทดสอบ Genotype MTBDR-sl ที่ตรวจการดื้อต่อยา กลุ่ม Fluoroquinolones และกลุ่ม Second line injectable drugs เพื่อวินิจฉัยเชื้อ PRE-XDR TB และ XDR-TB ใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 5 ถึง 6 ชั่วโมง เริ่มจากการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะหรือโคลนินของเชื้อ จากนั้น

จึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมาทดสอบกับ DNA strip ที่มีการตรึงดีเอ็นเอติดตามไว้บนแถบ nitrocellulose membrane หากภายในสิ่งส่งตรวจมีดีเอ็นเอเป้าหมายจะสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอติดตาม และปรากฏให้เห็นเป็นแถบสี อ่านผลได้ด้วยตาเปล่า องค์การอนามัยโลก แนะนำวิธีนี้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคที่เสมหะตรวจพบเชื้อ (smear-positive samples) และใช้ในการคัดกรองผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรคค้ำยาในห้องปฏิบัติการที่มีปริมาณงานมาก มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการค้ำยา Rifampicin เท่ากับ 91.7% และ 96.6% ตามลำดับ มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการค้ำยา Isoniazid เท่ากับ 70.6% และ 99.1% ตามลำดับ โดยต้องมีเชื้อวัณโรคในตัวอย่างที่ทดสอบอย่างน้อย 160 เซลล์ (7, 36)

9. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยา

9.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง แบ่งเป็น

- 9.1.1 อาหารที่มีไข่เป็นส่วนผสมหลัก (Egg-based medium) เช่น Lowenstein-Jensen medium (LJ medium) ที่ผลิตขึ้นมาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1931 โดย Löwenstein และมีการปรับปรุงสูตรโดย Jensen ในปี ค.ศ. 1932 มีส่วนผสมของแป้งมันฝรั่งและ asparagine เป็นแหล่งของไนโตรเจนและวิตามิน มี monopotassium phosphate และ magnesium sulfate ช่วยเสริมการเจริญเติบโต มี glycerol และไข่เป็นแหล่งของกรดไขมันและโปรตีนที่จำเป็นในการเจริญเติบโต มี malachite green และ sodium citrate เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น Ogawa medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีส่วนประกอบคล้าย LJ medium ยกเว้นใช้แหล่งอาหารเป็น sodium glutamate แทน asparagine ทำให้อาหารชนิดนี้มีราคาถูกกว่า แต่เพิ่มความเข้มข้น glycerol ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น อาหารชนิดแข็งเหล่านี้สามารถเตรียมใช้ได้เองภายในห้องปฏิบัติการ สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้หลายสัปดาห์ มีราคาถูกและมีความจำเพาะสูง สามารถสังเกตเห็นการเจริญเติบโตของเชื้อได้ด้วยตาเปล่าและ

เลือกโคโลนีเชื้อไปทำการทดสอบต่อได้ พบอัตราการปนเปื้อนต่ำ แต่ให้ผลการตรวจพบเชื้อล่าช้าประมาณ 2 ถึง 8 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ เช่น ส่วนประกอบของสารประกอบอินทรีย์ในไข่และสารประกอบแอมโมเนียสามารถเป็นอันตรายต่อเชื้อวัณโรคบางสายพันธุ์ได้ (36)

- 9.1.2 อาหารที่มีวุ้นเป็นส่วนผสมหลัก (Agar-based medium) เช่น Middlebrook 7H10 ผลิตขึ้นในปี ค.ศ. 1958 โดย Middlebrook และ Cohn ซึ่งมีส่วนผสมของสารอาหารพิเศษ ได้แก่ inorganic salts, vitamins, cofactors, glycerol, malachite green และ agar และหากเพิ่มเอนไซม์สำหรับย่อย casein ลงไปจะเรียกว่า Middlebrook 7H11 อาหารทั้ง 2 นี้จะต้องมีการเติมสารช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค ได้แก่ OADC (oleic acid, bovine albumin fraction v, dextrose และ detoxifying catalase) โคโลนีของเชื้อวัณโรคที่เจริญบนอาหารชนิดนี้จะมีลักษณะแบน ขรุขระและโปร่งแสง จึงสามารถสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อผ่านกล้อง stereomicroscope ได้ภายใน 10 ถึง 12 วัน หลังการบ่มเพาะเชื้อ สามารถนำอาหารชนิดนี้มาผสมกับยาต้านวัณโรค เพื่อทำการทดสอบความไวต่อยาได้ แต่อาหารชนิดนี้ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน เนื่องจากมีความไม่คงตัวเมื่อโดนแสงและความร้อน ทำให้เกิดสาร formaldehyde จากสารอาหาร OADC ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ อาหารชนิดนี้ไม่นิยมใช้สำหรับการเพาะเชื้อในงานประจำวัน เนื่องจากมีราคาค่อนข้างแพง (36)

9.2 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

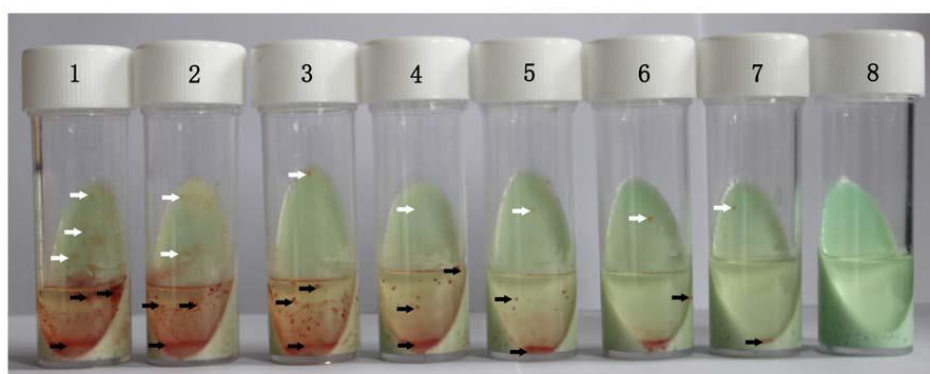
นอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายแล้วยังมีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวหลายชนิดที่ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อช่วยส่งเสริมให้เชื้อเจริญเติบโตเร็วขึ้น เช่น Dubos broth ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็น เช่น inorganic salts, เอนไซม์ย่อย casein, L-asparagine, polysorbate 80, oleic acid และ bovine albumin อาหารเหลวชนิด Middlebrook 7H9 ซึ่งประกอบด้วย inorganic salts, sodium citrate, albumin และอาจมีการเติมสาร glycerol, polysorbate 80 และ OADC (oleic acid, bovine albumin

fraction v, dextrose และ detoxifying catalase) อาหารเหลวชนิด Middlebrook 7H12 มีการพัฒนามาจาก Middlebrook 7H9 แต่มีการเติมสาร glycerol, bovine serum albumin, casein hydrolysate, catalase และ ^{14}C -Palmitic acid ที่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย โดยอาหารแต่ละชนิดจะมีการปรับปรุงสูตรเพื่อให้เหมาะสมสำหรับใช้กับเครื่องอัตโนมัติแต่ละระบบและสิ่งส่งตรวจแต่ละประเภท สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติที่นิยมใช้ เช่น เครื่อง BACTEC MGIT 960 ของบริษัท Becton Dickinson จำกัด ที่ใช้อาหารชนิด Middlebrook 7H9 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจหาการเจริญของเชื้อด้วยหลักการของ Oxygen consuming เครื่อง BacT/Alert 3D ของ บริษัท bioMérieux จำกัด ประเทศฝรั่งเศส ใช้อาหารชนิด Middlebrook 7H9 เช่นเดียวกันแต่วัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยหลักการ CO_2 accumulation เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีความไวสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็งถึง 10% สามารถให้ผลการทดสอบรวดเร็วภายในเวลา 1 ถึง 2 สัปดาห์ แต่ต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง และพบมีอัตราการปนเปื้อนสูง ไม่สามารถสังเกตเห็นการเจริญเติบโตและลักษณะโคโลนีของเชื้อได้ด้วยตาเปล่า (36, 43)

9.3 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (biphasic medium: BM)

เนื่องจากเชื้อวัณโรคบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว จึงมีการแนะนำให้มีการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งร่วมด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเชื้อ ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาอาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งเป็นอาหารผสมระหว่างอาหารชนิดแข็งที่ใช้เป็นฐาน (slant) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้เป็นส่วนบน เช่น การศึกษาของ Pawar และคณะ พัฒนาอาหาร biphasic medium โดยใช้อาหารที่ผสมระหว่าง Middlebrook 7H11 agar slant และ Middlebrook 7H9 broth สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคได้ดีกว่าการเพาะเชื้อลงบน LJ medium (45) การศึกษาของ Cui และคณะ ได้พัฒนาอาหารผสมระหว่าง LJ medium กับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook 7H9 ที่เติมสาร colorimetric redox indicator (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride: TTC) (ดังแสดงในภาพที่ 3) (22) สำหรับตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของสารจากสีเหลืองเป็นสีชมพูแดง พบว่า

อาหารที่พัฒนาขึ้นมีอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคได้ดีและรวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่เพาะเลี้ยงบน LJ medium ให้ผลการเพาะเชื้อภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ ความไวและความจำเพาะในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคจากเสมหะโดยตรงสามารถเตรียมใช้ได้เองในห้องปฏิบัติการ ทำให้มีราคาถูกกว่าอาหารแบบ automated liquid (22) อาหาร biphasic medium ชนิดต่างๆ ที่มีการศึกษาวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 5



ภาพที่ 3 แสดงการเพาะเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด biphasic media ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ โดยใช้เชื้อความเข้มข้น 10^7 ถึง 10^0 CFU/mL (ขวดที่ 1 ถึง 8 ตามลำดับ)

ตารางที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด biphasic media ชนิดต่าง ๆ

| วัตถุประสงค์ การใช้งาน | สูตรอาหาร biphasic | | Inoculum ตั้งต้น | เวลาอ่านผล | เอกสาร อ้างอิง |
|---------------------------|---|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|
| | อาหารแข็ง | อาหารเหลว | | | |
| เพาะเลี้ยงเชื้อ | Middlebrook 7H11 agar | Middlebrook 7H9 broth | Decontaminated sputum | 17 วัน | (45) |
| เพาะเลี้ยงเชื้อ | Lowenstein- Jensen medium | Middlebrook 7H9 broth | Decontaminated sputum | 20 วัน | (22) |
| เพาะเลี้ยงเชื้อ | Middlebrook 7H11 agar | Middlebrook 7H9 broth | Decontaminated sputum | 21 วัน | (46) |
| เพาะเลี้ยงเชื้อ | Lowenstein- Jensen medium | Middlebrook 7H9 broth | Decontaminated sputum | 2-4 สัปดาห์ | (47) |
| เพาะเลี้ยงเชื้อ | Middlebrook 7H11 agar, chocolate agar | Middlebrook 7H9 broth | Decontaminated sputum | 19 วัน | (48) |
| PZA DST | Lowenstein- Jensen medium | Kirchner medium | MGIT broth 50 µl | 2-3 สัปดาห์ | (49) |

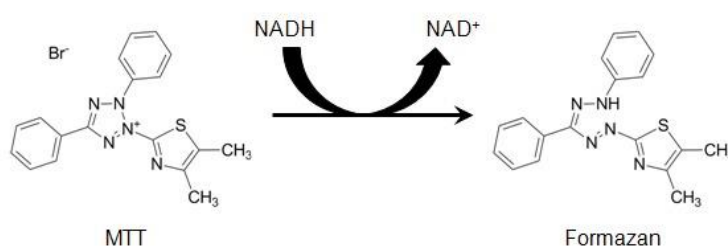
*หมายเหตุ PZA DST หมายถึง การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide

10. รีดอกซ์อินดิเคเตอร์ (redox indicator)

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อด้วยตาเปล่า จึงมีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ช่วยในการติดตามการเจริญของเชื้อ เช่น การวัด metabolic activity จากการใช้ redox indicator ซึ่งเป็นสารที่มีรูปออกซิไดซ์ (oxidized form) และรูปรีดิวซ์ (reduced form) ที่มีสีแตกต่างกันอย่างชัดเจน การวัด metabolic activity สามารถบ่งบอกว่าเซลล์นั้นยังมีพลังงานที่จะใช้ในการเพิ่มจำนวนอยู่หรือไม่ กลุ่มเซลล์ที่มี metabolic activity มากแสดงถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตขึ้นด้วย โดยทำการวัดสภาวะ reduction environment ของ mitochondria ในเซลล์ พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงในการนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยสารที่นิยมนำมาใช้ในการวัดความมีชีวิตของเซลล์ได้แก่

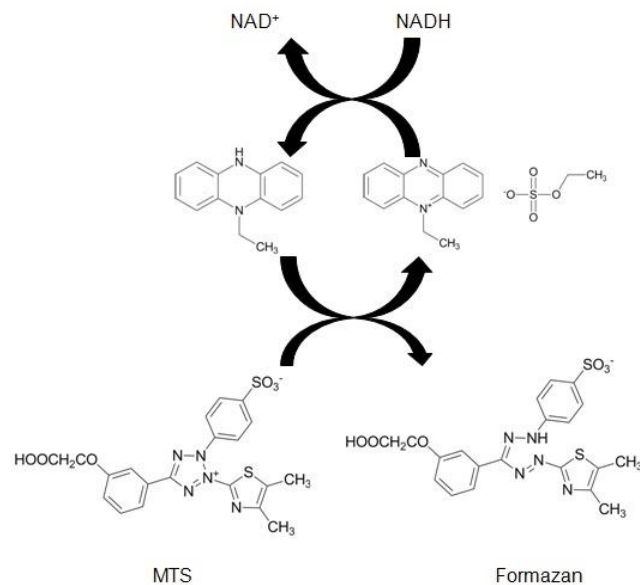
10.1 Tetrazolium compounds

เป็นสารในการวัดการเพิ่มจำนวนของเซลล์จากการตรวจดู metabolic activity ที่นิยมใช้ เช่น สาร MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide เป็นสารที่มีประจุบวกและสามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ยูคาริโอตได้ เมื่ออยู่ในรูปออกซิไดซ์จะมีสีเหลืองและถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้สารที่มีสีม่วงของ formazan (ภาพที่ 4) (50) ซึ่งเป็นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำและจะสะสมอยู่ภายในเซลล์และในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีการรายงานความเป็นพิษของสาร MTT โดยพบว่าสาร formazan ที่เกิดขึ้นมีส่วนในการทำลายเซลล์โดยการเจาะเยื่อหุ้มเซลล์ในระหว่างการ exocytosis



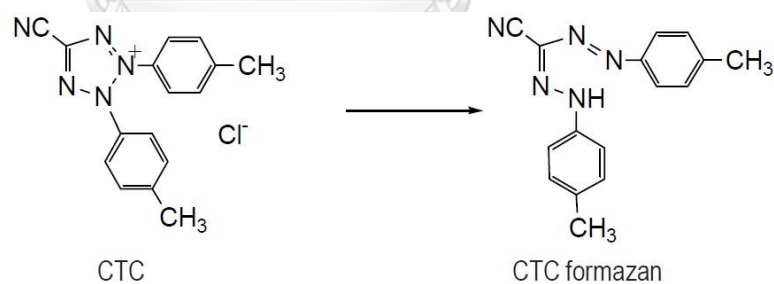
ภาพที่ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร MTT เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases

สาร XTT 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -2H-tetrazolium-5-carboxanilide และสาร MTS (3-[4,5,dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulphophenyl]-2H-tetrazolium, inner salt) เป็นสารที่ถูกดัดแปลงมาจากสาร MTT เพื่อทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ formazan ที่ละลายน้ำได้ เมื่ออยู่ในรูปออกซิไดซ์จะมีสีเหลือง เป็นสารที่มีประจุลบและไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ จึงต้องใช้ร่วมกับน้ำยา intermediate electron acceptor เช่น phenazine methyl sulfate (PMS) หรือ phenazine ethyl sulfate (PES) ที่จะซึมเข้าสู่เซลล์และถูกรีดิวซ์ใน cytoplasm จากนั้นจะออกมานอกเซลล์และรีดิวซ์สาร MTS เป็นสารสีม่วงของ formazan ที่ละลายน้ำได้ ดังภาพที่ 5 (50)



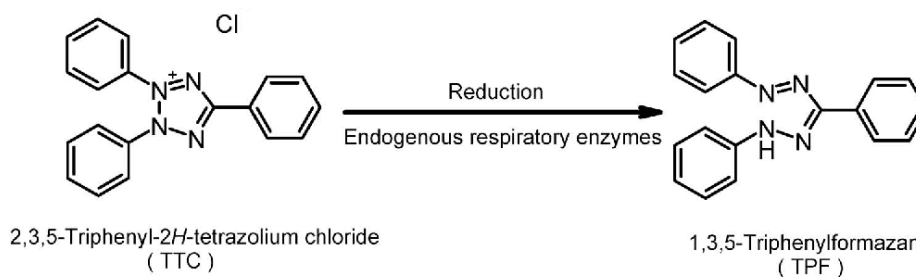
ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร MTS เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วย PES

สาร CTC (5-Cyano-2,3-ditolyl-2H-tetrazolium chloride) เป็นสารที่ละลายน้ำเมื่ออยู่ในรูปออกซิไดซ์จะไม่มีสีและเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้สารที่มีสีแดงของ CTC formazan (ภาพที่ 6) (51) ซึ่งเป็นตะกอนที่ไม่ละลายน้ำและจะสะสมอยู่ภายในเซลล์



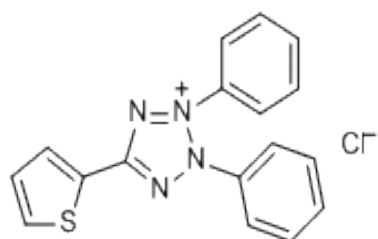
ภาพที่ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร CTC เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases

สาร TTC (2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenase จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะได้อสาร 1,3,5-triphenylformazan (TTF) ที่มีสีชมพูแดง ซึ่งเป็นสารที่คงตัวไม่ละลายน้ำ ดังภาพที่ 7 (52)

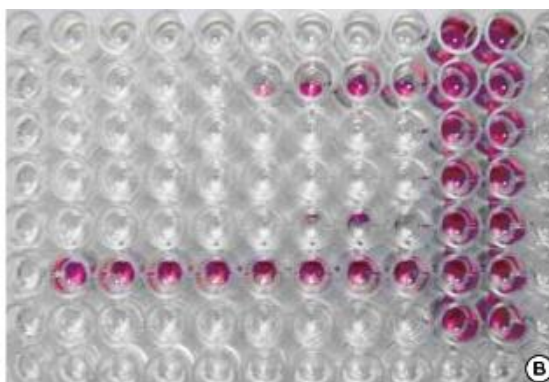


ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร TTC เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenases

ถึงแม้ในปัจจุบันจะมีการประยุกต์ใช้สารกลุ่ม Tetrazolium-based redox indicator ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture biochemical assays) การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) การพิสูจน์จำแนกชนิดเชื้อ (conventional bacterial identification) และการทดสอบความไวต่อยา (drug sensitivity) แต่ยังมีข้อจำกัดคือ สาร tetrazolium salts เป็นสารที่ไม่คงตัวและมีความไวต่อแสง ความชื้น และอุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียสเมื่ออยู่ในรูปของสารละลาย นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง *M. tuberculosis* จึงนิยมเติมสารเหล่านี้หลังจากการบ่มเพาะเชื้อแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนสีของ redox indicator ที่ชัดเจน ต่อมามีการพัฒนาสารให้มีความคงตัวมากขึ้นโดยบริษัท Kyokuto Pharmaceutical Industrial จำกัด ประเทศญี่ปุ่น คือสาร STC (2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride) (ภาพที่ 8) (53) เป็นสารสีขาวเมื่อถูกรีดิวซ์จะได้สาร trityl red formazan ที่มีสีชมพูแดง ซึ่งพบว่าไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียและยังมีความคงตัวสูง จึงสามารถเติมสารนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปบ่มเพาะเชื้อได้ ทำให้ลดขั้นตอนและลดโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อ (54) มีงานวิจัยที่ใช้สาร STC ในการตรวจหาการเจริญของเชื้อและใช้ในการทดสอบความไวต่อยา เช่น การศึกษาของ Lee และคณะ ทำทดสอบความไวต่อยา Rifampicin ของเชื้อ MTB ด้วยเทคนิค broth medium-based method พบว่ามีความไวของชุดทดสอบเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 (55) นอกจากนี้การศึกษาของ Lee และคณะ ได้พัฒนาเทคนิคการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *M. fortuitum* โดยใช้เทคนิค broth microdilution method และใช้สาร STC ในการตรวจหาการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้อ่านผลทดสอบได้ง่ายจากการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator ดังแสดงในภาพที่ 9 (56)



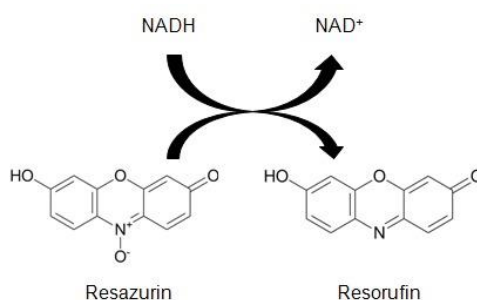
ภาพที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสาร STC



ภาพที่ 9 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. fortuitum* ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่ใช้ STC ในการตรวจวัดการเจริญ

10.2 Resazurin

สาร resazurin เป็นสารสีน้ำเงิน สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้และเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วย mitochondrial reductase จะได้สาร resorufin ที่มีสีชมพู (ภาพที่ 10) (50) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น fluorescent ได้ด้วย มีชื่อทางการค้าว่า AlamaBlue® ซึ่งมีหลักการเหมือนกับ MTT คือวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการดู reduction environment ของเซลล์ แต่สารนี้จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ จากการรวบรวมผลงานวิจัยทั่วโลกที่ใช้สารนี้ในการทดสอบความไวต่อยาด้วยเทคนิค resazurin microtiter assay (REMA) พบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Isoniazid เท่ากับ 96% มีความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อยา Rifampicin เท่ากับ 97% และ 99% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม resorufin เป็นสารที่ไม่คงตัวและมีความไวต่อแสง จึงนิยมเติมสารนี้หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์แล้วจึงอ่านผลการทดสอบ (57)



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสี Resazurin เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenase

ตารางที่ 6 แสดงงานวิจัยที่ใช้เทคนิค colorimetric redox indicator assay ในการทดสอบความไวต่อยาแบบพีโนไทป์

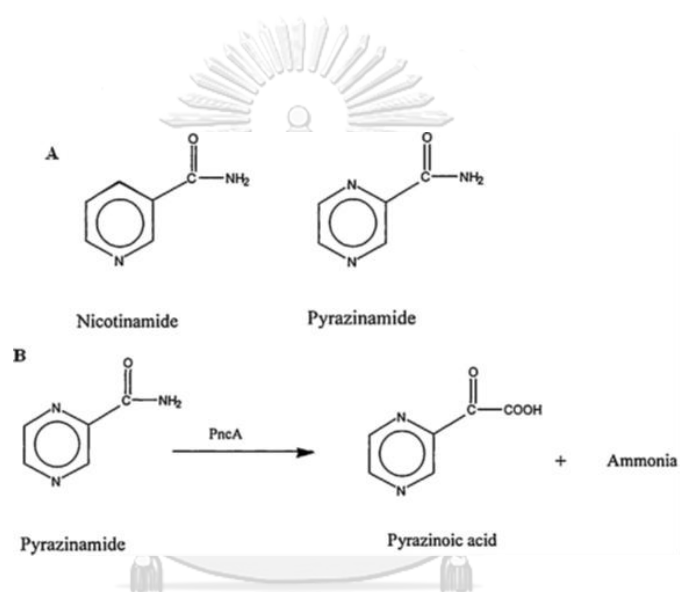
| วิธีการทดสอบ | redox indicator | ความเข้มข้น mg/ml | ความไว % | ความจำเพาะ % | เวลาในการทดสอบ | เอกสารอ้างอิง |
|--------------|-----------------|-------------------|------------|----------------|----------------|---------------|
| H/R | TTC | 0.625 | 100 | 92 | 4.9 วัน | (58) |
| Z | CTC | 2.49 | 97.1 | 81.3 | 4-6 วัน | (59) |
| H/R | STC | 0.55 | 100 | 100 | 3-6 วัน | (55) |
| SL | Resazurin | 6 | 96.8 - 100 | 100 | 8 วัน | (60) |
| H/R | MTT | 0.5 | 100 | 86 (H),100 (R) | 14 วัน | (61) |

*หมายเหตุ H หมายถึงยา Isoniazid, R หมายถึงยา Rifampicin, Z หมายถึงยา Pyrazinamide, SL หมายถึงยา กลุ่ม Second line

11. ยา Pyrazinamide (PZA, Z)

ยา Pyrazinamide เป็นยาที่มีโครงสร้างคล้าย Nicotinamide หรือวิตามิน B3 (Nicotinamide analogue) ดังแสดงในภาพที่ 11 (10) จัดเป็นยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ที่มีบทบาทสำคัญในการรักษาวัณโรคเนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ทำลายได้ทั้งเชื้อวัณโรคที่มีเมแทบอลิซึมตลอดเวลาและเชื้อวัณโรคที่ไม่ค่อยเจริญแบ่งตัว (semi dormant bacilli) ในเซลล์ macrophage ซึ่งไม่ตอบสนองกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น ๆ เรียกคุณสมบัติของยาที่สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรคทั้ง 2 กลุ่มว่า Sterilizing activity ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ยาร่วมกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น ๆ ในการกำจัดทำลายเชื้อวัณโรคให้หมดจากร่างกาย ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการรักษาผู้ป่วยลงจาก 9 ถึง 12 เดือนเหลือเพียง 6 เดือนและช่วยลดโอกาสกลับมาเป็นโรคซ้ำ นอกจากนี้ยังพบว่ามีประสิทธิภาพช่วยเสริมฤทธิ์ยา Rifampicin โดยสามารถใช้รักษาทั้งเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาและดื้อต่อยา ปัจจุบันมีการพิจารณาใช้ยา

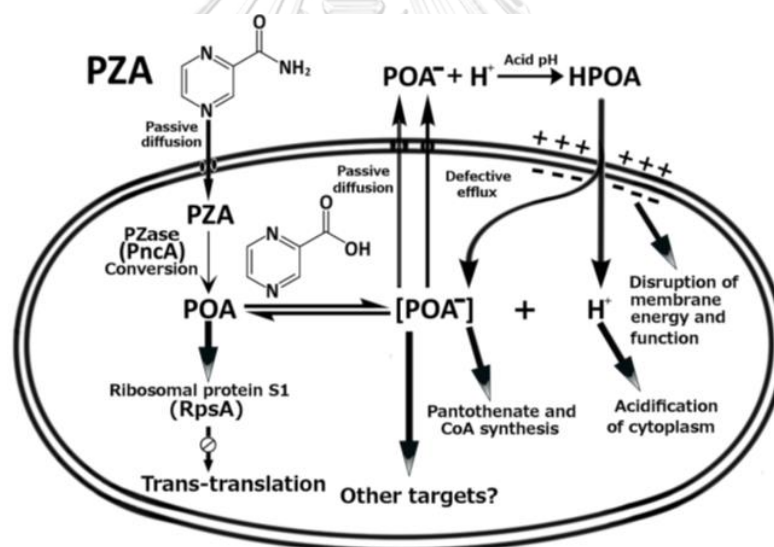
Pyrazinamide ร่วมในสูตรยารักษาวัณโรคใหม่ ๆ เช่น สูตรยาร่วมกับยา Bedaquiline (TMC207) สูตรยาร่วมกับยา Bicyclic nitroimidazole (PA-824) และ Moxifloxacin ซึ่งอยู่ในระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพของยาทางคลินิก phase 3 ยา Pyrazinamide เริ่มนำมาใช้รักษาวัณโรคตั้งแต่ปี พ.ศ. 2495 โดยถูกสังเคราะห์ขึ้นหลังจากมีการค้นพบว่าสาร Nicotinamide มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคได้ในสัตว์ทดลอง เริ่มแรกนั้นจัดอยู่ในกลุ่มยารักษาวัณโรคแนวที่ 2 เนื่องจากพบว่าการใช้ยาปริมาณ 3 กรัมต่อวัน เป็นสาเหตุให้เกิดตับอักเสบได้ ต่อมาได้มีการพิสูจน์ว่าการใช้ยา 1.5 ถึง 2 กรัมต่อวัน เป็นปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อตับ จึงนิยมใช้ยานี้ในขนาดที่ต่ำและระยะเวลาสั้น ๆ ในการรักษาวัณโรคเท่านั้น (10, 12)



ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของยา Pyrazinamide ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Nicotinamide (A) และยา Pyrazinamide เปลี่ยนแปลงอยู่ในรูปพร้อมทำงานเป็น Pyrazinoic acid โดยเอนไซม์ Pyrazinamidase ที่ควบคุมการสร้างโดยยีน *pncA* (B)

การศึกษาด้านเภสัชจลนศาสตร์พบว่าหลังรับประทานยา ยาจะถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารมากกว่า 90% เมื่อยาเข้ากระแสเลือดจะถูกทำลายไปทีละน้อยเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีและร่างกายจะใช้เวลาประมาณ 9 ถึง 10 ชั่วโมง ในการกำจัดยา 50% ออกจากกระแสเลือดโดยผ่านไปพร้อมกับปัสสาวะ สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของยาเริ่มจากยา Pyrazinamide ซึ่งเป็นสารที่ยังไม่มีฤทธิ์สามารถแพร่เข้าเซลล์ของแบคทีเรียโดยตรงและเปลี่ยนแปลงเป็นยาที่พร้อมออกฤทธิ์ คือ Pyrazinoic acid (POA) โดยเอนไซม์ Pyrazinamidase (Pzase) ที่สร้างขึ้นจากตัวเชื้อวัณโรค โดยถอดรหัสได้จากยีน *pncA* จากนั้น POA จะไปสะสมบริเวณผิวนอกของเซลล์โดยแพร่ผ่านแบบ passive

diffusion ในสภาวะกรด POA จะรวมกับโปรตอน (H^+) กลายเป็น protonated POA (HPOA) ซึ่งจะแพร่ผ่านและเข้ามาสะสมภายในเซลล์อีกครั้งผ่าน pH-dependent manner ซึ่ง POA^- นี้จะไปยับยั้งและทำลายเชื้อในหลายกลไก เช่น ทำให้ภายในเซลล์ของเชื้อมีสภาวะเป็นกรดและรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ไปยับยั้งกระบวนการสร้างและซ่อมแซมโปรตีนในแบคทีเรีย (Tran-translation) โดยเข้าไปจับกับโปรตีนชนิด Ribosomal protein S1 ยับยั้งการสร้าง Pantothenate และ Co-enzyme A ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเชื้อและกลไกการออกฤทธิ์อื่น ๆ ที่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ (10, 12) ดังแสดงในภาพที่ 12 (12) โดยการศึกษาแบบ in vitro พบว่ายา Pyrazinamide จะออกฤทธิ์ได้ดีในสภาวะกรด pH 5.5 และไม่ออกฤทธิ์ในสภาวะเป็นกลางหรือเบส ยามีฤทธิ์ฆ่าทำลายเชื้อได้ดีขึ้นในเชื้อที่มีเมแทบอลิซึมต่ำ เช่น เชื้อที่มีอายุแก่ มีตัวยับยั้งการสร้างพลังงาน (energy inhibitors) อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) หรืออยู่ในสภาวะอุณหภูมิต่ำประมาณ 15 ถึง 25 องศาเซลเซียส เป็นต้น (62)

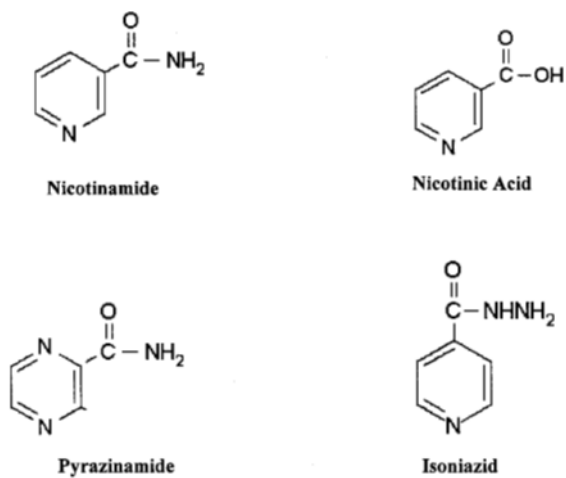


ภาพที่ 12 กลไกและเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา Pyrazinamide

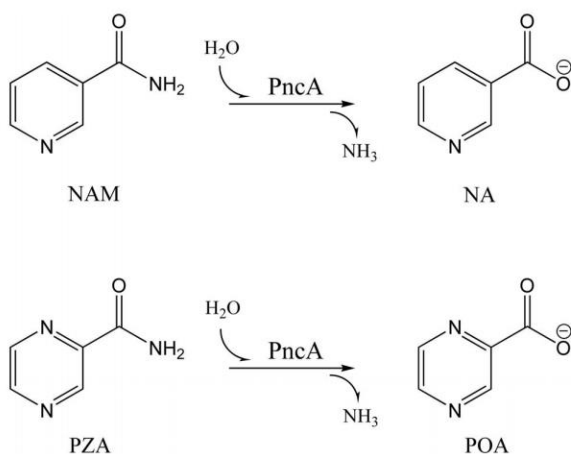
12. นิโคตินาไมด์ (Nicotinamide: NIC)

Niacin หรือ Vitamin B3 เป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ ถือเป็น co-enzyme ที่สำคัญในกระบวนการเผาผลาญสารอาหารเพื่อให้พลังงานแก่ร่างกาย และทำหน้าที่สังเคราะห์ไขมัน โดยเป็นชื่อสามัญของสารประกอบ 2 ชนิด ได้แก่ Nicotinamide และ Nicotinic acid ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2480 ในการรักษาโรคเพลลากร้า (PellagraX) ที่เกิดจากการขาด

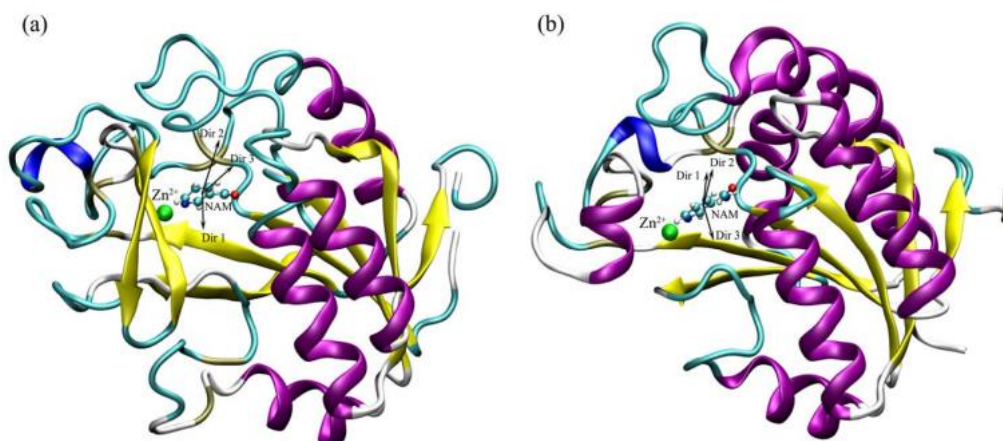
วิตามิน โดยสาร Nicotinamide เป็นสารที่จำเป็นในการสังเคราะห์ Nicotinamide nucleotides เช่น Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) และ Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) ที่จำเป็นในการดำรงชีวิตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus* และ *M. tuberculosis* ต่อมาในปี พ.ศ. 2488 มีการค้นพบว่า Nicotinamide มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อวัณโรคในสัตว์ทดลอง จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์และพัฒนาสารที่มีโครงสร้างคล้าย Nicotinamide และมีประสิทธิภาพที่ดีในการต้านเชื้อวัณโรค 2 ชนิด ได้แก่ ยา Isoniazid และยา Pyrazinamide ดังแสดงในภาพที่ 13 (63) ต่อมาพบว่ายา Isoniazid และยา Nicotinamide มีคุณสมบัติต้านฤทธิ์กันในการทำลายเชื้อวัณโรค จึงทำให้สารนี้ไม่ได้รับความนิยมในการนำมาใช้รักษาวัณโรค สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ Nicotinamide ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สารนี้จะต้องเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่พร้อมออกฤทธิ์ได้ คือ Nicotinic acid โดยเอนไซม์ Nicotinamidase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Pyrazinamidase ดังแสดงในภาพที่ 14 (64) ดังนั้นเชื้อที่ติดต่อ Pyrazinamide ก็จะต้องติดต่อ Nicotinamide เช่นเดียวกัน (63, 65) จากการศึกษาของ Zhang และคณะ ได้ใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics) ในการศึกษาเอนไซม์ Nicotinamidase และ Pyrazinamidase พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการยึดจับสาร Nicotinamide ในลักษณะเดียวกันโดย ligand ของสาร Nicotinamide จะจับกับเอนไซม์บริเวณ catalytic metal Zn^{2+} ด้วยอะตอม nitrogen ของ pyridine ring (ดังภาพที่ 15) (64) สาร Nicotinamide นี้่ออกฤทธิ์ทำลาย เชื้อที่ค่า pH ประมาณ 6.8 ถึง 8.0 การศึกษาในปัจจุบันจึงพยายามพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยใช้ Nicotinamide แทน ทำให้ไม่ต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีฤทธิ์เป็นกรด และสามารถลดการเกิดผลบวกกลางและลบลงได้ เช่น การศึกษาของ Martin และคณะ ทำการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี REMA โดยบ่มเชื้อวัณโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสม Nicotinamide ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 ถึง 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติม resazurin แล้วบ่มเชื้อต่อเป็นเวลาหนึ่งคืน อ่านผลจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทดสอบจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู (23)



ภาพที่ 13 ลักษณะโครงสร้างของ Nicotinamide, Nicotinic acid, ยา Pyrazinamide และยา Isoniazid



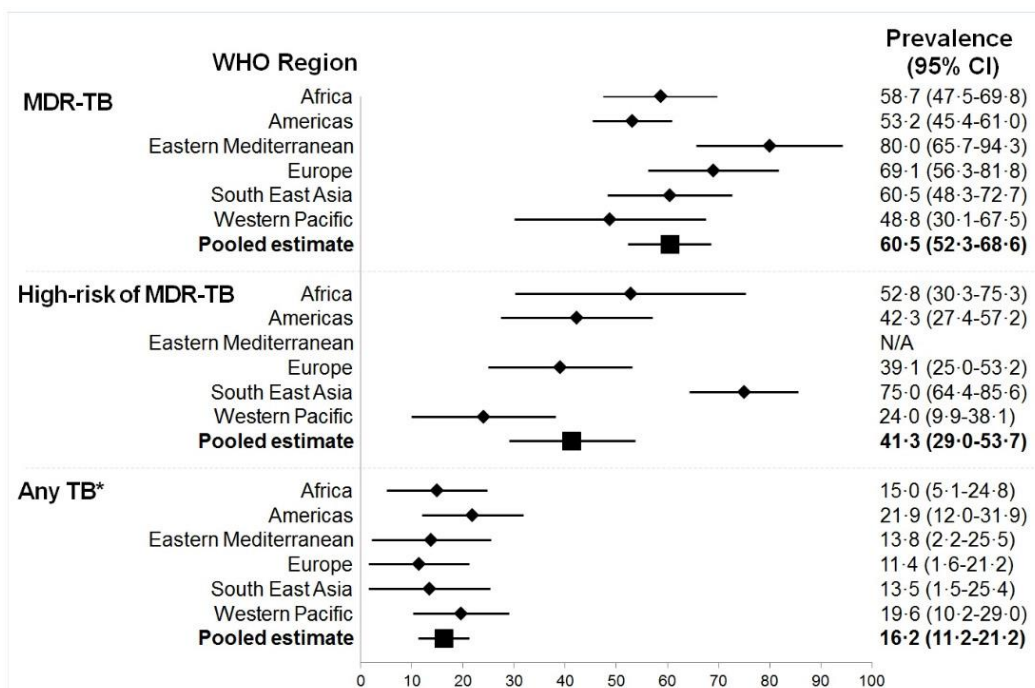
ภาพที่ 14 แสดงปฏิกิริยา Hydrolysis ของสาร Nicotinamide (NAM) และ Pyrazinamide (PZA) ด้วยเอนไซม์ Pyrazinamidase ได้ Nicotinic acid (NA) และ Pyrazinoic acid (POA)



ภาพที่ 15 แสดงภาพจำลองโมเลกุลของเอนไซม์ Pyrazinamidase (a) และ Nicotinamidase (b) ในการจับกับ Nicotinamide (NAM)

13. อุบัติการณ์การดื้อยา Pyrazinamide

รายงานการทบทวนวรรณกรรม (Systematic Review) ของ Chang และคณะ พบว่าความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide มีความสัมพันธ์กับเชื้อวัณโรคดื้อยา (DR-TB) โดยพบอัตราการดื้อยา Pyrazinamide ในเชื้อวัณโรคดื้อยาเฉลี่ยอยู่ที่ 51% (พบได้ในอัตรา 31% ถึง 89% ขึ้นอยู่กับแต่ละภูมิภาค) ในขณะที่เชื้อวัณโรคไวต่อยา (DS-TB) สามารถพบการดื้อยา Pyrazinamide ได้น้อยกว่า 5% (พบได้ตั้งแต่ 0% ถึง 9% ของเชื้อที่ไวต่อยา) (13) ในขณะที่มีการคาดการณ์อุบัติการณ์ของการดื้อยา Pyrazinamide อยู่ที่ประมาณ 16.2% ในผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมด และพบได้ 41.3% ในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงต่อการดื้อยาและพบได้ 60.5% ในผู้ป่วย MDR-TB ซึ่งมีอุบัติการณ์แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค ดังแสดงในภาพที่ 16 (16)



ภาพที่ 16 แสดงอุบัติการณ์การดื้อยา Pyrazinamide ในเชื้อ *M. tuberculosis* จากภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก

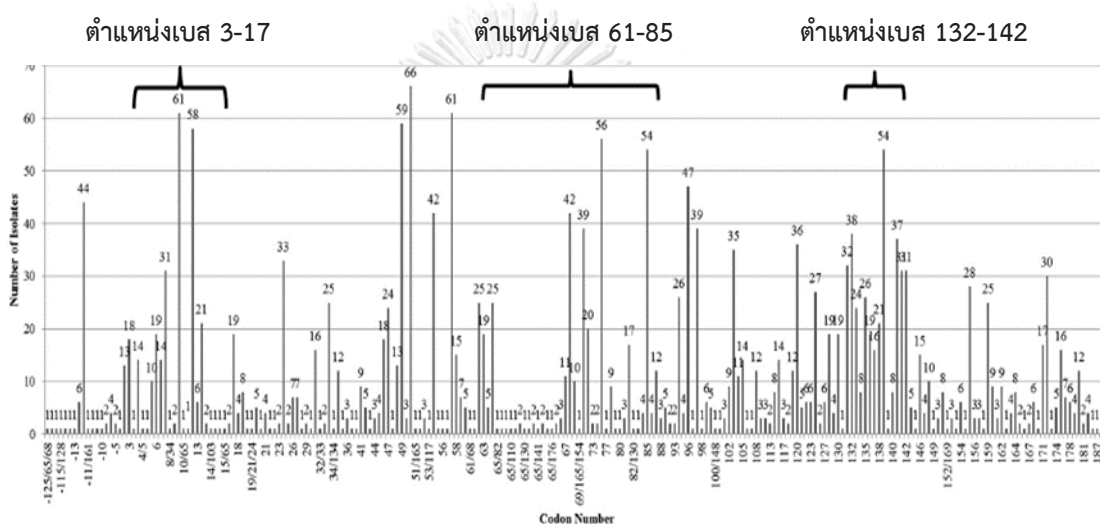
14. กลไกการดื้อยา Pyrazinamide

ยา Pyrazinamide ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex (MTB complex) ยกเว้นเชื้อ *M. bovis* ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยานี้โดยธรรมชาติเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ยีน *pncA* ตำแหน่ง H57A อัตราการดื้อต่อยา Pyrazinamide โดยธรรมชาตินั้นพบได้ง่ายโดยเมื่อเชื้อวัณโรคแบ่งตัวระดับ 10^4 ตัวจะพบการเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยา Pyrazinamide 1 ตัว กลไกที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาที่พบมี 3 แบบ (12) ได้แก่

14.1 การกลายพันธุ์ที่ยีน *pncA*

ยีน *pncA* มีขนาด 561 คู่เบส เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Pyrazinamidase (PZase) เมื่อมีการกลายพันธุ์จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเปลี่ยนยาให้อยู่ในรูปที่สามารถออกฤทธิ์ได้ เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ส่วนใหญ่ 70% ถึง 97% จะพบการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ โดยรูปแบบการกลายพันธุ์พบได้หลากหลายตลอดทั้งยีน เช่น การแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวในบริเวณดีเอ็นเอที่ถอดรหัส (missense และ nonsense) การแทรกเข้าและขาดหายไปของดีเอ็นเอ (indels) สามารถพบตำแหน่งกลายพันธุ์ได้ทั้งบริเวณยีนควบคุม (regulator

region) และยีนโครงสร้าง (coding region) โดยส่วนใหญ่จะพบการกลายพันธุ์ 3 บริเวณ ได้แก่ ตำแหน่งโคดอนที่ 3 ถึง 17 โคดอนที่ 61 ถึง 85 และโคดอนที่ 132 ถึง 142 (9, 12) ดังแสดงในภาพที่ 17 (9) ซึ่งเป็นบริเวณของ catalytic site และ metal-binding site ของเอนไซม์ Pyrazinamidase โดยในปัจจุบันพบรูปแบบการกลายพันธุ์กว่า 600 รูปแบบ ในตำแหน่งโคดอนประมาณ 171 ตำแหน่งตลอดทั้งยีน โดยมีอุบัติการณ์การกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ 70% ถึง 99% ในเชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide และประมาณ 9% ถึง 22.2% ในเชื้อไวต่อยา Pyrazinamide (16)



ภาพที่ 17 แผนภูมิแสดงตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide สามารถพบได้ตลอดทั้งยีน *pncA* โดยส่วนใหญ่พบในตำแหน่งโคดอนที่ 3-17, 61-85 และ 132-142

14.2 กลายพันธุ์ที่ยีน *rpsA*

ยีน *rpsA* มีขนาด 1446 คู่เบส ถอดรหัสได้เป็น Ribosomal protein S1 ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมายหนึ่งของการออกฤทธิ์ของยา เมื่อมีการกลายพันธุ์ทำให้ POA ไม่สามารถเข้าจับและออกฤทธิ์ได้ จากการศึกษาของ Shi และคณะ พบว่าเชื้อ MTB สายพันธุ์ DHM444 ที่มีการดื้อยา Pyrazinamide ในระดับต่ำมีการขาดหายไปของยีน *rpsA* ที่ตำแหน่ง $\Delta A438$ ซึ่งเกี่ยวข้องกับบริเวณ C-terminus ของ Ribosomal protein S1 (66) นอกจากนี้ Tan และคณะ ได้ทำการศึกษาและยืนยันว่าเชื้อวัณโรคดื้อต่อยา Pyrazinamide ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *pncA* จะพบการกลายพันธุ์ที่ยีน *rpsA* โดยมีตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ E433, A438 และ R474 (67) โดยพบอัตราการกลายพันธุ์ในระดับต่ำเพียง 0.1% ของเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา

Pyrazinamide ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* เท่านั้น อย่างไรก็ตามมีบางการศึกษาพบว่ามิตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *rpsA* ที่ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide เช่น M432T และ A364G (10) เป็นต้น จึงควรมีการศึกษาหาความเกี่ยวข้องระหว่างการกลายพันธุ์ในยีน *rpsA* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide

14.3 การกลายพันธุ์ที่ยีน *panD*

ยีน *panD* มีขนาด 420 คู่เบส ถอดรหัสได้เป็น เป็นเอนไซม์ Aspartate alpha-decarboxylase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง β -alanine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Pantothenate และ Co-enzyme A เมื่อยีนนี้มีการกลายพันธุ์ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่สามารถสร้าง Pantothenate และ Co-enzyme A ที่เป็นเป้าหมายของยา แม้ว่าเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ส่วนใหญ่จะมีการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* และ *rpsA* แต่การศึกษาล่าสุดของ Zhang และคณะ (68) พบว่าเชื้อบางสายพันธุ์ที่ดื้อยา Pyrazinamide และไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* หรือ *rpsA* แต่พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *panD* โดยพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีน *panD* เช่น A128S, V138A, H21R, I49V และ E130G ยีน *panD* นี้จึงน่าจะเป็นยีนเป้าหมายใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา Pyrazinamide มีอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ประมาณ 2.87% ในเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* (68, 69) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาและรายงานข้อมูลการดื้อยาที่เกี่ยวข้องกับยีน *panD* ปริมาณน้อย

15. การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรค

การวินิจฉัยเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ในเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานมีความสำคัญและส่งผลต่อการรักษาได้ โดยพบว่าหากเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ยังไวต่อยา Pyrazinamide (Z^S -MDR-TB) สามารถใช้สูตรยาในการรักษาเพียง 9 เดือน จากสูตรเดิมที่ใช้เวลาในการรักษาถึง 2 ปี แต่หากเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (Z^R -MDR-TB) มักให้ผลการรักษาไม่ดีขึ้น การรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนานจึงควรแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือ Z^R -MDR-TB และ Z^S -MDR-TB เพื่อที่จะสามารถพิจารณาเลือกใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยให้เหมาะสม ในปัจจุบันการรายงานการดื้อต่อยา Pyrazinamide ทั่วโลกมีไม่มากนัก เนื่องจากวิธีการทดสอบความไวต่อยาขาดประสิทธิภาพ

และไม่นิยมทำในห้องปฏิบัติการ การทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันหรือทดสอบซ้ำ ๆ อาจให้ผลที่ไม่เหมือนกัน ผลการทดสอบจึงมีความน่าเชื่อถือต่ำ (11) อย่างไรก็ตามสามารถทำการทดสอบเพื่อวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ได้ดังนี้

15.1 การทดสอบความไวต่อยาแบบพีโนไทป์

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide แบบพีโนไทป์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

- 15.1.1 วิธี Proportion method เป็นการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารที่มียาและไม่มียา สามารถทำการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LJ medium หรือ Middlebrook 7H10/7H11 ที่ผสมยา Pyrazinamide ความเข้มข้น 100 µg/mL และต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะเป็นกรด pH 5.5 เพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการออกฤทธิ์ของยา ที่สภาวะนี้เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้เกิดผลลบสูงถึงร้อยละ 20 ถึง 25 (4)
- 15.1.2 วิธี Radiometric susceptibility ทำการทดสอบโดยเครื่องเพาะเชื้อกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460TB ซึ่งใช้สารกัมมันตภาพรังสีคาร์บอน 14 ในการตรวจหาการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาเข้มข้น 100 µg/mL ที่ pH 6.0 ในสภาวะนี้จะไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค ทำให้ได้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือ แต่มีข้อจำกัดคือ ความยุ่งยากในการทำลายสารกัมมันตรังสีหลังการทดสอบ (4)
- 15.1.3 วิธี BACTEC MGIT 960 System เป็นวิธีการทดสอบความไวต่อยาที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ทดแทนการทดสอบความไวต่อยาแบบ Radiometric susceptibility โดยใช้หลักการตรวจวัดการเปล่งแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเมื่อเชื้อเจริญเติบโตและมีการใช้ออกซิเจน ซึ่งให้ผลการทดสอบที่น่าเชื่อถือเช่นเดียวกัน ทางสถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI) จึงแนะนำให้เป็นอย่างยิ่งในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ข้อเสียของวิธีเหล่านี้คือต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง และยังมีรายงานการเกิดผลบวกสูง จากการเติมเชื้อปริมาณมากใน

การทดสอบ ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต่างมากขึ้น ซึ่งสภาวะนี้ยาจะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (14, 15)

15.1.4 การทดสอบ Wayne test เป็นการทดสอบดั้งเดิมที่คิดค้นโดย Wayne และคณะ ที่อาศัยหลักการตรวจดูการทำงานของเอนไซม์ Pyrazinamidase ในการวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ทำโดยเชื้อปริมาณมากลงในหลอดแก้ว ซึ่งภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Dubos broth ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่ผสมยา Pyrazinamide ความเข้มข้น 100 µg/mL และ Sodium pyruvate ความเข้มข้น 2 mg/mL บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ถึง 7 วัน จากนั้นเติม ferrous ammonium sulphate ความเข้มข้น 1% แล้วนำไปแช่เย็นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลบวกคือสังเกตเห็นวงแหวนสีชมพู ซึ่งคือ ferrous salt ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยน Pyrazinamide เป็น Pyrazinoic acid แสดงถึงมีการทำงานของเอนไซม์ Pyrazinamidase วิธีนี้มีความไวประมาณ 91% และความจำเพาะ 97% เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดคือ อ่านผลการทดสอบยาก และเกิดผลบวกสูง อันเนื่องมาจากการใช้เชื้อปริมาณน้อยเกินไปในการทดสอบ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีไม่ชัดเจน อีกทั้งสามารถตรวจหาการดื้อยาเฉพาะกลไกที่มาจากขาดเอนไซม์ Pyrazinamidase เท่านั้น (13)

15.1.5 วิธี Colorimetric redox indicator assay เป็นชุดทดสอบที่ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ พัฒนาขึ้นให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าและลดข้อจำกัดของวิธีมาตรฐาน สามารถทำได้ง่ายและราคาถูก โดยวิธีที่มีการนำมาปรับใช้กับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide เช่น วิธี Resazurin microtiter assay (REMA) เป็นวิธีทดสอบความไวต่อยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่บรรจุในภาชนะขนาด 96 หลุม หลังจากบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาประมาณ 7 วันแล้ว ตรวจหาการมีชีวิตของเชื้อโดยการเติมสี AlamarBlue® (บริษัท FisherScientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) วิธี CTC colorimetric assay โดยใช้สาร CTC เป็นสารที่ไม่มีสีเมื่ออยู่ในรูปออกซิไดซ์และเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ hydrogenase จากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 97.1% และ 81.3% ตามลำดับ (59) อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความไวต่อยา 2 วิธีข้างต้นมีข้อจำกัด คือ ใช้สาร redox

indicator ที่ไม่คงตัว ทำให้ต้องเติมสารเหล่านั้นหลังจากขั้นตอนการบ่มเชื้อไปแล้ว 7 ถึง 10 วัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของเชื้อวัณโรคจากการเปิดหรือปิดฝานอกจากการเลือกสาร redox indicator ที่แตกต่างกันแล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบก็มีหลายชนิด ที่นิยมใช้ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook 7H9 ที่ปรับค่า pH ให้อยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 5.9 เพื่อให้มีสภาวะที่เหมาะสมกับการออกฤทธิ์ของยา Pyrazinamide แต่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อบางสายพันธุ์ได้ อีกทั้งมีราคาแพง ต่อมาในปี พ.ศ. 2557 Gonzalo และคณะ (49) พัฒนาวิธีทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยใช้อาหารชนิด biphasic medium โดยให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 เท่ากับ 95% อย่างไรก็ตามวิธีข้างต้นต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาพเป็นกรด Martin และคณะ (23) จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบความไวต่อยาโดยใช้ Nicotinamide ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายยา Pyrazinamide ทดแทน สาร Nicotinamide นี้สามารถถูกเปลี่ยนเป็น Nicotinic acid ด้วยเอนไซม์ Pyrazinamidase เช่นเดียวกันในสภาวะ physiological pH ที่มีค่าอยู่ในช่วง pH 6.8 ถึง 8.0 จึงไม่จำเป็นต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะกรด ซึ่ง Nicotinamide นี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในหลายวิธี เช่น การศึกษาของ Martin และคณะ (23) ทำการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี REMA โดยใช้ MIC cut-off ของ Nicotinamide มากกว่า 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา Pyrazinamide โดยบ่มเชื้อวัณโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ผสม Nicotinamide ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 ถึง 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติม resazurin แล้วบ่มเชื้อต่อเป็นเวลาหนึ่งคืน อ่านผลจากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทดสอบจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู โดยพบมีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 98% ตามลำดับเมื่อเทียบกับวิธี BACTEC 460 TB การศึกษาของ Hu และคณะ (70) ได้ทำการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี REMA เช่นเดียวกัน โดยใช้ MIC cut-off ของ Nicotinamide มากกว่า 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา Pyrazinamide พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100% และ 95.2% ตามลำดับเมื่อเทียบกับวิธี BACTEC MGIT 960 เป็นต้น

15.2 การทดสอบความไวต่อยาแบบจีโนไทป์

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide แบบจีโนไทป์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

15.2.1 เทคนิค DNA sequencing โดยการตรวจหาตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide ซึ่งมีความไวประมาณ 83% ถึง 90% และความจำเพาะ 97% ถึง 100% เมื่อเทียบกับวิธีอ้างอิง BACTEC MGIT 960 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากลดข้อจำกัดของการตรวจแบบฟีโนไทป์ที่เกิดผลลบลวงสูง จากสภาวะกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการออกฤทธิ์ของยา แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อบางสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วภายใน 1 ถึง 2 วัน อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยา 3% ถึง 30% ไม่มีการกลายพันธุ์ในยีนนี้ (13)

15.2.2 เทคนิค Line probe assay ชุดทดสอบ Genoscholar PZA-TB II assay (บริษัท NIPRO Corporation จำกัด ประเทศไทย) ทำการทดสอบโดยเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน *pncA* และส่วน promotor region ตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยหลักการ reverse hybridization ที่มีการตรึงดีเอ็นเอติดตามไว้บนแถบ nitrocellulose membrane ทั้งหมด 48 probe หากภายในสิ่งส่งตรวจมีดีเอ็นเอเป้าหมายก็จะสามารถจับจำเพาะกับดีเอ็นเอติดตามและปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีเกิดขึ้น แต่ถ้าไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอติดตามได้ทั้งหมดจะถือว่าเป็นเชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide ซึ่งมีความไวเท่ากับ 93.2% และมีความจำเพาะเท่ากับ 91.2% ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อวัณโรคดื้อยา Pyrazinamide (41)

โดยวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิคต่าง ๆ มีข้อดีและข้อจำกัดดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide

| วิธีการทดสอบความไวต่อยา | ข้อดี | ข้อจำกัด |
|--|---|---|
| Phenotypic DST | -ราคาถูก -สังเกตเห็นโคโลนีชัดเจน | -ให้ผลการทดสอบช้า -เกิดผลลบวงสูง |
| BACTEC MGIT PZA kit | -ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว | -ราคาแพง -เกิดผลบวกวงสูง |
| BACTEC 460 TB | -ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว -ความไวของการทดสอบสูง | -ราคาแพง -มีสารกัมมันตรังสี |
| Wayne test | -ราคาถูก -การทดสอบทำได้ง่าย | -เกิดผลบวกวงสูง -สามารถตรวจหาการตี้อยาเฉพาะกลไกที่มาจากขาดเอนไซม์ PZase |
| Colorimetric redox indicator assay | -อ่านผลการทดสอบได้ง่ายจากการเปลี่ยนสี (redox indicator) -ราคาถูก | -ผู้ทำการทดสอบต้องฝึกปฏิบัติเป็นอย่างดี |
| DNA sequencing | -ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว -ความไวของการทดสอบสูง | -ต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาแพง ไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก |
| Line probe assay (Genoscholar PZA-TB II assay) | -ให้ผลการทดสอบรวดเร็ว | -ตรวจการตี้อยาเฉพาะกลไกที่เกี่ยวข้องกับยีน <i>pncA</i> -การอ่านผลยาก เนื่องจาก strip มีขนาดเล็ก แต่มี probe จำนวนมาก |

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย เอนไซม์ *Taq* polymerase สั่งซื้อจากบริษัท New England BioLabs จำกัด และบริษัท Promega จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัท Nippon จำกัด ประเทศเยอรมนี Primer สั่งซื้อจากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ประกอบด้วย Tris base, Boric acid และ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Sodium Hydroxide (NaOH) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Hydrochloric acid (HCl) สั่งซื้อจากบริษัท Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส สั่งซื้อจากบริษัท GeneDirecx จำกัด และบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา 6X Loading buffer สั่งซื้อจากบริษัท GeneDirecx จำกัด และบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและน้ำยาสำหรับการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ประกอบด้วยชุดน้ำยา BigDye® terminator version 3.1 cycle sequence reaction kit ของบริษัท Applied Biosystems จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รับความอนุเคราะห์จาก Research Center for Zoonosis Control มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการพิสูจน์จำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ประกอบด้วย BBL™ Taxo™ TB Niacin Test สั่งซื้อจากบริษัท Becton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Sodium nitrate (NaNO₃) สั่งซื้อจากบริษัท Fluka จำกัด ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Sodium phosphate dibasic dodecahydrate (NaHPO₄ 12H₂O) สั่งซื้อจากบริษัท

Merck จำกัด ประเทศเยอรมนี sulfanilamide สั่งซื้อจากบริษัท The British Drug House จำกัด ประเทศอังกฤษ N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride สั่งซื้อจากบริษัท Fluka จำกัด ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้แก่ BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit สั่งซื้อจากบริษัท Becton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ประกอบด้วย Nicotinamide สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) สั่งซื้อจากบริษัท Tokyo Chemical Industry จำกัด ประเทศญี่ปุ่น Asparagine, Malachite green, Magnesium Citrate สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) และ กลีเซอรอล สั่งซื้อจากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา Magnesium Sulfate สั่งซื้อจากบริษัท Fluka จำกัด ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ Middlebrook 7H9 broth base และ OADC enrichment สั่งซื้อจากบริษัท Becton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27294 ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของ ลำดับเบสและไวต่อยา Pyrazinamide ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันโรคทรวอก จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

เชื้อ *M. bovis* BCG สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 37534 ที่ไวต่อยา Pyrazinamide สั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่ายบริษัท Biomedica จำกัด ประเทศไทย

2. เครื่องมือ

ตู้ชีวนิรภัย (biological safety cabinet: BSC) จากบริษัท Esco Technologies จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องชั่งสารเคมี (Analytical Balance) จากบริษัท OHAUS จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องวัดกรดต่าง (pH meter) จากบริษัท Mettler-Toledo จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Dry Bath Incubator) จากบริษัท Major Science จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) จากบริษัท Scientific Industries จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Refrigerated Centrifuge) และเครื่องปั่น

เหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) จากบริษัท Beckman Coulter จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator) จากบริษัท Memmert จำกัด ประเทศเยอรมนี เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่อง Electrophoresis (i-MyRun) จากบริษัท Cosmo Bio จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องจ่ายกำลังไฟฟ้า (Power Supply) เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS) เครื่อง Thermo cycler จากบริษัท Bio-Rad Laboratories จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI 3130 genetic analyzer จากบริษัท Applied Biosystems จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา เครื่องอัตโนมัติ BD BACTEC™ MGIT™ automated mycobacterial detection system บริษัท Becton Dickinson จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. การออกแบบงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้ ได้แบ่งการทดสอบออกเป็นทั้งหมด 4 ส่วน ได้แก่

3.1 การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit

เพื่อให้ทราบผลความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* และเพื่อใช้เป็นวิธีอ้างอิงด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA Kit

3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค DNA Sequencing

เพื่อศึกษาหาตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ที่ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide โดยทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของทั้ง 3 ยีนข้างต้นด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ลำดับเบสของแต่ละยีนด้วยเทคนิค DNA Sequencing

3.3 การพัฒนาวิธี Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay (NIC-CBMA) ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide

เพื่อพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide แบบวิธีพีโนโทปโดยใช้ Nicotinamide ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลาง และอาศัยเทคนิคการอ่านผลด้วยตาเปล่าจากการเปลี่ยนสีของ redox indicator โดยการใช้สี STC ซึ่งมีคุณสมบัติในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการวัด metabolic activity กลุ่มเซลล์ที่มี metabolic activity มากแสดงถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตขึ้นด้วย โดยตรวจวินิจฉัยการต่อยา Pyrazinamide กับเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกจากผู้ป่วยและเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 เป็นตัวควบคุมลบ และ *M. bovis* BCG ATCC 37534 เป็นตัวควบคุมบวก

3.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธี NIC-CBMA ในการตรวจวินิจฉัยการต่อยา Pyrazinamide จากเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกจากผู้ป่วย

เพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเทคนิค NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้น โดยนำผลการทดสอบที่ได้มาคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive Predictive Value: PPV) และ ค่าทำนายผลลบ (Negative Predictive Value: NPV) โดยทำการเปรียบเทียบกับผลของเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง และเทคนิค DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางอณูชีววิทยา

4. วิธีการทดลอง

4.1 การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

กำหนดระดับความเชื่อมั่นของการวิจัยและคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ โดยการคำนวณจากสูตรของ N.M. Buderer (71) ร่วมกับอาศัยข้อมูลงานวิจัยที่มีลักษณะใกล้เคียงกันก่อนหน้า

$$n = \frac{Z^2 \times Se(1-Se)}{d^2 \times Prev}$$

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.9375(1-0.9375)}{(0.05)^2 \times 0.6}$$

เมื่อ n แทน ขนาดตัวอย่าง

Z แทน ระดับความเชื่อมั่นที่ผู้วิจัยกำหนดไว้มีค่าเท่ากับ 1.96 ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (ระดับ 0.05)

Se แทน ความไวของการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยใช้ Nicotinamide ด้วยวิธี colorimetric assay มีค่าเท่ากับ 93.75% (24)

Prev แทน ความชุกอัตราการดื้อยา Pyrazinamide ในวัณโรคคือยาหลายขนาน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 60% (16)

d แทน ค่าความผิดพลาดสูงสุดที่ยอมรับได้เท่ากับ 0.05

จากการใช้สูตรคำนวณได้ตัวอย่างของเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน เท่ากับ 150 ตัวอย่าง นำขนาดของตัวอย่างที่คำนวณได้มาพิจารณาพร้อมกับการอ้างอิงขนาดตัวอย่างของการศึกษาที่มีลักษณะใกล้เคียงก่อนหน้า จึงเป็นที่มาของกลุ่มตัวอย่างเชื้อวัณโรคคือยาหลายขนาน ทั้งหมด 150 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้

4.2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ใช้เชื้อวัณโรคที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอกที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ด้วยวิธี Absolute concentration ในยา Isoniazid ความเข้มข้น 0.2 และ 1 µg/mL ยา Rifampicin ความเข้มข้น 40 µg/mL ยา Ethambutol ความเข้มข้น 2 µg/mL ยา Streptomycin ความเข้มข้น 4 µg/mL ยา Kanamycin ความเข้มข้น 30 µg/mL ยา Ofloxacin ความเข้มข้น 2 µg/mL ยา Levofloxacin ความเข้มข้น 2 µg/mL และยา Moxifloxacin ความเข้มข้น 0.75 µg/mL ตั้งแต่ปี 2558 ถึง 2561 จำนวนทั้งสิ้น 150 สายพันธุ์ ซึ่งผ่านการวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ด้วยชุดตรวจแอนติเจน MPT64 (SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid test, บริษัท Standard Diagnostics จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้) เก็บรักษาเชื้อใน

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Middlebrook 7H9 ผสมกลีเซอรอล 50% แช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส

เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 27294 ซึ่งไม่มีการกลายพันธุ์ของลำดับเบสและไวต่อยา Pyrazinamide นำมาใช้เป็นตัวควบคุมลบและเชื้อ *M. bovis* BCG สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 37534 ที่ไวต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมบวก

การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน จากคณะกรรมการจริยธรรมเพื่อการวิจัยสถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ 197/2561

4.3 การแยกชนิดของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยการทดสอบทางชีวเคมี

การแยกชนิดของเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex (MTBC) ตัวอื่น ๆ โดยทำการทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

- 4.3.1 Niacin test เชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* spp. สามารถผลิต Niacin ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยารีดอกซ์ของเซลล์ โดยเชื้อ *M. tuberculosis* สามารถผลิต Niacin ได้ปริมาณมาก ทำให้มีการสะสมอยู่รอบ ๆ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดสอบทำได้โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอายุ 3 ถึง 4 สัปดาห์อย่างน้อย 50 ถึง 100 โคลนิน วางหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในแนวนอน ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อชะเอา Niacin ออกมาจากโคลนิน ถ่ายส่วนน้ำปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 13×75 มิลลิเมตร จุ่ม Niacin strip ลงไปแล้วเขย่าเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ผลบวกจะมีการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย จากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ผลลบจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย
- 4.3.2 Nitrate reduction test จำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex โดยอาศัยความสามารถของเชื้อในการรีดิวซ์ Nitrate (NO₃) เป็น Nitrite (NO₂) การทดสอบทำได้โดยเชื้อที่เจริญบน

อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอายุ 3 ถึง 4 สัปดาห์ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่มี NaNO_3 substrate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำยา 1 (50% concentrated HCl) น้ำยา 2 (0.2% Sulfanilamide) และน้ำยา 3 (0.1% Naphthylenediamine Dihydrochloride) ตามลำดับ เขย่า แล้วสังเกตสีของสารละลาย ผลบวกจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู จนถึงสีแดงเข้ม ผลลบจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย แต่ต้องตรวจยืนยันโดยการเติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย หากเกิดสีชมพูหรือแดงแสดงว่ายังมี Nitrate หลงเหลืออยู่ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถรีดิวซ์ Nitrate เป็น Nitrite ได้ให้รายงานผลเป็น ผลลบ แต่ถ้าเติมผงสังกะสีแล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี แสดงว่า Nitrate ถูกรีดิวซ์เป็น Nitrite หหมดแล้วจึงรายงานผลเป็น ผลบวก

ตารางที่ 8 การจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis* ออกจากเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex (MTBC) โดยการทดสอบทางชีวเคมี

| สปีชีส์ | Niacin test | Nitrate reduction test |
|------------------------|-------------|------------------------|
| <i>M. tuberculosis</i> | บวก | บวก |
| <i>M. africanum</i> | บวก/ลบ | ลบ |
| <i>M. bovis</i> | ลบ | ลบ |
| <i>M. bovis</i> BCG | ลบ | ลบ |
| <i>M. microti</i> | บวก | ลบ |
| <i>M. caprae</i> | ลบ | ลบ |

4.4 การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วย BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit

ทำการทดสอบและแปลผลการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อ *M. tuberculosis* ตามคู่มือ BD Technical Laboratory Procedure BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีอายุ 3 ถึง 4 สัปดาห์ ใส่ในหลอดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปรับความขุ่นให้ได้มากกว่าความขุ่นมาตรฐาน 1.0 McFarland วางทิ้งไว้ 20 นาทีเพื่อให้

ตะกอนขนาดใหญ่ตกลงที่ก้นหลอด ย้ายสารละลายเชื้อส่วนบนไปยังหลอดเปล่าแล้ววางทิ้งไว้ อีก 15 นาที ย้ายสารละลายไปยังหลอดเปล่าอีกหลอด ปรับให้ได้ความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า (มีเชื้อโดยประมาณ 2.0×10^5 ถึง 4.0×10^6 CFU/mL) เพื่อเตรียมเป็นเชื้อสำหรับทดสอบความไวต่อยา (Antimicrobial susceptibility testing inoculum: AST inoculum) ก่อนทำการทดสอบเตรียมหลอด MGIT PZA จำนวน 2 หลอด ใช้เป็นหลอดควบคุม 1 หลอด และหลอดสำหรับทดสอบความไวต่อยา PZA 1 หลอด ในแต่ละหลอดประกอบด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Modified Middlebrook 7H9 broth pH 5.9 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ก่อนทำการทดสอบต้องเติม PZA Supplement ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร ลงทั้งสองหลอด จากนั้นเติมยา PZA ($8000 \mu\text{g/mL}$) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอด PZA จะทำให้ได้ความเข้มข้นของยาเท่ากับ $100 \mu\text{g/mL}$ ในหลอด PZA เติมเชื้อ AST inoculum ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมเติมเชื้อที่ได้จากการเจือจาง AST inoculum ในอัตราส่วน 1:10 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร นำไปใส่เครื่อง BACTEC MGIT 960 เครื่องจะทำการตรวจวัดการเปล่งแสงของสารฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตในทุก ๆ 60 นาที โดยเครื่องจะทำการแปลผลและรายงานผลเมื่อหลอดควบคุมมีค่า Growth unit มากกว่า 400 หากในหลอดที่มียา PZA มีค่า Growth unit มากกว่าหรือเท่ากับ 100 เครื่องจะรายงานเป็น Resistance ในขณะที่ถ้าวัด Growth unit ได้น้อยกว่า 100 จะรายงานว่า Susceptible

ในกรณีที่ผลการตรวจด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ให้ผลไม่สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธี DNA sequencing โดยเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา และมีค่า Growth unit ของหลอด MGIT PZA อยู่ระหว่าง 100 ถึง 399 ให้ทำการทดสอบซ้ำโดยการลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ที่ต้องเติมในหลอดทดสอบลงเหลือ 0.25 มิลลิลิตร อ้างอิงจากงานวิจัยของ Piersimoni และคณะ (72) ที่รายงานว่า การลดปริมาณ AST inoculum ลงสามารถป้องกันการเกิดผลบวกลวงจากวิธีการทดสอบความไวต่อยา PZA ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 (72, 73)

4.5 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis*

สกัดดีเอ็นเอจากโคลนนิ่งของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยวิธีการต้ม โดยเขี่ยโคลนเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งปริมาณ 1 loopful หรือใช้ตะกอนเชื้อจาก MGIT broth ที่มีเชื้อขึ้นปริมาณ 1 มิลลิเมตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยการต้มใน TE buffer (1M Tris-HCl, 0.5 M EDTA , pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปั่นที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใสในหลอดใหม่ แล้วเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึงข้ามคืน แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ทั้งไว้ประมาณ 3 นาที แล้วดูดเอทานอล 70% ออกให้หมด ตากให้แห้งในอากาศ ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.6 การออกแบบไพรเมอร์

ยีนที่ใช้เป็นเป้าหมายทั้งหมดในการศึกษานี้ ได้แก่ ยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* โดย primer ที่จำเพาะต่อยีน *pncA* อ้างอิงมาจากการวิจัยของ Bwalya และคณะ (74) primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpsA* อ้างอิงมาจากการวิจัยของ Maslov และคณะ (75) และ primer ที่จำเพาะต่อยีน *panD* อ้างอิงจากการวิจัยของ Zhang และคณะ (68) ตรวจสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ primer ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) รายละเอียดของ primer สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Bioneer Corporation จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 รายละเอียดของ primer ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

| ยีน | ลำดับเบส (5'→3') | กระบวนการ | ความยาวของ ผลผลิต (คู่เบส) | ที่มา |
|-------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------|
| <i>pncA</i> | Forward GCACCAAGGCCGCGATGACAC | amplification และ sequencing | 871 | (74) |
| | Reverse CGCGCGTCACCGGTGAACAACC | | | |
| <i>rpsA</i> | Forward CCGTCGAGTAGCCTCGTCAGGTA | amplification และ sequencing | 1,601 | (75) |
| | Reverse ACGTCGTGGACAGCAACGACTTC | | | |
| | Forward GGCACCATCCGAAAGGGTGT | sequencing | | |
| <i>panD</i> | Forward TCAACGGTTCGGTTCGGCTGCT | amplification และ sequencing | 650 | (68) |
| | Reverse TATCCGCC-ACTGCTGCACGACCTT | | | |

4.7 การเพิ่มปริมาณยีน *pncA*, *rpsA* และ *panD* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

4.7.1 การเพิ่มปริมาณยีน *pncA*

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *pncA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *pncA* ดังแสดงในตารางที่ 9 ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Forward primer และ Reverse primer ปริมาณอย่างละ 0.25 μ M dNTPs ปริมาณ 250 μ M GoTaq[®] buffer ความเข้มข้น 1 เท่า Magnesium chloride (MgCl₂) ปริมาณ 1 mM betaine ปริมาณ 0.5 M เอนไซม์ GoTaq[®] ความเข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water) เป็นหลอดควบคุมลบ ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 38 รอบ ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณดี

เอ็นเอ (Qubit Fluorometer) เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.7.2 การเพิ่มปริมาณยีน *rpsA*

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *rpsA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *rpsA* ดังแสดงในตารางที่ 9 ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Forward primer และ Reverse primer ปริมาณอย่างละ 0.5 μM dNTPs ความเข้มข้น 200 μM Standard *Taq* reaction buffer ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl_2 ความเข้มข้น 1.5 mM เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 4 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water) เป็นหลอดควบคุมลบ ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิต่ำและระยะเวลา ดังนี้ ใช้อุณหภูมิตั้งที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ที่อุณหภูมิต่ำ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิต่ำ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิต่ำ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิต่ำสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (NanoDrop™ spectrophotometers) เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.7.3 การเพิ่มปริมาณยีน *panD*

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *panD* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ในสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *panD* ดังแสดงในตารางที่ 9 ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Forward primer และ Reverse primer ปริมาณอย่างละ 0.5 μM dNTPs ความเข้มข้น 200 μM Standard *Taq* reaction buffer ความเข้มข้น 1 เท่า MgCl_2 ความเข้มข้น 1.5 mM เอนไซม์ *Taq*

DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณ 4 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water) เป็นหลอดควบคุมลบ ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่องวัดปริมาณ ดีเอ็นเอ (NanoDrop™ spectrophotometers) เก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.8 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วย Agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละยีน ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading buffer (Novel Juice, บริษัท GeneDirex จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปแยกขนาดด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5% ที่ละลายใน TBE (Tris-borate-EDTA) buffer นำดีเอ็นเอแยกขนาดภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ใน TBE buffer เป็นเวลา 30 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพเจล (Gel Doc™ XR ChemiDoc™ XRS) โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบสและบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

4.9 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วย DNA sequencing

4.9.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pncA*

โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากขั้นตอนที่ 4.7.1 พร้อมทั้ง Forward primer และ Reverse primer ของยีน *pncA* ดังแสดงในตารางที่ 9 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing ด้วยชุดทดสอบ BigDye® terminator version 3.1 cycle sequence reaction kit เริ่มจากการขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอก่อนการวิเคราะห์

ลำดับเบส (cycle sequencing) ในหนึ่งหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 5M betaine ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 5x sequencing buffer ปริมาตร 1.85 ไมโครลิตร Premix ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร Forward primer/Reverse primer 10 μ M ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ไมโครลิตรและน้ำกลั่น 5.4 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลา ดังนี้ ใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 35 รอบ ที่ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ไป ทำให้บริสุทธิ์ โดยการเติมน้ำบริสุทธิ์ (Milli-Q water) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร 3M Sodium acetate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 99.5% EtOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้งด้วยความระมัดระวัง เนื่องจากตะกอนดีเอ็นเอมีขนาดเล็กจะเกาะอยู่บริเวณข้างหลอด ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม 70% EtOH นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนทิ้งและตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที ละลาย sequencing product ที่ได้โดยการเติม formamide ปริมาตร 25 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำ sequencing product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI 3130 genetic analyzer (บริษัท Applied Biosystems จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของเชื้อ *M. tuberculosis* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *pnca*

4.9.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpsA* และยีน *panD*

โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากขั้นตอนที่ 4.7.2 และ 4.7.3 ซึ่งควรมีปริมาตรไม่น้อยกว่า 20 ไมโครลิตร และมีความ

เข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า 50 ng/ μ L พร้อมทั้ง Forward primer และ Reverse primer ของแต่ละยีนดังแสดงในตารางที่ 9 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้ นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rpsA* และยีน *panD*

4.10 การพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยชุดทดสอบ Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay (NIC-CBMA)

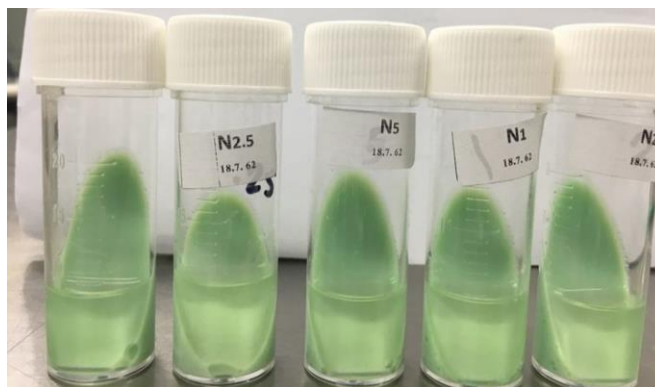
4.10.1 การเตรียมอาหาร NIC-CBMA

สูตรการเตรียมอาหาร NIC-CBMA แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Löwenstein–Jensen medium ประกอบด้วย L-Asparagine 5.4 กรัม Monopotassium Phosphate 3.6 กรัม Magnesium Citrate 0.9 กรัม Magnesium Sulfate 0.36 กรัม และกลีเซอรอล 18 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปนึ่งไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมสี Malachite Green ความเข้มข้น 2% ปริมาณ 30 มิลลิลิตร และไข่ไก่ที่ตีให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปริมาณ 1,500 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้สารละลายรวมประมาณ 2,450 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดแก้ว 4 ขวด ปริมาณขวดละ 500 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nicotinamide ความเข้มข้นตั้งต้น 1 g/mL ปริมาณ 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น Nicotinamide สุดท้าย เท่ากับ 250, 500, 1,000 และ 2,000 μ g/mL ตามลำดับ และสารละลาย LJ medium ที่เหลืออีกประมาณ 450 มิลลิลิตร ไม่ต้องเติมสาร Nicotinamide เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LJ medium ที่ผสม Nicotinamide ความเข้มข้นต่าง ๆ และที่ไม่ได้ผสม Nicotinamide ใส่ในขวดพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 25 มิลลิลิตร

ปริมาณขวดละ 7 มิลลิลิตร โดยวางขวดลาดเอียง (slant) นำไปนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 89 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเตรียมได้โดยละลาย Middlebrook 7H9 broth base ปริมาณ 5.22 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นเติมกลีเซอรอล 2.22 มิลลิลิตร นำไปนึ่งไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม OADC enrichment (Oleic-Albumin-Dextrose-Catalase) ปริมาณ 111.12 มิลลิลิตร ได้สารละลายรวมประมาณ 1,115 มิลลิลิตร แบ่งใส่ขวดแก้ว 4 ขวด ปริมาณขวดละ 200 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Nicotinamide ความเข้มข้นตั้งต้น 1 g/mL ปริมาณ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น Nicotinamide สุดท้าย เท่ากับ 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook 7H9 ที่เหลือประมาณ 300 มิลลิลิตร ไม่ต้องเติมสาร Nicotinamide เพื่อใช้เป็นหลอดควบคุม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะเติมสาร 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) ซึ่งเป็นสาร redox indicator โดยใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ จากนั้นแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาณ 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Löwenstein-Jensen medium โดยให้ความเข้มข้นของ Nicotinamide ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเท่ากัน จะได้เป็นชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่ประกอบด้วยอาหาร biphasic medium 5 หลอด ที่มีความเข้มข้นของ Nicotinamide แตกต่างกันได้แก่ 0 (หลอดควบคุม), 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แสดงชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่ประกอบด้วยอาหาร biphasic medium 5 หลอด มีความเข้มข้นของ Nicotinamide เท่ากับ 0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

4.10.2 การทดสอบปฏิกิริยาของสาร Nicotinamide ต่อ redox indicator (STC)

เพื่อประเมินว่าสาร Nicotinamide สามารถทำปฏิกิริยากับสาร 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหรือไม่ โดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NIC-CBMA ที่เตรียมได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร เป็นเวลา 21 วัน หากไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่าสารทั้ง 2 ชนิดที่เป็นส่วนผสมในอาหารทดสอบไม่เกิดปฏิกิริยาด้วยตนเอง จึงสามารถทำการทดสอบในขั้นตอนถัดไป

CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.10.3 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ redox indicator (STC) ในชุดทดสอบ NIC-CBMA

นำชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่เตรียมได้จากข้อ 4.10.1 จำนวน 7 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วย NIC-CBMA 5 หลอด ที่มีความเข้มข้นของ Nicotinamide แตกต่างกัน (0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$) นำมาเติมสาร STC ความเข้มข้นตั้งต้น 3 mg/mL ปริมาณ 200, 100, 50, 40, 20, 10 และ 5 ไมโครลิตร ในชุดทดสอบ NIC-CBMA ชุดที่ 1 ถึง 7 ตามลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ STC ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือเท่ากับ 200, 100, 50, 40, 20, 10 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

จากนั้นเติมเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา Pyrazinamide โดยละลายเชื้อในน้ำกลั่นปรับให้ได้ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.5 McFarland นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า (มีเชื้อประมาณ 2.0×10^5 ถึง 4.0×10^6 CFU/mL) และเติมลงในอาหารทดสอบหลอดละ 200 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบประมาณ 4.0×10^4 CFU ถึง 8.0×10^5 CFU ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 มิลลิลิตร การเติมนั้นทำได้โดยหยอดเชื้อผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เป็น slant ไปยังอาหารเหลว นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NIC-CBMA ทั้งหมด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวางเอียงแนวนอนเพื่อให้เชื้อเกาะและเจริญบนอาหารชนิดแข็งเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตั้งหลอดทดสอบขึ้น บ่มเพาะเชื้อต่ออีก 7 วัน ทำการอ่านและบันทึกผลทุกวัน อ่านผลโดยหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide ควรมีการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator (STC) จากสารไม่มีสีเป็นสีชมพู ภายใน 7 ถึง 14 วัน ซึ่งจะสะท้อนถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มเพาะเชื้อในอาหารที่มีและไม่มียา และหลอดอาหารที่ผสม Nicotinamide ไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลงของสี STC เลือกความเข้มข้นของ STC ที่เหมาะสม โดยความเข้มข้นนั้นต้องไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค สามารถตรวจวัดการมีชีวิตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อในอาหารทดสอบได้จากการเปลี่ยนสี STC สำหรับความเข้มข้นของ redox indicator (STC) ที่ไม่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีทันทีหลังจากการบ่มเพาะเชื้อในอาหารที่ผสม Nicotinamide ทุกความเข้มข้น ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสีของ redox indicator ที่ไม่สะท้อนถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตที่แท้จริง และเป็นสาเหตุของการเกิดผลบวกลวง นำความเข้มข้นของ STC ที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.10.4 การหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

นำชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่เตรียมได้จากข้อ 4.10.1 จำนวน 7 ชุด แต่ละชุดประกอบด้วย NIC-CBMA 5 หลอด ที่มีความเข้มข้นของ Nicotinamide แตกต่างกัน (0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$) นำมาเติมสาร STC ให้ได้ความ

เข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมตามข้อ 4.10.3 จากนั้นทำการเจือจางความเข้มข้นของเชื้อสำหรับทดสอบความไวต่อยา โดยนำเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา Pyrazinamide ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง อายุ 3 ถึง 4 สัปดาห์ ใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นเป็น 1 McFarland (มีเชื้อประมาณ 10^7 CFU/mL) ทำการเจือจางความเข้มข้นเชื้อลงเป็นลำดับ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) ได้ความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10^7 ถึง 10^1 CFU/mL เติมเชื้อทดสอบที่เจือจางแล้วปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ลงในชุดทดสอบ NIC-CBMA ทั้ง 7 ชุด ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อประมาณ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 และ 1 CFU ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 มิลลิลิตร การเติมนั้นทำได้โดยหยอดเชื้อผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เป็น slant ไปยังอาหารเหลว นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NIC-CBMA ทั้งหมด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวางเอียงแนวนอน เพื่อให้เชื้อเกาะและเจริญบนอาหารชนิดแข็งเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตั้งหลอดทดสอบขึ้น บ่มเพาะเชื้อต่ออีก 7 วัน ทำการอ่านและบันทึกผลทุกวัน อ่านผลโดยหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide ควรมีการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator (STC) จากสารไม่มีสีเป็นสีชมพู ภายใน 7 ถึง 14 วัน ซึ่งจะสะท้อนถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตหลังจากบ่มเพาะเชื้อในอาหารที่มีและไม่มียา ส่วนหลอดอาหารที่ผสม Nicotinamide ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่ควรมีการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี STC เลือกปริมาณเชื้อทดสอบที่เหมาะสมในชุดทดสอบ NIC-CBMA มาใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.10.5 การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

นำสภาวะที่เหมาะสมของชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่ทดสอบได้ข้างต้น มาใช้ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งสิ้น 150 สายพันธุ์ โดยใช้เชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอายุ 3 ถึง 4 สัปดาห์ มีเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ที่ไวต่อยา Pyrazinamide เป็นตัว

ควบคุมลบ และเชื้อ *M. bovis* BCG ATCC 37534 ที่ติดต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมบวก ทำการอ่านผลทุกวัน โดยลักษณะของผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่ามีดังนี้

1. มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และ/หรือมีโคลนเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง แสดงถึงความเข้มข้นของ Nicotinamide นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคได้
2. ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและไม่มีโคลนเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แสดงถึงความเข้มข้นของ Nicotinamide นั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค

รายงานค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดของ Nicotinamide ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคและหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของ Nicotinamide ที่เหมาะสมสำหรับใช้วินิจฉัยเชื้อติดต่อยา Pyrazinamide คำนวณหาความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน โดยนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit และผลการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการติดต่อในยีน *pnca* ยีน *rpsA* และยีน *panD*

4.11 การวิเคราะห์ข้อมูลและการคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide

เปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยการติดต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค NIC-CBMA กับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA Kit โดยคำนวณหาความไว (Sensitivity) หมายถึง โอกาสที่ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐานจะได้รับการทดสอบว่าเป็นบวกด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ความจำเพาะ (Specificity) หมายถึง โอกาสที่ผลลบด้วยวิธีมาตรฐานจะได้รับการทดสอบว่าเป็นลบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เชื่อนั้นคือยาจริง เมื่อการตรวจด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นให้ผลบวก และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) หมายถึง ความน่าจะเป็นที่เชื่อนั้นไวต่อยา เมื่อการตรวจด้วยวิธีที่พัฒนาให้ผลลบ ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยมีเกณฑ์ดังนี้

1) เชื้อดื้อต่อยา PZA หมายถึง ผลตรวจด้วย BACTEC MGIT960/เทคนิค NIC-CBMA เป็น Resistance

2) เชื้อไวต่อยา PZA หมายถึง ผลตรวจด้วย BACTEC MGIT960/เทคนิค NIC-CBMA เป็น Susceptible

ตารางที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของเทคนิค NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960

| | ดื้อต่อยา PZA เมื่อตรวจด้วย BACTEC MGIT960 | ไวต่อยา PZA เมื่อตรวจด้วย BACTEC MGIT960 |
|---|--|--|
| ดื้อต่อยา PZA เมื่อตรวจด้วยชุด NIC-CBMA | ผลบวกจริง (a) | ผลบวกปลอม (b) |
| ไวต่อยา PZA เมื่อตรวจด้วยชุด NIC-CBMA | ผลลบปลอม (c) | ผลลบจริง (d) |

ความไวของการทดสอบ = $a/(a+c)$

ความจำเพาะของการทดสอบ = $d/(b+d)$

ค่าทำนายผลบวก = $a/(a+b)$

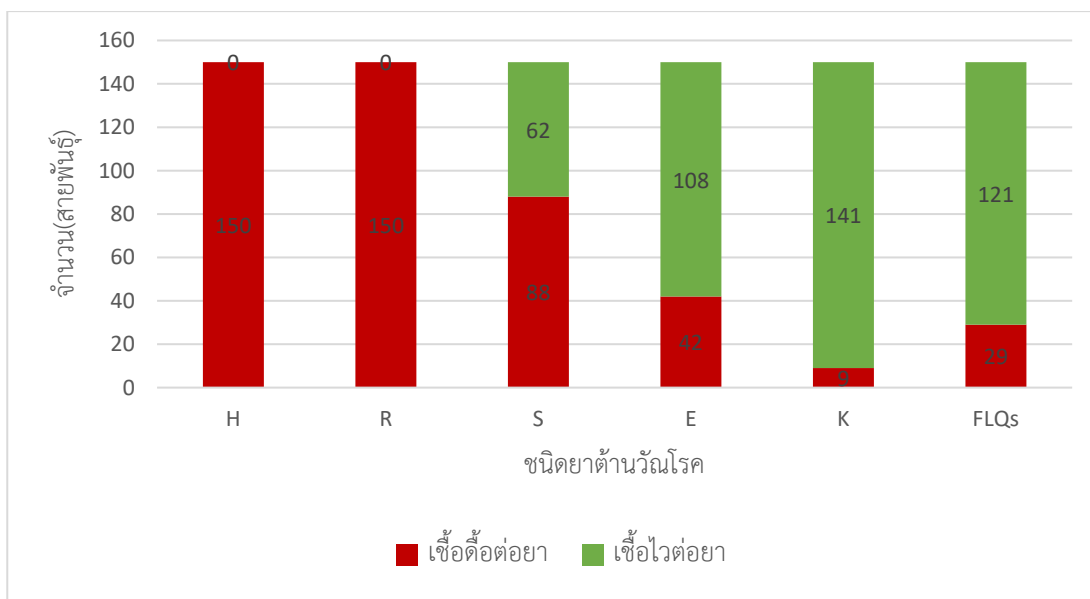
ค่าทำนายผลลบ = $d/(c+d)$

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ศึกษาในเชื้อวัณโรคดื้อยา (Drug resistant TB: DR-TB) ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันโรคทรวงอก จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย ซึ่งผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี Absolute concentration ในยา Isoniazid (H) ความเข้มข้น 0.2 และ 1 µg/mL ยา Rifampicin (R) ความเข้มข้น 40 µg/mL ยา Ethambutol (E) ความเข้มข้น 2 µg/mL ยา Streptomycin (S) ความเข้มข้น 4 µg/mL ยา Kanamycin (K) ความเข้มข้น 30 µg/mL ยา Ofloxacin (Ofx) ความเข้มข้น 2 µg/mL ยา Levofloxacin (Lfx) ความเข้มข้น 2 µg/mL และยา Moxifloxacin (Mfx) ความเข้มข้น 0.75 µg/mL ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อทั้งหมด พบว่าเชื้อวัณโรคทั้งหมด 150 สายพันธุ์ดื้อต่อยา Isoniazid และ ยา Rifampicin คิดเป็น 100% ดื้อต่อยา Streptomycin จำนวน 88 สายพันธุ์ คิดเป็น 58.67% ของเชื้อทั้งหมด ดื้อต่อยา Ethambutol จำนวน 42 สายพันธุ์ คิดเป็น 28% ของเชื้อทั้งหมด ดื้อต่อยา Kanamycin จำนวน 9 สายพันธุ์ คิดเป็น 6% ของเชื้อทั้งหมด และดื้อต่อยาในกลุ่ม Fluoroquinolones (FLQs) ได้แก่ ยา Ofloxacin, ยา Moxifloxacin หรือยา Levofloxacin จำนวน 29 สายพันธุ์ คิดเป็น 19.33 % ของเชื้อทั้งหมด (ภาพที่ 19)



*หมายเหตุ: H หมายถึงยา Isoniazid, R หมายถึงยา Rifampicin, S หมายถึงยา Streptomycin, E หมายถึงยา Ethambutol, K หมายถึงยา Kanamycin, FQs หมายถึงยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ได้แก่ ยา Ofloxacin ยา Levofloxacin และยา Moxifloxacin

ภาพที่ 19 แสดงจำนวนสายพันธุ์ที่ดื้อและไวต่อยาต้านวัณโรคแต่ละชนิด

เชื้อวัณโรคดื้อยาทั้งหมด 150 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอก เป็นเชื้อดื้อยาหลายขนาน (Multi-drug resistant TB: MDR-TB) ที่ดื้อต่อยา Isoniazid และยา Rifampicin พร้อมกัน มีจำนวน 118 สายพันธุ์ คิดเป็น 78.67% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด เชื้อดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (Pre-extensive drug resistant TB: Pre-XDR-TB) คือเชื้อ MDR-TB ที่ดื้อยารักษาวัณโรคในกลุ่ม Fluoroquinolones หรือยาในกลุ่ม Second-line injectable drugs (SLIs) อย่างไม่อย่างหนึ่ง มีจำนวน 26 สายพันธุ์ คิดเป็น 17.33% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด ในขณะที่เชื้ออีก 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาชนิดรุนแรงมาก (Extensive drug resistant TB: XDR-TB) คือเชื้อ MDR-TB ที่ดื้อยารักษาวัณโรคในกลุ่ม FQs และ SLIs คิดเป็น 4% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด (ตารางที่ 11 และ ภาพที่ 20)

ตารางที่ 11 รูปแบบการดื้อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Absolute concentration

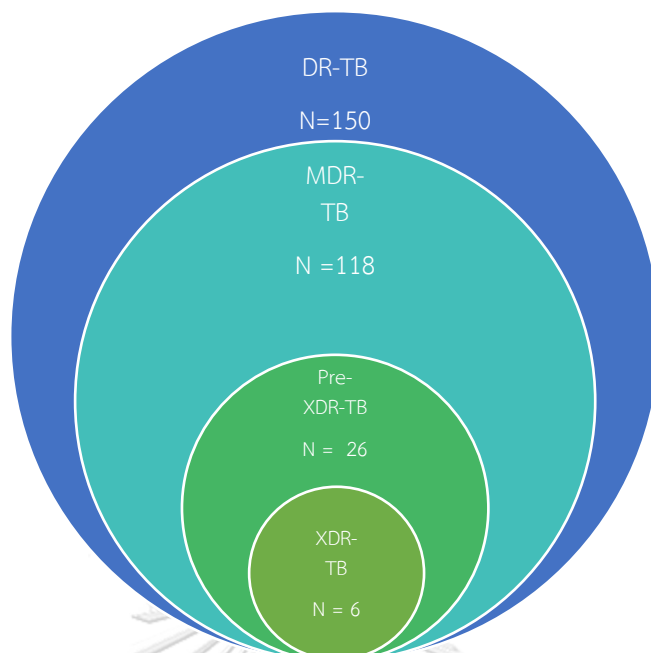
| ประเภทวัณโรคดื้อยา | รูปแบบการดื้อยาต้านวัณโรคเมื่อทดสอบด้วยวิธี Absolute concentration | รวม (สายพันธุ์) |
|---|--|-----------------|
| วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB)* ทั้งหมด 118 สายพันธุ์ | HR | 43 |
| | SHR | 49 |
| | HRE | 8 |
| | SHRE | 18 |
| วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (Pre-XDR-TB)* ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ | HR FQs | 3 |
| | SHR FQs | 9 |
| | HRE FQs | 4 |
| | SHRE FQs | 7 |
| | HREK | 1 |
| | SHRK | 2 |
| วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (XDR-TB)* ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ | HRK FQs | 1 |
| | SHRK FQs | 1 |
| | HREK FQs | 2 |
| | SHREK FQs | 2 |
| เชื้อวัณโรคดื้อยา (Drug resistant TB : DR-TB) | | 150 |

หมายเหตุ : H หมายถึงยา Isoniazid, R หมายถึงยา Rifampicin, E หมายถึงยา Ethambutol, S หมายถึงยา Streptomycin, K หมายถึงยา Kanamycin, FQs หมายถึงยาในกลุ่ม Fluoroquinolone ได้แก่ ยา Ofloxacin ยา Levofloxacin และยา Moxifloxacin

* วัณโรคดื้อยาหลายขนาน Multi-drug resistant TB (MDR-TB) หมายถึง เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา H และยา R พร้อมกันและอาจจะดื้อต่อยาขนานอื่น ๆ ด้วยก็ได้

* วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง Pre-extensive drug resistant TB (Pre-XDR-TB) หมายถึง เชื้อ MDR-TB ที่ดื้อยารักษาวัณโรคในกลุ่ม FQs หรือ second-line injectable drugs (SLIs) ได้แก่ kanamycin, amikacin และ capreomycin อย่างใดอย่างหนึ่ง

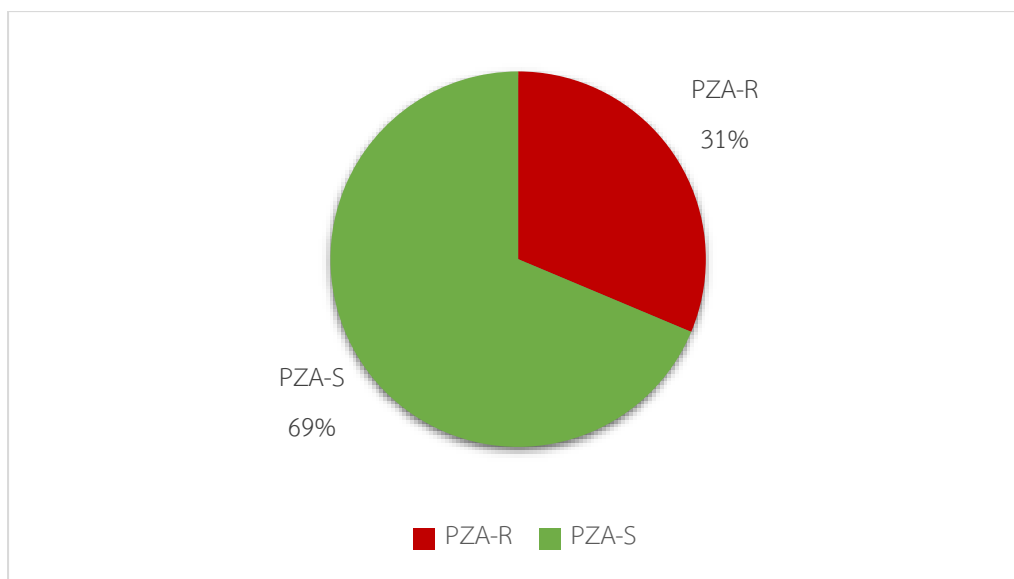
* วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก Extensive drug resistant TB (XDR-TB) หมายถึง เชื้อ MDR-TB ที่ดื้อยารักษาวัณโรคในกลุ่ม FQs และ SLIs



ภาพที่ 20 แสดงจำนวนเชื้อวัณโรคดื้อยาแต่ละประเภทที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอก

2. ความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit

เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ถูกนำมาทดสอบและแปลผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (PZA) ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA Kit โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ที่ไวต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมลบ และเชื้อ *M. bovis* BCG ATCC 37534 ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมบวก ความเข้มข้นวิกฤตของยา Pyrazinamide ที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 100 µg/mL โดยเครื่องตรวจวิเคราะห์แบบอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 system จะทำการแปลผลและรายงานผลเมื่อหลอดควบคุมมีค่าหน่วยการเจริญเติบโตหรือ Growth unit มากกว่า 400 หากในหลอดที่มียา Pyrazinamide มีค่า Growth unit มากกว่าหรือเท่ากับ 100 เครื่องจะรายงานเป็น Resistance แปลผลได้ว่าเชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide ในขณะที่ค่า Growth unit น้อยกว่า 100 เครื่องจะรายงานว่า Susceptible แปลผลได้ว่าเชื้อไวต่อยา Pyrazinamide พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบดื้อต่อยา Pyrazinamide (PZA^R) จำนวน 47 สายพันธุ์ คิดเป็น 31.33% ของเชื้อทั้งหมด และเชื้ออีก 103 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide (PZA^S) คิดเป็น 68.67% ของเชื้อทั้งหมด (ภาพที่ 21)



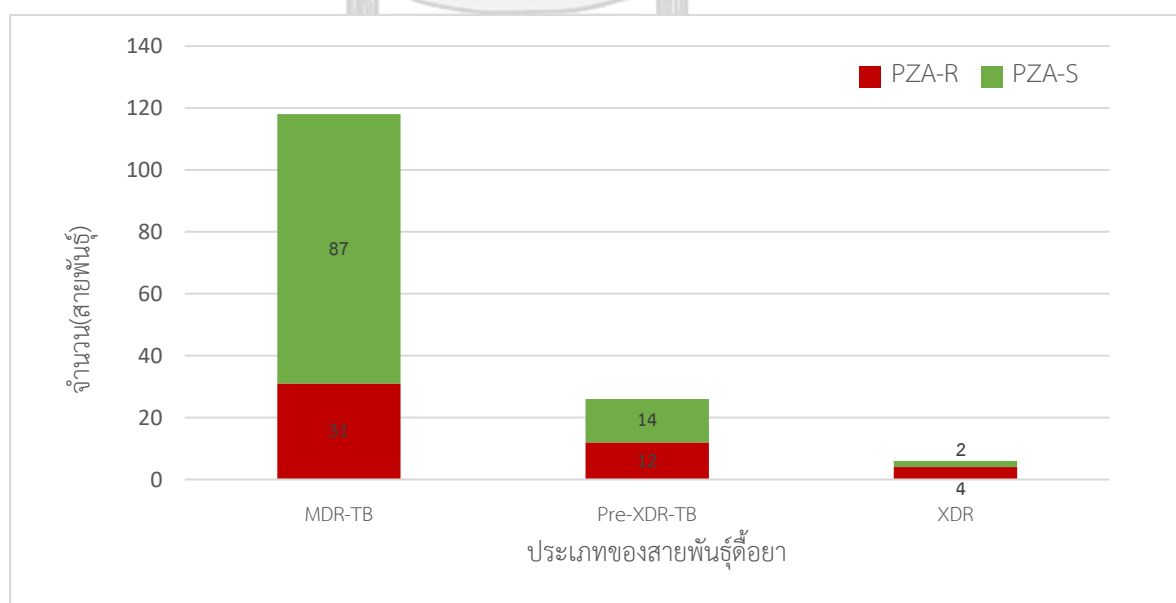
ภาพที่ 21 สัดส่วนการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* (150 สายพันธุ์) เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ให้ผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide ทั้งหมด 103 สายพันธุ์ จะมีหน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) น้อยกว่า 100 ในขณะที่เชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide ทั้งหมด 47 สายพันธุ์ พบหน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) ตั้งแต่ 100 ถึง 400 โดยเชื้อที่มี Growth unit ระหว่าง 100 ถึง 199 มีจำนวน 6 สายพันธุ์ ค่า Growth unit ระหว่าง 200 ถึง 299 มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ค่า Growth unit ระหว่าง 300 ถึง 399 มีจำนวน 1 สายพันธุ์ และ ค่า Growth unit มากกว่าเท่ากับ 400 มีจำนวน 36 สายพันธุ์ โดยมีระยะเวลาการตรวจพบ (Time to detection: TTD) อยู่ระหว่าง 4.83 ถึง 20.67 วัน มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 9.13 วัน สำหรับเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide มีระยะเวลาการตรวจพบเร็วที่สุดอยู่ที่ 5.42 วัน และช้าสุดที่ 20.67 วัน มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 9.27 วัน และเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide มีระยะเวลาการตรวจพบเร็วที่สุดอยู่ที่ 4.83 วัน และช้าสุดที่ 15.38 วัน มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 9.08 วัน (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ผลความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT 960 PZA Kit

| หน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) | ดื้อต่อยา PZA (สายพันธุ์) | ไวต่อยา PZA (สายพันธุ์) |
|--------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <100 | - | 103 |
| 100-199 | 6 | - |
| 200-299 | 4 | - |
| 300-399 | 1 | - |
| ≥400 | 36 | - |
| รวม | 47 | 103 |
| ระยะเวลาการตรวจพบเฉลี่ย (วัน) | 9.27 | 9.08 |

เชื้อ MDR-TB ทั้งหมด 118 สายพันธุ์ พบว่าดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 31 สายพันธุ์ (26.27% ของเชื้อ MDR-TB ทั้งหมด) เชื้อ Pre-XDR-TB ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ ดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 12 สายพันธุ์ (46.15% ของเชื้อ Pre-XDR-TB ทั้งหมด) และเชื้อ XDR-TB ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 4 สายพันธุ์ (66.67% ของเชื้อ XDR-TB ทั้งหมด) (ภาพที่ 22)



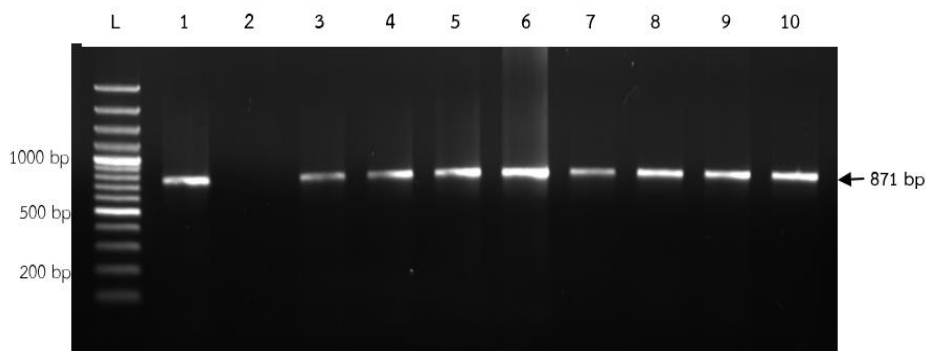
ภาพที่ 22 แสดงจำนวนวัณโรคที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide แยกตามประเภทของสายพันธุ์ดื้อยา

3. การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยวิธีการต้ม

สกัดดีเอ็นเอจากโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ปริมาณ 1 loopful หรือใช้ตะกอนเชื้อจาก MGIT broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาต้มใน TE buffer ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ (Nanodrop™ 100 spectrophotometer) ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากค่า OD 260/280 ควรมีค่าอยู่ที่ 1.8 ถึง 1.9 หากมีค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจำนวน 90 ตัวอย่าง มีปริมาณอยู่ระหว่าง 6.33 ถึง 2,262.66 ng/ μ L และมีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.193 ถึง 2.637 (มีค่าต่ำกว่า 1.8 จำนวน 36 ตัวอย่าง และมีค่ามากกว่า 1.8 จำนวน 54 ตัวอย่าง) สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MGIT broth จำนวน 60 ตัวอย่าง มีปริมาณอยู่ระหว่าง 2.38 ถึง 48.484 ng/ μ L และมีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 1.045 ถึง 2.142 (มีค่าต่ำกว่า 1.8 จำนวน 50 ตัวอย่าง และ ค่ามากกว่า 1.8 จำนวน 10 ตัวอย่าง)

4. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *pncA* ด้วยเทคนิค PCR

เชื้อวัณโรคตัวอย่างทั้งหมด 150 ตัวอย่าง มีผลการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* จำนวนทั้งหมด 122 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ทั้งหมด 47 สายพันธุ์ และเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide จำนวน 75 สายพันธุ์จากเชื้อที่ไวต่อยาทั้งหมด 103 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide อีกจำนวน 28 สายพันธุ์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อนำไปวิเคราะห์การกลายพันธุ์ได้ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากโคโลนีของเชื้อถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *pncA* ด้วยเทคนิค PCR ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 เป็นหลอดควบคุมบวก และน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water) เป็นหลอดควบคุมลบ ดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.7.1 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน *pncA* ดังแสดงในตารางที่ 9 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้วุ้น Agarose ความเข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ซึ่งผลผลิต PCR ที่เกิดจาก *pncA* primer มีขนาดเท่ากับ 871 คู่เบส (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *pncA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีขนาดของผลผลิตเท่ากับ 871 คู่เบส บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้น Agarose 1.5%

แถว L แสดงถึงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

แถวที่ 1 แสดงผลของตัวควบคุมบวกคือดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294

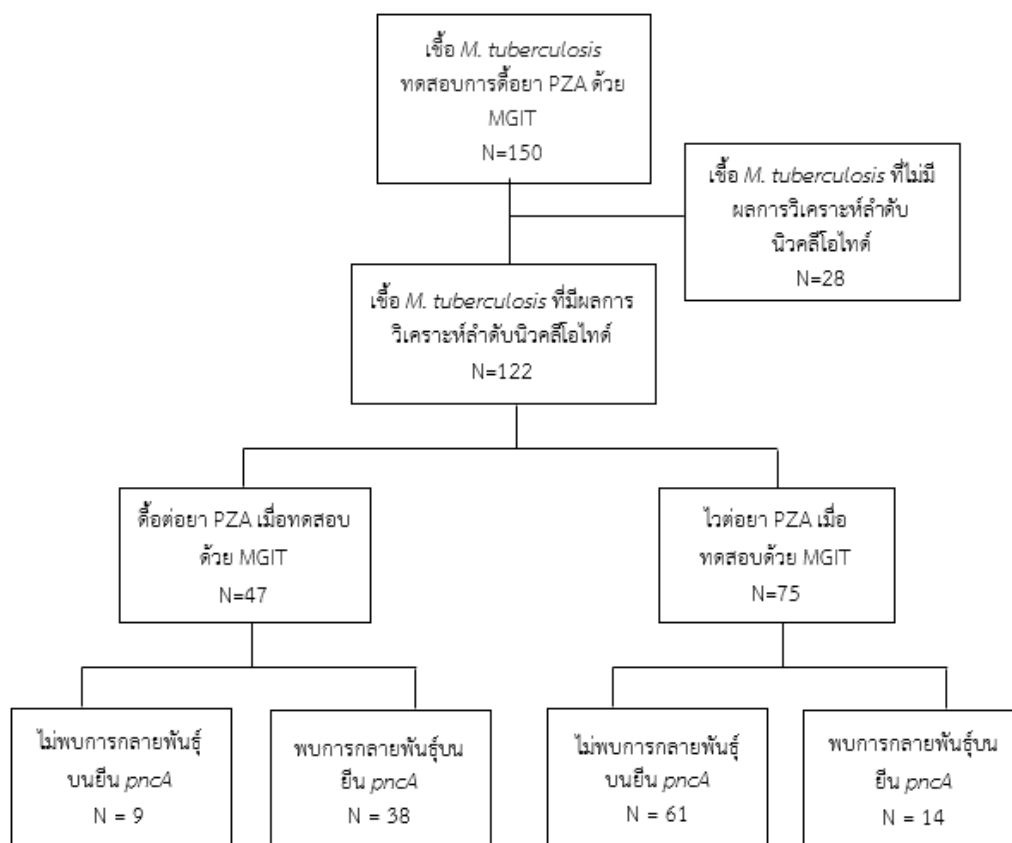
แถวที่ 2 แสดงผลของตัวควบคุมลบคือน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water)

แถวที่ 3 ถึง 10 แสดงผลของดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *pncA* ด้วยเทคนิค DNA Sequencing

ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวนทั้งหมด 122 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR จากขั้นตอนที่ 4.7.1 พร้อมทั้ง Forward primer และ Reverse primer ของยีน *pncA* ดังแสดงในตารางที่ 9 ถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยใช้ชุดทดสอบ BigDye® terminator version 3.1 cycle sequence reaction kit และเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ABI 3130 genetic analyzer ผลลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิกถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ผลการวิเคราะห์พบการกลายพันธุ์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 52 สายพันธุ์จากเชื้อทั้งหมด 122 สายพันธุ์ โดยเป็นการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อดีอียา Pyrazinamide (PZA^R) จำนวน 38 สายพันธุ์จากทั้งหมด 47 สายพันธุ์ คิดเป็น 80.85%

ของเชื้อ PZA^R ทั้งหมด สำหรับเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (PZA^S) พบการกลายพันธุ์จำนวน 14 สายพันธุ์จากทั้งหมด 75 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.67% ของเชื้อ PZA^S ทั้งหมด (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 แผนผังแสดงจำนวนเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการทดสอบความไวต่อยา PZA ด้วยวิธี MGIT และวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *pncA* ด้วยเทคนิค DNA Sequencing

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของการกลายพันธุ์ที่พบบนยีน *pncA* พบว่ามี การกลายพันธุ์แบบการแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (Nonsynonymous mutations) มากที่สุดมีทั้งหมด 36 สายพันธุ์ จากเชื้อที่พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ (69.23% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) รองลงมาคือการกลายพันธุ์แบบ Frameshift mutations ซึ่งเกิดจากการแทรกเข้าและขาดหายไปของเบส (Insertion/Deletion) พบจำนวน 8 สายพันธุ์ (15.38% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์บริเวณ Promoter พบจำนวน 5 สายพันธุ์ (9.62% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์แบบ Nonsense mutations พบจำนวน 2 สายพันธุ์ (3.85% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) และการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2

ตำแหน่ง (Double mutations) พบจำนวน 1 สายพันธุ์ (1.92% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) ในเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* พบเป็นเชื้อ MDR-TB จำนวน 35 สายพันธุ์จากเชื้อ MDR-TB ทั้งหมด 96 สายพันธุ์ คิดเป็น 36.46% พบในเชื้อ Pre-XDR-TB จำนวน 14 สายพันธุ์จากทั้งหมด 22 สายพันธุ์ คิดเป็น 63.67% และพบในเชื้อ XDR-TB จำนวน 3 สายพันธุ์จากทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 75% (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ในเชื้อวัณโรคทั้งหมด 122 สายพันธุ์

| รูปแบบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | ประเภทการดื้อยา | | | |
|---|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| | MDR (สายพันธุ์) | Pre-XDR (สายพันธุ์) | XDR (สายพันธุ์) | รวม (สายพันธุ์) |
| Promotor | 2 | 3 | - | 5 |
| Nonsynonymous | 25 | 9 | 2 | 36 |
| Insertion/Deletion | 6 | 1 | 1 | 8 |
| Double mutation | 1 | - | - | 1 |
| Nonsense mutation | 1 | 1 | - | 2 |
| รวมสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (สายพันธุ์) | 35 | 14 | 3 | 52 |
| ไม่พบการกลายพันธุ์ (Wild-type) | 61 | 8 | 1 | 70 |
| จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด | 96 | 22 | 4 | 122 |

สำหรับเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (PZA^R) เมื่อทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA ทั้งหมด 47 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จำนวน 38 สายพันธุ์ (80.85% ของเชื้อ PZA^R ทั้งหมด) และอีก 9 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ (19.15% ของเชื้อ PZA^R ทั้งหมด) รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดคือ การแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวในบริเวณดีเอ็นเอที่ถอดรหัสที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (Nonsynonymous mutations) พบจำนวน 22 สายพันธุ์ (57.89% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์) การแทรกเข้าและขาดหายไปของเบส (Insertion/Deletion) พบจำนวน 8 สายพันธุ์ (21.05% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์บริเวณ Promoter พบจำนวน 5 สายพันธุ์ (13.16% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์แบบ Nonsense mutations พบจำนวน 2 สายพันธุ์ (5.26% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์) นอกจากนี้พบเชื้อ 1 สายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่งร่วมกัน

(Double mutations) (2.63% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์) ในเชื้อ PZA^R ที่มีกลายพันธุ์บนยีน *pncA* พบเป็นเชื้อ MDR-TB จำนวน 25 สายพันธุ์จาก 33 สายพันธุ์ คิดเป็น 75.76% พบในเชื้อ Pre-XDR-TB จำนวน 10 สายพันธุ์จากทั้งหมด 11 สายพันธุ์ คิดเป็น 90.91% และในเชื้อ XDR-TB พบการกลายพันธุ์ทั้งหมดจากจำนวน 3 สายพันธุ์ คิดเป็น 100% (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (47 สายพันธุ์)

| รูปแบบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | ประเภทการดื้อยา | | | |
|---|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| | MDR (สายพันธุ์) | Pre-XDR (สายพันธุ์) | XDR (สายพันธุ์) | รวม (สายพันธุ์) |
| Promotor | 2 | 3 | - | 5 |
| Nonsynonymous | 15 | 5 | 2 | 22 |
| Insertion/Deletion | 6 | 1 | 1 | 8 |
| Double mutation | 1 | - | - | 1 |
| Nonsense mutation | 1 | 1 | - | 2 |
| รวมสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (สายพันธุ์) | 25 | 10 | 3 | 38 |
| ไม่พบการกลายพันธุ์ (Wild-type) | 8 | 1 | - | 9 |
| จำนวนสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา PZA | 33 | 11 | 3 | 47 |

สำหรับเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (PZA^S) เมื่อทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA ที่มีผล *pncA* sequencing ทั้งหมด 75 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จำนวน 14 สายพันธุ์ (18.67% ของเชื้อ PZA^S ทั้งหมด) และอีก 61 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ (81.33% ของเชื้อ PZA^S ทั้งหมด) โดยรูปแบบการกลายพันธุ์มีเพียงรูปแบบเดียวคือ การแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวในบริเวณดีเอ็นเอที่ถอดรหัสที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (Nonsynonymous mutations) ในเชื้อ PZA^S ที่มีกลายพันธุ์บนยีน *pncA* พบเป็นเชื้อ MDR-TB จำนวน 10 สายพันธุ์จาก 63 สายพันธุ์ คิดเป็น 15.87% พบในเชื้อ Pre-XDR-TB จำนวน 4 สายพันธุ์จาก 11 สายพันธุ์ คิดเป็น 36.36% และไม่พบการกลายพันธุ์ในเชื้อ XDR-TB ที่มีเพียง 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ในเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (75 สายพันธุ์)

| รูปแบบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | จำนวนสายพันธุ์ที่ไวต่อยา PZA | | | |
|---|------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| | MDR (สายพันธุ์) | Pre-XDR (สายพันธุ์) | XDR (สายพันธุ์) | รวม (สายพันธุ์) |
| Promotor | - | - | - | - |
| Nonsynonymous | 10 | 4 | - | 14 |
| Insertion/Deletion | - | - | - | - |
| Multiple mutation | - | - | - | - |
| รวมสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ (สายพันธุ์) | 10 | 4 | - | 14 |
| ไม่พบการกลายพันธุ์ (Wild-type) | 53 | 7 | 1 | 61 |
| รวม (สายพันธุ์) | 63 | 11 | 1 | 75 |

รายละเอียดของรูปแบบการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่าง ๆ บนยีน *pncA* แสดงดังตารางที่ 16 และ 17 โดยพบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 34 แบบ ในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ โดยเป็นการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 26 แบบ (76.47% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด) เป็นการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในการศึกษานี้ จำนวน 4 แบบ (11.76% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด) เป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยาจำนวน 2 แบบ (5.88% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด) และเป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อต่อ Pyrazinamide อีก 2 แบบ (5.88% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด)

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* และผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยา Pyrazinamide ทั้งหมด 47 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์จำนวน 38 สายพันธุ์ และมีรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 29 แบบ เป็นการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อ Pyrazinamide จำนวน 25 แบบ ได้แก่ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง promoter -11 เบส Adenine เปลี่ยนเป็นเบส Cytosine จำนวน 3 สายพันธุ์ และ เบส Adenine เปลี่ยนเป็นเบส Guanine จำนวน 2 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 90 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น Serine (Isoleucine90-Serine) จำนวน 3 สายพันธุ์ กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 136 ซึ่งมีการแทรก

เข้ามาของเบส Cytosine มีจำนวน 3 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 139 มีจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยพบการกลายพันธุ์ได้ 3 แบบ ได้แก่ Valine139-Glycine, Valine139-Alanine และ Valine139-Leucine การกลายพันธุ์แบบ Aspartic acid12-Alanine พบจำนวน 2 สายพันธุ์ แบบ Serine104-Arginine พบจำนวน 2 สายพันธุ์ ส่วนการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาอีก 16 แบบ พบแบบละ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Glycine24-Aspartic acid, Leucine35-Proline, Tyrosine41STOP, Threonine47-Proline, Proline62-Leucine, Serine67-Proline, Tryptophan 68- Glycine, Cysteine72-Tyrosine, Tyrosine103STOP, Glycine105-Valine, Tryptophan119-Arginine, Leucine120-Arginine, การกลายพันธุ์พร้อมกัน 2 ตำแหน่ง คือ Aspartate126-Histidine และ Aspartate129-Tyrosine, Leucine172-Proline, การแทรกเข้ามาของเบส Thymine และ Guanine ที่โคดอน 150, การแทรกเข้ามาของเบส Guanine และ Cytosine ที่โคดอน 177 นอกจากนี้พบเป็นการกลายพันธุ์ใหม่ที่ไม่มีพบในงานวิจัยก่อนหน้านี้ จำนวน 3 แบบ ได้แก่ การแทรกเข้ามาของเบส Thymine ที่โคดอน 97, การแทรกเข้ามาของเบส Cytosine ที่โคดอน 132, การขาดหายของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 493 ถึง 496 และพบการกลายพันธุ์ 1 แบบที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา ได้แก่ Isoleucine31-Threonine (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ที่พบในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (38 สายพันธุ์)

| รูปแบบความไวต่อยา ด้านวัณโรค (สายพันธุ์) | ตำแหน่งและนิวคลีโอ ไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป | ตำแหน่งโคดอนและกรด อะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป | การกลายพันธุ์ สัมพันธ์กับการ ดื้อยา PZA | จำนวน (สาย พันธุ์) |
|--|--|--|---|--------------------------|
| SHROML (1), SHREOML (2) | A-11C | promoter -11 | R* | 3 |
| HRE, SHREKOML | A-11G | promoter -11 | R* | 2 |
| SHRE, HR | A35C | Asp12Ala | R* | 2 |
| SHRE | G71A | Gly24Asp | R* | 1 |
| SHR | T92C | Ile31Thr | S* | 1 |
| HREKOML | T104C | Leu35Pro | R* | 1 |
| SHREO | C123G | Tyr41STOP | R* | 1 |
| SHRE | A139C | Thr47Pro | R* | 1 |
| SHRKOML | C185T | Pro62Leu | R* | 1 |

| | | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------|-----|---|
| SHRE | T199C | Ser67Pro | R* | 1 |
| HR | T202G | Trp68Gly | R* | 1 |
| SHR | G215A | Cys72Tyr | R* | 1 |
| SHR (2), HR (1) | T269G | Ile90Ser | R* | 3 |
| SHR | C309G | Tyr103STOP | R* | 1 |
| SHR, HREO | A310C | Ser104Arg | R* | 2 |
| SHREOML | G314T | Gly105Val | R* | 1 |
| SHRE | T355C | Trp119Arg | R* | 1 |
| SHREOML | T359G | Leu120Arg | R* | 1 |
| SHR | G376C, G385T | Asp126His, Asp129Tyr | R* | 1 |
| HREK | T416G | Val139Gly | R* | 1 |
| SHRE | T416C | Val139Ala | R* | 1 |
| SHR | G415C | Val139Leu | R* | 1 |
| HREOML | T515C | Leu172Pro | R* | 1 |
| SHR | 292 insertion T | Frameshift cd.97 | New | 1 |
| SHR | 394 insertion C | Frameshift cd.132 | New | 1 |
| SHRE (2), HROMLK (1) | 408 insertion C | Frameshift cd.136 | R* | 3 |
| HRE | 449 insertion TG | Frameshift cd.150 | R* | 1 |
| SHRE | 493-496 deletion | Frameshift cd.165 | New | 1 |
| SHR | 529 insertion GC | Frameshift cd.177 | R* | 1 |

หมายเหตุ S หมายถึง ยา Streptomycin, R หมายถึงยา Rifampicin, H หมายถึงยา Isoniazid, E หมายถึงยา Ethambutol, L หมายถึงยา Levofloxacin, M หมายถึงยา Moxifloxacin, O หมายถึงยา Ofloxacin, K หมายถึงยา Kanamycin, cd. หมายถึง codon, R หมายถึง การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide, S* หมายถึง การกลายพันธุ์ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide, New หมายถึง การกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในการศึกษา

นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ในเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Pyrazinamide จำนวน 14 สายพันธุ์จากเชื้อที่ไวต่อยาทั้งหมด 75 สายพันธุ์ โดยพบรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 6 แบบ ดังตารางที่ 17 เป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 2 แบบ ได้แก่ แบบ Isoleucine31-Threonine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ และแบบ Valine163-Alanine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ เป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide อีกจำนวน 2 แบบ ได้แก่ Threonine61-Proline พบจำนวน 4 สายพันธุ์ และแบบ Phenylalanine106-Leucine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบเป็นการกลายพันธุ์

ใหม่ที่ไม่พบในงานวิจัยก่อนหน้า 1 แบบ ได้แก่ Aspartic acid63-Proline จำนวน 1 สายพันธุ์ และ อีก 1 แบบเป็นการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา ได้แก่ Aspartic acid136-Glycine พบจำนวน 1 สายพันธุ์

ตารางที่ 17 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ที่พบในเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide (14 สายพันธุ์)

| รูปแบบความไวต่อยา ต้านวัณโรค (สายพันธุ์) | ตำแหน่งและนิวคลีโอไทด์ที่ เปลี่ยนแปลงไป | ตำแหน่งโคดอนและ กรดอะมิโนที่ เปลี่ยนแปลงไป | การกลายพันธุ์ เกี่ยวข้องกับการดื้อ ยา PZA | จำนวน (สายพันธุ์) |
|--|--|--|---|----------------------|
| SHR (5), SHROML (1) | T92C | Ile31Thr | S* | 6 |
| HR (3), SHRK (1) | A181C | Thr61Pro | I | 4 |
| HR | A188C | Asp63Pro | New | 1 |
| SHREOML | T316C | Phe106Leu | I | 1 |
| SHROML | A407G | Asp136Gly | R* | 1 |
| HRE | T488C | Val163Ala | S* | 1 |

หมายเหตุ S หมายถึง ยา Streptomycin, R หมายถึงยา Rifampicin, H หมายถึงยา Isoniazid, E หมายถึงยา Ethambutol, L หมายถึงยา Levofloxacin, M หมายถึงยา Moxifloxacin, O หมายถึงยา Ofloxacin, K หมายถึงยา Kanamycin, R หมายถึง การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide, S* หมายถึง การกลายพันธุ์ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide, I หมายถึง การกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา, New หมายถึง การกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในการศึกษานี้

6. การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit โดยการลดปริมาณเชื้อในการทดสอบความไวต่อยา (AST inoculum)

จากงานวิจัยก่อนหน้าพบการรายงานผลบวกหลงในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ค่อนข้างสูง จากการเติมเชื้อปริมาณมากในการทดสอบ ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต่างมากขึ้น ซึ่งสภาวะนี้ยาจะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ การศึกษานี้จึงทำการทดสอบความไวต่อยาซ้ำโดยลดปริมาณเชื้อในการทดสอบความไวต่อยา (AST inoculum) ลงในสายพันธุ์ที่มีผลดื้อต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA*

หรือพบการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยาด้วยวิธี DNA sequencing เพื่อป้องกันผลลัพธ์ที่ผิดพลาด โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Piersimoni และคณะ (72) ที่รายงานว่า การลดปริมาณ AST inoculum ลงสามารถป้องกันการเกิดผลบวกจากการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ได้ โดยทำการทดสอบในเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* และอีก 1 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยาแต่พบการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide พบว่าเชื้อจำนวน 7 สายพันธุ์ มีผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อลดปริมาณเชื้อทดสอบลง และเชื้ออีก 3 สายพันธุ์ ให้ผลดื้อต่อยา Pyrazinamide เหมือนเดิม (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit ตามวิธีมาตรฐานและวิธีการลดปริมาณเชื้อในการทดสอบความไวต่อยา (AST inoculum)

| เลขที่เชื้อทดสอบ | การกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | การทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน | | การทดสอบโดยการลด AST inoculum | |
|------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | | ความไวต่อยา PZA | หน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) | ความไวต่อยา PZA | หน่วยการเจริญเติบโต (Growth unit) |
| 15 | Wild type | R | 126 | S | 0 |
| 21 | Wild type | R | 118 | S | 0 |
| 22 | Wild type | R | 264 | S | 0 |
| 27 | Wild type | R | 128 | S | 0 |
| 35 | Wild type | R | 245 | S | 0 |
| 69 | Wild type | R | 400 | R | 400 |
| 76 | Ile31Thr | R | 267 | S | 0 |
| 90 | Wild type | R | 383 | R | 400 |
| 97 | Wild type | R | 136 | S | 0 |
| 128 | Wild type | R | 240 | R | 309 |

*หมายเหตุ R หมายถึง ดื้อต่อยา Pyrazinamide, S หมายถึง ไวต่อยา Pyrazinamide

เมื่อคำนวณสัดส่วนการดื้อยา Pyrazinamide ใหม่หลังการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค BACTEC MGIT 960 PZA Kit ตามวิธีมาตรฐานและวิธีการลดปริมาณเชื้อ (AST inoculum) พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบดื้อต่อ

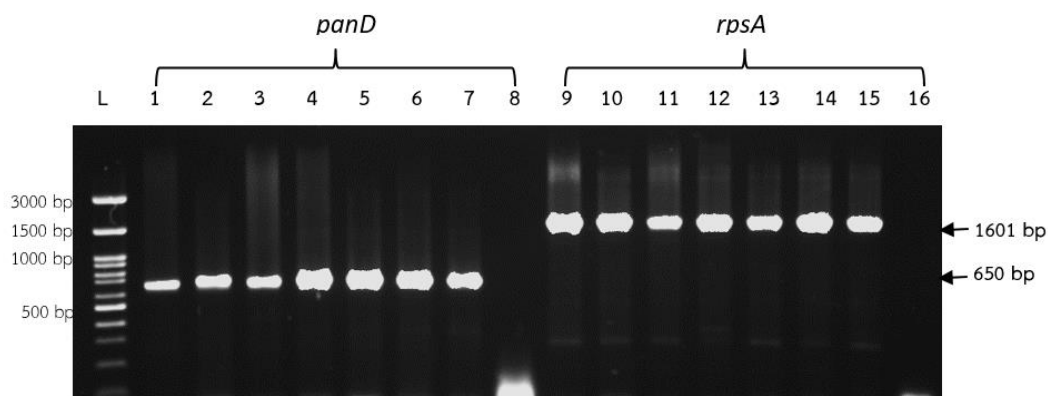
ยา Pyrazinamide ด้วยวิธี MGIT จำนวน 40 สายพันธุ์ คิดเป็น 26.67% ของเชื้อทั้งหมด และเชื้ออีก 110 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide คิดเป็น 73.33% ของเชื้อทั้งหมด (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์กับการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis*

| การดื้อยาแบบฟีโนไทป์ | ดื้อต่อยา PZA (สายพันธุ์) | ไวต่อยา PZA (สายพันธุ์) | รวม (สายพันธุ์) |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|
| การดื้อยาแบบจีโนไทป์ | 40 (26.67%) | 110 (73.33%) | 150 (100%) |
| ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | 3 | 67 | 70 |
| พบการกลายพันธุ์บนยีน <i>pncA</i> | 37 | 15 | 52 |
| • สัมพันธ์กับการดื้อยา | 34 | 1 | 35 |
| • ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา | - | 8 | 8 |
| • บทบาทไม่แน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา | - | 5 | 5 |
| • การกลายพันธุ์ใหม่ | 3 | 1 | 4 |
| <i>pncA</i> sequencing | 40 | 82 | 122 |

7. การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค PCR

ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rpsA* และ *panD* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 เป็นหลอดควบคุมบวก และน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water) เป็นหลอดควบคุมลบ ดำเนินปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนในบทวิธีดำเนินการวิจัย ข้อ 4.7.2 และ 4.7.3 โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนทั้งสองดังแสดงในตารางที่ 9 ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้น Agarose 1.5% โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ผลผลิต PCR ที่เกิดจาก *rpsA* primer และ *panD* primer มีขนาดเท่ากับ 1,601 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน *rpsA* และ *panD* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีขนาดของผลผลิตเท่ากับ 1,601 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ บน Agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นวุ้น Agarose 1.5 %
 แถว L แสดงถึงดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส
 แถวที่ 1 แสดงผลตัวควบคุมบวกคือการเพิ่มปริมาณ *panD* จากดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294
 แถวที่ 2 ถึง 7 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ *panD* จากดีเอ็นเอเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก
 แถวที่ 8 แสดงผลของตัวควบคุมลบคือน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water)
 แถวที่ 9 แสดงผลตัวควบคุมบวกคือการเพิ่มปริมาณ *rpsA* จากดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294
 แถวที่ 10 ถึง 15 แสดงผลการเพิ่มปริมาณ *rpsA* ของดีเอ็นเอเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก
 แถวที่ 16 แสดงผลของตัวควบคุมลบคือน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Milli-Q water)

8. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค DNA Sequencing

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpsA* และยีน *panD* โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR จากขั้นตอนที่ 4.7.2 และ 4.7.3 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค DNA sequencing โดยบริษัท Bioneer Sequencing Service จำกัด สาธารณรัฐเกาหลีใต้ นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) ของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pnca* มีการกลายพันธุ์บนยีน *rpsA* จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยมีรูปแบบการกลายพันธุ์เพียงแบบเดียว

คือ การเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งแต่กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง (Synonymous mutation) ที่โคดอน 212 และไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *panD* (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *rpsA* และ *panD* ที่พบในเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide และไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pnxA*

| รูปแบบความไวต่อยา ต้านวัณโรค (สายพันธุ์) | กลายพันธุ์ของยีน <i>rpsA</i> | | กลายพันธุ์ ของยีน <i>panD</i> | การกลายพันธุ์ เกี่ยวข้องกับการ ดื้อยา PZA | จำนวน (สายพันธุ์) |
|--|--|--|-------------------------------------|---|----------------------|
| | ตำแหน่งและนิวคลีโอ ไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป | ตำแหน่งโคดอน และกรดอะมิโนที่ เปลี่ยนแปลงไป | | | |
| SHR (1), SHROML (1) | A636C | Arg212Arg | - | S* | 2 |

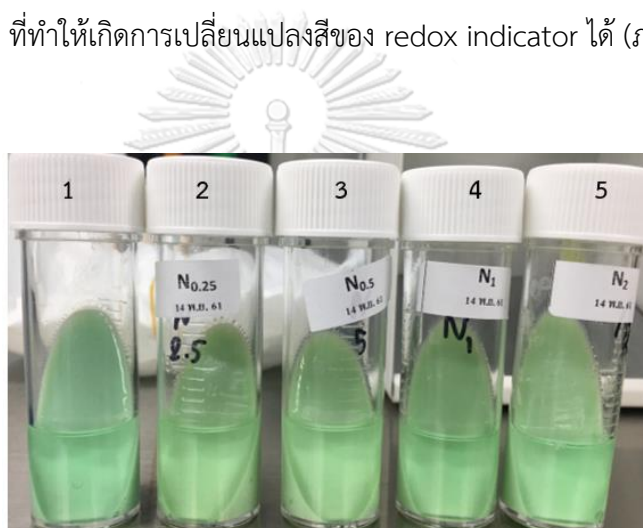
หมายเหตุ S หมายถึงยา Streptomycin, R หมายถึงยา Rifampicin, H หมายถึงยา Isoniazid, L หมายถึงยา Levofloxacin, M หมายถึงยา Moxifloxacin, O หมายถึงยา Ofloxacin, S หมายถึง การกลายพันธุ์ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide

9. ผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยชุดทดสอบ Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay (NIC-CBMA)

การศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาชุดทดสอบ Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay (NIC-CBMA) เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ Nicotinamide ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ตามขั้นตอนในบทวิธีการดำเนินงานวิจัย ข้อ 4.10 โดยใช้เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ที่มีความไวต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมลบ และเชื้อควบคุมบวกที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide คือ *M. bovis* BCG ATCC 37534 การพัฒนาชุดทดสอบ NIC-CBMA ประกอบไปด้วยขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยาของสาร Nicotinamide ต่อ redox indicator (STC) ขั้นตอนการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ redox indicator (STC) ในชุดทดสอบ NIC-CBMA ขั้นตอนการหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA และขั้นตอนทดสอบความไวต่อยากับเชื้อสายพันธุ์คลินิก

9.1 การทดสอบปฏิกิริยาของสาร Nicotinamide ต่อ redox indicator (STC)

เป็นการทดสอบเพื่อประเมินว่าสาร Nicotinamide สามารถทำปฏิกิริยากับสาร redox indicator ซึ่งได้แก่ สาร 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) แล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีหรือไม่ โดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ NIC-CBMA ที่เตรียมได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวัน พบว่าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ NIC-CBMA ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อนำไปบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน แสดงถึงสาร Nicotinamide ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสาร 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride (STC) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator ได้ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 ผลการทดสอบปฏิกิริยาของสาร Nicotinamide ต่อ redox indicator (STC) หลอดที่ 1 คือหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide หลอดที่ 2 ถึง 5 คือหลอดที่มี Nicotinamide ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator เมื่อนำไปบ่มในตู้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

9.2 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ redox indicator (STC) ในชุดทดสอบ NIC-CBMA

เมื่อนำชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่มีความเข้มข้นของ Nicotinamide แตกต่างกัน (0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$) มาเติม STC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 200, 100, 50, 40, 20, 10 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ และทดสอบกับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา Pyrazinamide ที่ความเข้มข้นประมาณ 4×10^4 ถึง 8×10^5 CFU ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อตามที่ CLSI แนะนำสำหรับการทดสอบความไวต่อยาในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

หลังจากบ่มหลอดทดสอบที่ 37 องศาเซลเซียส และสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลวจากไม่มีสีจนกลายเป็นสีชมพูแสดงถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและอ่านค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยพบว่าความเข้มข้นของ STC ตั้งแต่ 5 ถึง 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในชุดทดสอบ NIC-CBMA ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ วัณโรค โดยสามารถตรวจวัดความมีชีวิตของเชื้อได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลวจากไม่มีเป็นสีชมพู โดยความเข้มข้นของสี STC ที่ 100 และ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีการเปลี่ยนแปลงสีในชุดทดสอบ NIC-CBMA ทุกหลอด หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 1 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่มีความเข้มข้นของ STC เท่ากับ 40 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบมีการเปลี่ยนสีในหลอดอาหารที่มีความเข้มข้น Nicotinamide ที่ 0, 250, 500 และ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 3 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่มีความเข้มข้นของสี STC ที่ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบมีการเปลี่ยนสีในหลอดอาหารผสม Nicotinamide ความเข้มข้น ที่ 0 และ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 5 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่มีความเข้มข้นของสี STC ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบมีการเปลี่ยนสีในหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide เท่านั้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงสี หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 7 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่า 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และความเข้มข้นของสี STC ที่ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ พบมีการเปลี่ยนสีในหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide เท่านั้น มีการเปลี่ยนแปลงสีหลังจากบ่มเชื้อแล้ว 10 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่า 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยความเข้มข้นของสี STC ที่ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจดูการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่สะท้อนถึงการเพิ่มจำนวนของเชื้อที่มีชีวิตที่แท้จริงและไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอม โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ redox indicator (STC) ในชุดทดสอบ NIC-CBMA

| ความเข้มข้นของสี STC ($\mu\text{g/mL}$) | ผลของ STC ในการ ยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อ | ค่า Nicotinamide ใน การยับยั้งเชื้อ ($\mu\text{g/mL}$) | ระยะเวลาในการเริ่ม เปลี่ยนสี (วัน) |
|--|--|--|--|
| 200 | ไม่มี | >2,000 | 1 |
| 100 | ไม่มี | >2,000 | 1 |
| 50 | ไม่มี | 2,000 | 3 |
| 40 | ไม่มี | 2,000 | 3 |
| 20 | ไม่มี | 500 | 5 |
| 10 | ไม่มี | <250 | 7 |
| 5 | ไม่มี | <250 | 10 |

9.3 การหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

การทดสอบเพื่อหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่มีความเข้มข้นของ Nicotinamide แตกต่างกัน (0, 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$) และเติม STC ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 10 $\mu\text{g/mL}$ ทดสอบกับเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา Pyrazinamide โดยเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้น ตั้งแต่ 1, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และทำการอ่านผลทุกวันเป็นเวลา 21 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อจากการเปลี่ยนสี redox indicator (STC) จากไม่มีสีเป็นสีชมพู พบว่าชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่เติมเชื้อทดสอบปริมาณ 10^6 CFU มีการเปลี่ยนสีในหลอดอาหารทุกหลอด หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 14 วัน อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้มากกว่า 2,000 $\mu\text{g/mL}$ ชุดทดสอบที่เติมเชื้อปริมาณ 10^5 CFU พบการเปลี่ยนสีในหลอดอาหารที่มีความเข้มข้น Nicotinamide ที่ 0 และ 250 $\mu\text{g/mL}$ หลังจากบ่มเชื้อแล้ว 14 วัน มีค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 500 $\mu\text{g/mL}$ ชุดทดสอบที่เติมเชื้อปริมาณ 10^3 และ 10^4 CFU พบมีการเปลี่ยนสีในชุดทดสอบ NIC-CBMA ในหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide เท่านั้น ในระยะเวลา 14 วันหลังจากบ่มเพาะเชื้อ อ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่า 250 $\mu\text{g/mL}$ ชุดทดสอบที่เติมเชื้อปริมาณ 10^2 CFU พบมีการเปลี่ยนสีในหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide เท่านั้น ในระยะเวลา 21 วัน

ในขณะที่ปริมาณเชื้อที่ 1 และ 10 CFU ไม่สามารถอ่านค่า Nicotinamide ในการยับยั้งเชื้อได้ เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide หลังจากบ่มเพาะเชื้อแล้ว 21 วัน โดยปริมาณเชื้อทดสอบที่เหมาะสมที่สุดในชุดทดสอบ NIC-CBMA มีค่าประมาณ 10^3 ถึง 10^4 CFU ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีจนกลายเป็นสีชมพูภายในระยะเวลา 14 วันแสดงถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเป็นปริมาณเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดผลบวกลวง ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การหาปริมาณเชื้อวัณโรคที่เหมาะสมสำหรับทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

| ปริมาณเชื้อในอาหารทดสอบ (CFU) | ค่า Nicotinamide ($\mu\text{g/mL}$) | ระยะเวลาในการอ่านผล (วัน) |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| 10^6 | >2,000 | 14 |
| 10^5 | 500 | 14 |
| 10^4 | <250 | 14 |
| 10^3 | <250 | 14 |
| 10^2 | <250 | 21 |
| 10 | - | >21 |
| 1 | - | >21 |

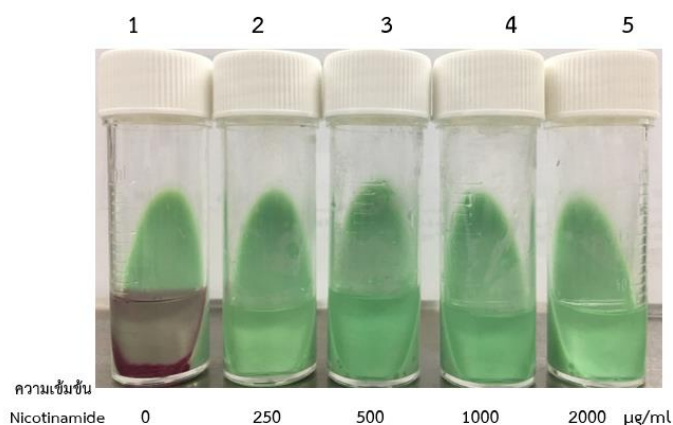
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

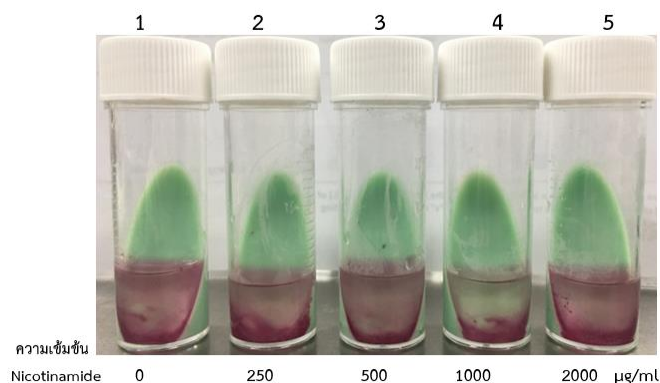
9.4 การทดสอบความไวต่อยาด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

เชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ถูกนำมาทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (PZA) ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของ STC เท่ากับ $10 \mu\text{g/mL}$ และปริมาณ AST inoculum ประมาณ 10^4 CFU โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 ที่ไวต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมลบ และเชื้อ *M. bovis* BCG ATCC 37534 ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide เป็นตัวควบคุมบวก ชุดทดสอบ NIC-CBMA ประกอบด้วย หลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide และหลอดที่ผสม Nicotinamide ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/mL}$ เมื่อเติมเชื้อทดสอบลงไปและนำไปบ่มเพาะเชื้อที่

37 องศาเซลเซียส อ่านผลทุกวันเป็นเวลา 21 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งของชุดทดสอบ และรายงานค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่าสามารถอ่านผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide จากชุดทดสอบ NIC-CBMA ได้ด้วยตาเปล่าจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และ/หรือมีโคโลนีเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง โดยมีระยะเวลาการตรวจพบ (Time to detection: TTD) อยู่ในระหว่าง 10 ถึง 20 วัน และมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 13.8 วัน พบว่าความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv น้อยกว่า 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดังภาพที่ 26 และความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อ *M. bovis* BCG ATCC 37534 มากกว่า 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ดังภาพที่ 27

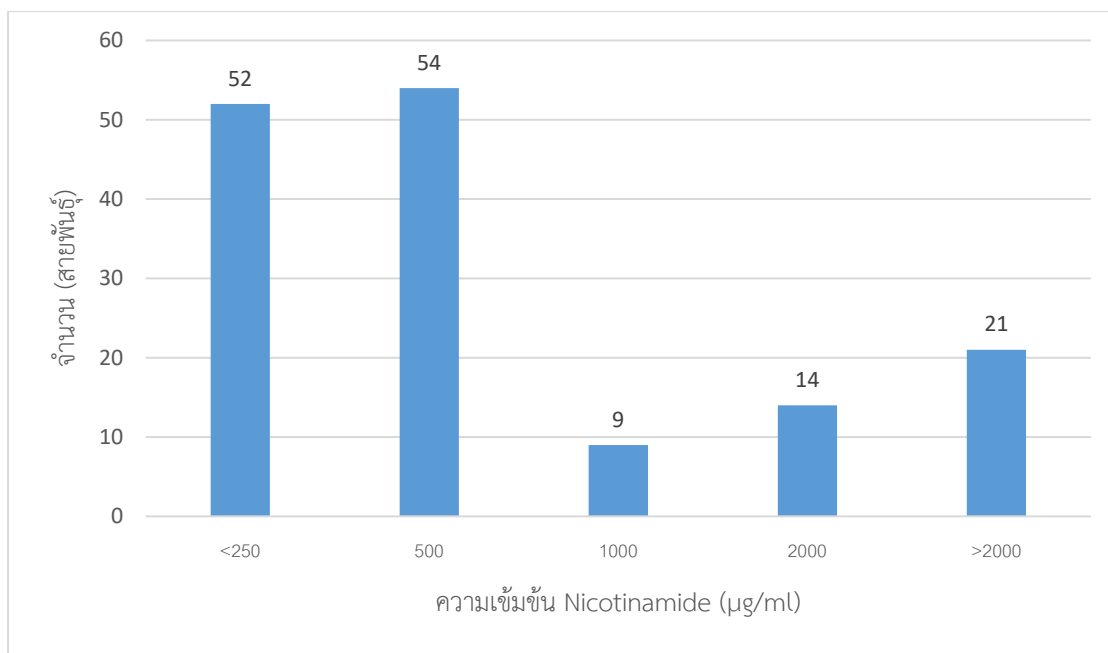


ภาพที่ 27 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ของเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน โดยหลอดที่ 1 คือหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide หลอดที่ 2 ถึง 5 คือหลอดที่มี Nicotinamide ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ



ภาพที่ 28 แสดงผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ของเชื้อ *M. bovis* BCG ATCC 37534 เมื่อป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน โดยหลอดที่ 1 คือหลอดควบคุมที่ไม่ผสม Nicotinamide หลอดที่ 2 ถึง 5 คือหลอดที่มี Nicotinamide ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL ตามลำดับ

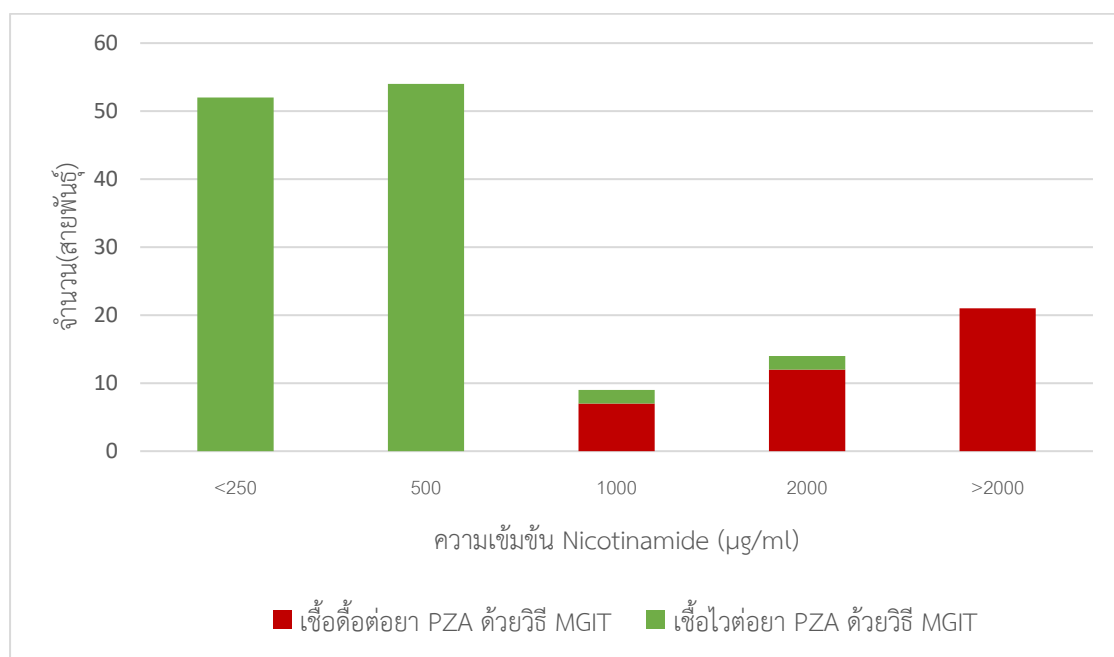
เมื่อทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA ในเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ พบเชื้อที่มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่า 250 µg/mL จำนวน 52 สายพันธุ์ (34.67% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 500 µg/mL จำนวน 54 สายพันธุ์ (36% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1,000 µg/mL จำนวน 9 สายพันธุ์ (6% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2,000 µg/mL จำนวน 14 สายพันธุ์ (9.33% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า 2,000 µg/mL จำนวน 21 สายพันธุ์ (14% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด) (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 จำนวนเชื้อ *M. tuberculosis* และค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อมีค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA โดยเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธี MGIT จำนวน 40 สายพันธุ์ มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1,000 µg/mL จำนวน 7 สายพันธุ์ (17.5% ของเชื้อดื้อยา PZA ทั้งหมด) สำหรับเชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2,000 µg/mL มีจำนวน 12 สายพันธุ์ (30% ของเชื้อดื้อยา PZA ทั้งหมด) และเชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า 2,000 µg/mL มีจำนวน 21 สายพันธุ์ (52.5% ของเชื้อดื้อยา PZA ทั้งหมด) ส่วนเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธี MGIT ทั้งหมด 110 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื่อน้อยกว่า 250 µg/mL ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ (47.27% ของเชื้อไวต่อยา PZA ทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 500 µg/mL มีจำนวน 54 สายพันธุ์ (49.09% ของ

เชื้อไวต่อยา PZA ทั้งหมด) เชื้อที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีจำนวน 2 สายพันธุ์ (1.82% ของเชื้อไวต่อยา PZA ทั้งหมด) และเชื้ออีกจำนวน 2 สายพันธุ์ (1.82% ของเชื้อไวต่อยา PZA ทั้งหมด) มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แสดงจำนวนเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน BECTEC MGIT PZA kit และความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่น้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา 110 สายพันธุ์ และเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide จำนวน 40 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ (100% ของเชื้อดื้อยา PZA ทั้งหมด) มีค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนเชื้อที่ไวต่อยา 110 สายพันธุ์ มีค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จำนวน 4 สายพันธุ์ (3.64% ของเชื้อไวต่อยา

PZA ทั้งหมด) ส่วนเชื้อไวต่อยาอีกจำนวน 106 สายพันธุ์ (96.36% ของเชื้อไวต่อยา PZA ทั้งหมด) มีค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยกว่า 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดค่าความเข้มข้นวิกฤตของ Nicotinamide มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการใช้ทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยหากเชื้อ *M. tuberculosis* ให้ค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide มากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แสดงถึงเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide และหากมีความเข้มข้นของ Nicotinamide น้อยกว่า 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แสดงถึง เชื้อไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธี NIC-CBMA

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค DNA sequencing (ตารางที่ 23) พบว่าเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA kit จำนวน 40 สายพันธุ์ มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จำนวน 7 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์เหล่านี้พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ได้แก่ A-11C, Aspartic acid12-Alanine, Tyrosine4 1 STOP, Proline6 2 -Leucine, Tyrosine103STOP และ INS-150 ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ เป็นการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบครั้งแรกในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ INS-97

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Pyrazinamide จำนวน 12 สายพันธุ์ มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ซึ่งพบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาทั้งหมด 9 สายพันธุ์ ได้แก่ A-11G, Aspartic acid12-Alanine, Threonine47-Proline, Isoleucine90-Serine, Glycine105-Valine, INS-136 (จำนวน 2 สายพันธุ์), Valine139-Leucine, INS-177 และพบการกลายพันธุ์ในยีน *rpsA* ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยาจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Aspartic acid212- Aspartic acid เป็นการกลายพันธุ์ใหม่ในยีน *pncA* 1 สายพันธุ์ ได้แก่ INS-132 และอีก 1 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD*

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Pyrazinamide อีกจำนวน 21 สายพันธุ์ มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมากกว่า 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และพบ

รูปแบบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาทั้งหมด 19 สายพันธุ์ ได้แก่ A-11C , Isoleucine90-Serine, Serine104-Arginine พบรูปแบบละ 2 สายพันธุ์ และ A-11G, Glycine24-Aspartic acid, Leucine35-Proline, Serine67-Proline, Tryptophan 68-Glycine, Cysteine72-Tyrosine, Tryptophan119-Arginine, Leucine120-Arginine, การกลายพันธุ์พร้อมกัน 2 ตำแหน่ง คือ Aspartate126-Histidine และ Aspartate129-Tyrosine, INS-136, Valine139-Alanine, Valine139-Glycine, Leucine172-Proline พบรูปแบบละ 1 สายพันธุ์ อีก 1 สายพันธุ์เป็นการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในการศึกษานี้ ได้แก่ Del-165-166 และพบกลายพันธุ์ในยีน *rpsA* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Aspartic acid212- Aspartic acid

สำหรับเชื้อที่ไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และมีผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *pncA* ด้วยเทคนิค DNA sequencing ทั้งหมด 82 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยกว่า 250 µg/mL จำนวน 37 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มีมีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Isoleucine31-Threonine และการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ ได้แก่ Aspartic acid63-Proline (จำนวน 1 สายพันธุ์) และไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จำนวน 32 สายพันธุ์

เชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Pyrazinamide ที่มีค่า Nicotinamide น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 500 µg/mL มีจำนวน 41 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จำนวน 34 สายพันธุ์ และมีมีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Isoleucine31-Threonine (จำนวน 3 สายพันธุ์) และ Valine163-Alanine (จำนวน 1 สายพันธุ์) และพบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Threonine61-Proline

นอกจากนี้พบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ไวต่อยา Pyrazinamide ที่มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 1,000 µg/mL จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งพบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Aspartic acid136-Glycine และไม่พบการกลายพันธุ์ 1 สายพันธุ์ และ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่มีค่า Nicotinamide ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเท่ากับ 2,000 µg/mL จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งพบการกลาย

พันธันยีน *pncA* ที่ยังไม่ทราบบทบาทแน่ชัด เกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide ได้แก่ Threonine61-Proline และ Phenylalanine106-Leucine

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD*

| ความไวต่อยา PZA ด้วยวิธี MGIT (จำนวนสายพันธุ์) | NIC-CBMA | | การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน <i>pncA</i> ยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> ด้วยเทคนิค DNA sequencing (จำนวนสายพันธุ์) |
|---|---------------------------------|-------|--|
| | MIC (µg/mL) (จำนวนสายพันธุ์) | % | |
| ดื้อต่อยา PZA (40) | <250 | - | - |
| | 500 | - | - |
| | 1000 (7) | 17.5 | A-11C ^R (1), D12A ^R (1), Y41STOP ^R (1), P62L ^R (1), INS-97 ^N (1), Y103STOP ^R (1), INS-150 ^R (1) |
| | 2000 (12) | 30 | A-11G ^R (1), D12A ^R (1), T47P ^R (1), I90S ^R (1), G105V ^R (1), INS-132 ^N (1), INS-136 ^R (2), V139L ^R (1), INS-177 ^R (1), wild-type(1), R212R ^{*S} (1) |
| | >2000 (21) | 52.5 | A-11C ^R (2), A-11G ^R (1), G24D ^R (1), L35P ^R (1), S67P ^R (1), W68G ^R (1), C72Y ^R (1), I90S ^R (2), S104R ^R (2), W119R ^R (1), L120R ^R (1), D126H+D129Y ^R (1), INS-136 ^R (1), V139A ^R (1), V139G ^R (1), Del165-166 ^N , L172P ^R , R212R ^{*S} (1) |
| ไวต่อยา PZA (82) | <250 (37) | 45.12 | I31T ^S (4), D63P ^N (1), wild-type (32) |
| | 500 (41) | 50 | I31T ^S (3), T61P ^I (3), V163A ^S (1), wild-type (34) |
| | 1000 (2) | 2.44 | D136G ^R (1), wild-type (1) |
| | 2000 (2) | 2.44 | T61P ^I (1), F106L ^I (1) |
| | >2000 | - | - |

*หมายเหตุ XXX^R หมายถึง การกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา, XXX^S หมายถึง การกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา, XXX^I หมายถึง การกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา, XXX^{*S} หมายถึง การกลายพันธุ์บนยีน *rpsA* ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา, wild-type หมายถึง ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA*

10. การคำนวณหาความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ(Specificity) ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value) ของ การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide

ผลจากการคำนวณความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดทดสอบ NIC-CBMA เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์คลินิก จำนวนทั้งหมด 150 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit ได้ค่าความไวของการทดสอบเท่ากับ 85.11% ความจำเพาะของการทดสอบเท่ากับ 96.12% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 90.91% ค่าทำนายผลลบเท่ากับ 93.40% (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 24 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดทดสอบ NIC-CBMA เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* เปรียบเทียบกับ วิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit

| | ดื้อต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย BACTEC MGIT960 | ไวต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย BACTEC MGIT960 | ความไว | ความจำเพาะ | ผลบวก ค่าทำนาย | ค่าทำนายผลลบ |
|--|---|---|--------|------------|-------------------|--------------|
| ดื้อต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย NIC-CBMA | 40 | 4 | 85.11% | 96.12% | 90.91% | 93.40% |
| ไวต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย NIC-CBMA | 7 | 99 | | | | |

หลังจากทำการตรวจการดื้อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA Medium โดยลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ลง เพื่อลดผลบวกหลงจากวิธีมาตรฐานพบว่ามีความไวเท่ากับ 100% ความจำเพาะเท่ากับ 96.36% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 90.91% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% ดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบของชุดทดสอบ NIC-CBMA เพื่อตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit ที่ลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ลง

| | ดื้อต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย BACTEC MGIT960 | ไวต่อยา PZA เมื่อ ตรวจด้วย BACTEC MGIT960 | ความไว | ความจำเพาะ | ผลบวก ทำนาย | ผลลบ ทำนาย |
|--|---|---|--------|------------|----------------|---------------|
| ดื้อต่อยา PZA เมื่อตรวจ ด้วย NIC-CBMA | 40 | 4 | 100% | 96.36% | 90.91% | 100 % |
| ไวต่อยา PZA เมื่อตรวจ ด้วย NIC-CBMA | 0 | 106 | | | | |

บทที่ 5

อภิป്രายและสรุปลผล

วัณโรคเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขของโลกมายาวนานกว่า 100 ปี ในปี พ.ศ. 2560 องค์การอนามัยโลกคาดประมาณว่ามีผู้ติดเชื้อรายใหม่ทั่วโลกประมาณ 10 ล้านคน และเป็น 1 ใน 10 สาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกด้วยจำนวนผู้เสียชีวิตกว่า 1.6 ล้านคน ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปแอฟริกา สำหรับประเทศไทยองค์การอนามัยโลกจัดให้อยู่ในกลุ่ม 14 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรค (TB) ปัญหาวัณโรคร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) และปัญหาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) สูง โดยคาดการณ์ว่ามีผู้ติดเชื้อรายใหม่ 108,000 รายหรือคิดเป็นอัตราอุบัติการณ์ 156 ต่อประชากรแสนคน (1) สาเหตุที่ทำให้วัณโรคยังคงมีการแพร่ระบาดนั้น เกิดจากขาดระบบการดูแลรักษาและควบคุมวัณโรคที่มีประสิทธิภาพ รวมทั้งมีการแพร่ระบาดของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistant tuberculosis: MDR-TB) มากขึ้น ซึ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาวัณโรคพร้อมกัน 2 ตัวยา ได้แก่ ยา Isoniazid และยา Rifampicin ทำให้การรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้ทำได้ยากและซับซ้อนขึ้น ต้องใช้ระยะเวลายาวนานและค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นหลายเท่า ผู้ป่วยมีโอกาสรักษาหายต่ำเพียงร้อยละ 56 (1) ดังนั้นจึงควรมีมาตรการเฝ้าระวังและควบคุมสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรคดื้อยาอย่างเคร่งครัด โดยวิธีการหนึ่ง คือการตรวจวินิจฉัยรูปแบบการดื้อยาที่รวดเร็ว น่าเชื่อถือ และครอบคลุมยารักษาวัณโรคแต่ละชนิดก่อนได้รับการรักษา เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมแก่ผู้ป่วย

การตรวจทางห้องปฏิบัติการมีบทบาทสำคัญในการช่วยวินิจฉัยและควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรคซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจเสมหะหาเชื้อติดสีทนกรด (acid fast bacilli) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเพาะเลี้ยงเชื้อ การตรวจทางอนุชีววิทยาและการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ซึ่งยารักษาวัณโรคส่วนใหญ่มีวิธีการทดสอบความไวต่อยาที่มีประสิทธิภาพ ยกเว้น ยา Pyrazinamide ซึ่งเป็นยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 (first-line drug) ที่สำคัญในการรักษาทั้งวัณโรคที่ดื้อต่อยาและไวต่อยา เนื่องจากมีคุณสมบัติ sterilizing activity คือสามารถกำจัดทั้งวัณโรคที่มีเมแทบอลิซึมตลอดเวลา และเชื้อวัณโรคที่ไม่ค่อยเจริญแบ่งตัว (dormant persister bacteria) ซึ่งไม่ตอบสนองกับยารักษาวัณโรคตัวอื่น ๆ ทำให้สามารถลดระยะเวลาของสูตรยารักษาวัณโรคจากเดิมที่ใช้เวลา 9 ถึง 12 เดือนเหลือเพียง 6 เดือนและสามารถช่วยลดโอกาสกลับมาเป็นวัณโรคซ้ำ นอกจากนี้ในปัจจุบันยา

Pyrazinamide ถูกพิจารณาให้ใช้ร่วมในสูตรยารักษาวัณโรคดื้อยาใหม่ ๆ เช่น ยา Bedaquiline ทำให้ลดระยะเวลาการรักษาวัณโรคดื้อยาเหลือเพียง 1 ปี จากเดิมใช้เวลาถึง 2 ปี (10, 13) ดังนั้นในการเลือกใช้สูตรยาที่มีประสิทธิภาพเหล่านี้ จำเป็นต้องทราบข้อมูลการดื้อยา Pyrazinamide ก่อนการรักษา แต่ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการวัณโรคไม่นิยมทำการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในงานประจำ เนื่องจากวิธีการทดสอบแบบฟีโนไทป์ (Phenotype-based PZA susceptibility) ทำได้ยุ่งยาก การทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันหรือทดสอบซ้ำ ๆ อาจให้ผลที่แตกต่างกัน ผลการทดสอบจึงมีความน่าเชื่อถือต่ำ ซึ่งมีสาเหตุมาจากสภาวะความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลต่อการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide อย่างมาก โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ของยาอยู่ที่ pH 5.5 ที่สภาวะนี้เชื้อบางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทำให้เกิดผลลบสูง ในขณะที่การใช้เชื้อปริมาณมากเกินไป (10^{7-8} ตัวต่อมิลลิลิตร) ทำให้ค่า pH เป็นต่างมากขึ้น ซึ่งสภาวะนี้ยาจะไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ทำให้เกิดผลลบสูง (10, 12) โดยเฉพาะการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit ซึ่งเป็นวิธีเดียวที่องค์การอนามัยโลกแนะนำสำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (4) เพื่อเป็นการลดข้อจำกัดของการตรวจแบบฟีโนไทป์ ในปัจจุบันจึงมีการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยา Pyrazinamide ในยีน *pncA* ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกเป็นเอนไซม์ Pyrazinamidase ทำให้ยาไม่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นรูปที่ออกฤทธิ์ได้ จากข้อมูลงานวิจัยทั่วโลก พบว่าเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide 70% ถึง 99% มีการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ ลักษณะการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นการแทนที่ของคู่เบสที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป โดยในปัจจุบันพบรูปแบบการกลายพันธุ์กว่า 600 รูปแบบ ในตำแหน่งโคดอนประมาณ 171 ตำแหน่ง (จากทั้งหมด 187 ตำแหน่ง) ตลอดทั้งยีน (16) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบการกลายพันธุ์ในยีนที่ควบคุมเป้าหมายในการออกฤทธิ์ของยา เช่น ยีน *rpsA* ถอดรหัสได้เป็น Ribosomal protein S1 (66) และยีน *panD* ถอดรหัสเป็นเอนไซม์ Aspartate alpha-decarboxylase ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง β -alanine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ Pantothenate และ Co-enzyme A (10) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของยีน *rpsA* และ *panD* ยังมีรายงานจำนวนไม่มากนัก

การศึกษาคั้งนี้ศึกษาในเชื้อวัณโรคดื้อยา (Drug resistant TB: DR-TB) ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันโรค

ทรวงอก จังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย ซึ่งผ่านการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี Absolute concentration ในตัวยา Isoniazid ยา Rifampicin ยา Ethambutol ยา Streptomycin ยา Kanamycin ยา Ofloxacin ยา Levofloxacin และยา Moxifloxacin ทำให้สามารถจำแนกเชื้อวัณโรคดื้อยาได้เป็น 1. วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multi-drug resistant TB: MDR-TB) มีจำนวน 118 สายพันธุ์ คิดเป็น 78.67% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด 2. วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (Pre-extensive drug resistant TB: Pre-XDR-TB) มีจำนวน 26 สายพันธุ์ คิดเป็น 17.33% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด 3. วัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (Extensive drug resistant TB: XDR-TB) มีจำนวน 6 สายพันธุ์ คิดเป็น 4% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด โดยมีการรายงานอุบัติการณ์ของเชื้อ Pre-XDR-TB ประมาณ 16% ถึง 49% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด และเชื้อ XDR-TB พบได้ในอัตรา 2% ถึง 11% ของเชื้อดื้อยาทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคทั่วโลก องค์การอนามัยโลกมีการคาดการณ์ว่าจะมีผู้ติดเชื้อ XDR ประมาณ 3% ถึง 5% ในผู้ติดเชื้อดื้อยาทั้งหมด (1) ในขณะที่การรายงานสถานการณ์วัณโรคดื้อยาในประเทศไทยโดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2559 พบผู้ติดเชื้อ XDR-TB เพียง 1.26% ของผู้ติดเชื้อดื้อยาทั้งหมด ซึ่งการรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อที่ต่ำกว่าความเป็นจริงนั้นอาจมีสาเหตุมาจากโรงพยาบาลส่วนใหญ่ยังขาดศักยภาพทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา และหลายแห่งไม่ได้ส่งตรวจมายังห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ หรือ กองวัณโรคในสังกัดกรมควบคุมโรค อีกทั้งระบบบันทึกและรายงานผลการดื้อยาอย่างไม่ครอบคลุมในทุกโรงพยาบาล อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ใช้เฉพาะเชื้อวัณโรคที่เพาะได้จากเสมหะผู้ป่วยในสถาบันโรคทรวงอก จังหวัดนนทบุรีเท่านั้น ผลของจำนวนสัดส่วนเชื้อดื้อยาชนิดต่าง ๆ ที่คำนวณได้จากการศึกษานี้ จึงไม่สามารถอธิบายอัตราความชุกของเชื้อดื้อยาที่เกิดขึ้นจริงในประเทศไทยได้

เมื่อทำการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 PZA Kit ซึ่งเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว pH 5.9 ที่มียา Pyrazinamide ความเข้มข้น 100 µg/mL ผสมอยู่ หากเชื้อดื้อต่อยาและเจริญเติบโตได้ ออกซิเจนจะถูกนำไปใช้ ส่งผลให้สารฟลูออเรสเซนต์ที่กั้นหลอดหลุดออกมาเป็นอิสระและสามารถตรวจวัดการเปล่งแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต โดยทดสอบในเชื้อวัณโรคดื้อยา (DR-TB) ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide (PZA^R) จำนวน 47 สายพันธุ์ คิดเป็น 31.33% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด แบ่งเป็นเชื้อ MDR-TB จำนวน 31 สายพันธุ์ (26.27 % ของเชื้อ MDR-TB ทั้งหมด) เชื้อ Pre-XDR-TB จำนวน 12 สายพันธุ์ (46.15%

ของเชื้อ Pre-XDR-TB ทั้งหมด) และเชื้อ XDR-TB จำนวน 4 สายพันธุ์ (66.67 % ของเชื้อ XDR-TB ทั้งหมด) และเชื้ออีก 103 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide (PZA^S) คิดเป็น 68.67% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด ซึ่งเห็นได้ว่าการดื้อต่อยา Pyrazinamide มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อวัณโรคดื้อยา โดยพบอัตราการดื้อต่อยานี้มากขึ้นในเชื้อดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทบทวนวรรณกรรมของ Chang และคณะ ที่รายงานว่าความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide มีความสัมพันธ์กับเชื้อวัณโรคดื้อยา (DR-TB) โดยพบอัตราการดื้อยา Pyrazinamide ในเชื้อวัณโรคดื้อยาเฉลี่ยอยู่ที่ 51% (พบได้ในอัตรา 31% ถึง 89% ขึ้นอยู่กับแต่ละภูมิภาค) ในขณะที่เชื้อวัณโรคไวต่อยา (DS-TB) สามารถพบการดื้อยา Pyrazinamide ได้น้อยกว่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5% (พบได้ตั้งแต่ 0% ถึง 9% ของเชื้อที่ไวต่อยา) (13) สำหรับในประเทศไทย พบการศึกษาหาความชุกของการดื้อยา Pyrazinamide เพียง 1 การศึกษาจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โดยทำการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในเชื้อวัณโรคจำนวน 150 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อยา (DS-TB) จำนวน 50 สายพันธุ์และเชื้อดื้อยา (MDR-TB) จำนวน 100 สายพันธุ์ พบอัตราการดื้อยา Pyrazinamide 6% ในเชื้อที่ไวต่อยาและ 49% ในเชื้อดื้อยา (76) ซึ่งเห็นได้ว่าการดื้อต่อยา Pyrazinamide พบมากขึ้นในเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ดังนั้นในภูมิภาคที่มีการระบาดของเชื้อดื้อยาสูง ควรมีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยทุกราย เพื่อให้แพทย์ใช้เป็นข้อมูลในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide แบบจีโนไทป์โดยการตรวจหาคำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ด้วยเทคนิค DNA sequencing ซึ่งมีความไวประมาณ 83% ถึง 90% และความจำเพาะประมาณ 97% ถึง 100% เมื่อเทียบกับวิธีอ้างอิง BACTEC MGIT 960 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากลดข้อจำกัดของการตรวจแบบฟีโนไทป์ที่เกิดผลลบลวงจากสภาวะกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการออกฤทธิ์ของยาแต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อบางสายพันธุ์ และผลลบลวงจากการทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 อีกทั้งให้ผลการทดสอบที่รวดเร็วภายใน 1 ถึง 2 วัน (13) ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *pncA* ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 122 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (PZA^R) 47 สายพันธุ์ และเชื้อที่ไวต่อยา (PZA^S) 75 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่าเชื้อ PZA^R มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็น 80.85% ของเชื้อ PZA^R ทั้งหมด สอดคล้องกับ

งานวิจัยจากทั่วโลกที่รายงานพบการกลายพันธุ์บริเวณยีนนี้ 70% ถึง 99% ในเชื้อ PZA^R สำหรับเชื้อ PZA^S พบการกลายพันธุ์จำนวน 14 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.67% ของเชื้อ PZA^S ทั้งหมด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยจากทั่วโลกที่รายงานพบการกลายพันธุ์ในเชื้อ PZA^S ประมาณ 9% ถึง 22.2% (16) และจากการศึกษาในประเทศไทยโดย Jonmalung และคณะ พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ในเชื้อ PZA^S 17.65% และ 77.55% ในเชื้อ PZA^R (76)

โดยเชื้อ MDR-TB มีอัตราการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* 36.46% (พบการกลายพันธุ์ใน MDR-TB จำนวน 35 สายพันธุ์จาก 96 สายพันธุ์) เชื้อ Pre-XDR-TB มีอัตราการกลายพันธุ์ 63.67% (พบการกลายพันธุ์ใน Pre-XDR-TB จำนวน 14 สายพันธุ์จาก 22 สายพันธุ์) และในเชื้อ XDR-TB พบอัตราการกลายพันธุ์ 75% (พบการกลายพันธุ์ใน XDR-TB จำนวน 3 สายพันธุ์จาก 4 สายพันธุ์) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความชุกของการการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* พบมากขึ้นในเชื้อวัณโรคที่หายากหลายขนาน เชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อ PZA^R จำนวน 38 สายพันธุ์และ PZA^S จำนวน 14 สายพันธุ์ พบว่ามีการกลายพันธุ์แบบการแทนที่ของเบสตำแหน่งเดียวที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป (Nonsynonymous mutations) มากที่สุดมีทั้งหมด 36 สายพันธุ์ (69.23% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) รองลงมาคือการกลายพันธุ์แบบ Frameshift mutation ซึ่งเกิดจากการแทรกเข้าและขาดหายไปของเบส (Insertion/Deletion) พบจำนวน 8 สายพันธุ์ (15.38% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์บริเวณ Promoter พบจำนวน 5 สายพันธุ์ (9.62% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) การกลายพันธุ์แบบ Nonsense mutation พบจำนวน 2 สายพันธุ์ (3.85% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) และการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง (Double mutation) พบจำนวน 1 สายพันธุ์ (1.92% ของเชื้อวัณโรคที่มีการกลายพันธุ์) ซึ่งจากรายงานการทบทวนวรรณกรรมของ Ramirez และคณะที่รวบรวมรูปแบบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* จากการศึกษาทั่วโลก พบว่ารูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อ PZA^R ส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์แบบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตัวในจีโนมตำแหน่ง (single-nucleotide polymorphism) ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป พบได้ 79% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่พบรองลงมาคือ การแทรกเข้าและขาดหายไปของเบส (Insertion/Deletion) พบได้ประมาณ 16% และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Promotor พบได้ประมาณ 3.4% ของเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์ (9)

เชื้อวัณโรคทั้งหมด 52 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* พบรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 34 แบบ แบ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide จำนวน 26 แบบ (76.47% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ทั้งหมด) โดยพบในเชื้อ PZA^S 1 แบบ ได้แก่ Aspartic acid136-Glycine จำนวน 1 สายพันธุ์ และอีก 25 แบบ พบในเชื้อ PZA^R จำนวน 33 สายพันธุ์ ได้แก่ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Promotor -11 มีเบส Adenine เปลี่ยนเป็นเบส Cytosine จำนวน 3 สายพันธุ์ การแทนที่เบส Adenine เป็นเบส Guanine ที่ตำแหน่ง Promotor -11 จำนวน 2 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์แบบ Isoleucine90-Serine จำนวน 3 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์แบบ Frameshift ดังนี้ การแทรกเข้ามาของเบส Cytosine ที่โคดอน 136 จำนวน 3 สายพันธุ์ การแทรกเข้ามาของเบส Thymine และ Guanine ที่โคดอน 150 และการแทรกเข้ามาของเบส Guanine และ Cytosine ที่โคดอน 177 จำนวน 1 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 139 ดังนี้ Valine139-Glycine, Valine139-Alanine และ Valine139-Leucine อย่างละ 1 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์แบบ Aspartic acid12-Alanine และ Serine104-Arginine อย่างละ 2 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์แบบ Glycine24-Aspartic acid, Leucine35-Proline, Threonine47-Proline, Proline62-Leucine, Serine67-Proline, Tryptophan 6 8 - Glycine, Cysteine7 2 -Tyrosine, Glycine105-Valine, Tryptophan119-Arginine, Leucine120-Arginine, Leucine172-Proline อย่างละ 1 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์แบบ Tyrosine104STOP codon และ Tyrosine103STOP codon อย่างละ 1 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์พร้อมกัน 2 ตำแหน่ง คือ Aspartate126-Histidine และ Aspartate129-Tyrosine จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยการกลายพันธุ์ทั้ง 26 แบบนี้จากข้อมูลของงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide (17, 18, 77-79) และจากการศึกษาของ Miotto และคณะ ที่ศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ในเชื้อวัณโรคจำนวน 1,950 สายพันธุ์ ได้รายงานว่า การกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาส่วนใหญ่ (70% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ในเชื้อ PZA^R) จะพบในบริเวณ promoter -13 ถึง -3 ตำแหน่งโคดอน 6 ถึง 15 โคดอน 50 ถึง 70 โคดอน 90 ถึง 100 โคดอน 130 ถึง 145 และโคดอน 170 ถึง 175 (18) ซึ่งการศึกษานี้พบว่าเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* อยู่ในตำแหน่งดังกล่าวจำนวน 14 แบบ (50 % ของรูปแบบการกลายพันธุ์ในเชื้อ PZA^R) และอีก 14 แบบพบอยู่นอกเหนือบริเวณดังกล่าว และจากการศึกษาของ Petrella และคณะ รายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ส่งผลต่อตำแหน่งกัมมันต์หรือตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ Pyrazinamidase ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน Cysteine138, Aspartic

acid8, และ Lysine96 และบริเวณ metal ion binding sites ได้แก่ ตำแหน่งโคดอน Aspartic acid49, Histidine51, Histidine57 และ Histidine71 ซึ่งการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณ ตำแหน่งโคดอน 3 ถึง 12 โคดอน 46 ถึง 62 โคดอน 68 ถึง 85 โคดอน 94 ถึง 103 และโคดอน 132 ถึง 142 (80) ซึ่งการศึกษาพบว่าเชื้อ PZA^R ที่มีการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* อยู่ในตำแหน่งดังกล่าว จำนวน 12 แบบ (42.86% ของรูปแบบการกลายพันธุ์ในเชื้อ PZA^R) และอีก 16 แบบพบอยู่นอกเหนือบริเวณดังกล่าว ซึ่งการกระจายของตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเชื้อวัณโรคในแต่ละภูมิภาค ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบการกลายพันธุ์จำนวน 2 แบบที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide จากการรายงานของงานวิจัยก่อนหน้า (18, 81) ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ Valine163-Alanine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ และการกลายพันธุ์แบบ Isoleucine31-Threonine พบจำนวน 7 สายพันธุ์ โดยพบในเชื้อ PZA^S จำนวน 6 สายพันธุ์ และ PZA^R จำนวน 1 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Jonmalung และคณะที่ทำการทดลองในเชื้อวัณโรคดื้อยาในประเทศไทยและพบการกลายพันธุ์ Isoleucine31-Threonine ในเชื้อ PZA^R จำนวน 1 สายพันธุ์ และเชื้อ PZA^S จำนวน 9 สายพันธุ์ (76) ดังนั้นการกลายพันธุ์แบบ Isoleucine31-Threonine อาจไม่มีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide และอาจเป็นสายพันธุ์ที่มีการระบาดในประเทศไทยจากเชื้อวัณโรคต้นกำเนิดเดียวกัน (clonal expansion)

นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide จำนวน 2 แบบ ซึ่งพบในเชื้อ PZA^S จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ Threonine61-Proline พบจำนวน 4 สายพันธุ์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Cancino และคณะที่ทำการวิเคราะห์ Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ที่สัมพันธ์กับลักษณะการดื้อต่อยา Pyrazinamide พบว่าการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์ต่อการดื้อยาในระดับต่ำ (82) และการกลายพันธุ์แบบ Phenylalanine106-Leucine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ ซึ่งจากการศึกษาของ Zignol และคณะ ที่ทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Gene sequencing และเปรียบเทียบกับการดื้อยาแบบฟีโนไทป์ พบว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มที่ไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาได้ (Indeterminate) (83) สำหรับการกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในการศึกษานี้มีจำนวน 4 แบบ โดยพบในเชื้อ PZA^S 1 แบบ คือ Aspartic acid63-Proline จำนวน 1 สายพันธุ์ และ พบในเชื้อ PZA^R อีก 3 แบบ ดังนี้ การแทรกเข้ามาของเบส Thymine ที่โคดอน 97 จำนวน 1 สายพันธุ์ การขาดหายของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 493 ถึง 496 ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Frameshift โคดอนที่ 165

จำนวน 1 สายพันธุ์ การแทรกเข้ามาของเบส Cytosine ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Frameshift ที่โคดอน 132 จำนวน 1 สายพันธุ์ ซึ่งจากการค้นหาข้อมูลไม่พบรายงานการกลายพันธุ์เหล่านี้ จึงจำเป็นต้องศึกษาถึงความสัมพันธ์เกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide ต่อไป

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide แบบฟีโนไทป์ ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 และการตรวจหาการดื้อยาแบบจีโนไทป์ด้วยวิธี *pncA* gene sequencing พบว่าเชื้อวัณโรคจำนวน 10 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide (21.28% ของเชื้อ PZA^R ทั้งหมด) แบ่งเป็นเชื้อที่ไม่พบการกลายพันธุ์ (wild-type) จำนวน 9 สายพันธุ์และอีกจำนวน 1 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา ได้แก่ Isoleucine31-Threonine ซึ่งจากการศึกษาของ Ramirez-Busby และคณะ (9) พบว่าเชื้อ PZA^R ประมาณ 18% จะไม่พบการกลายพันธุ์ในยีนนี้ ซึ่งสาเหตุของผลการทดสอบที่ไม่สอดคล้องนี้อาจมีสาเหตุมาจาก 1. ผลการแสดงผลของฟีโนไทป์ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ดื้อยาอาจเกิดจากกลไกอื่นนอกเหนือจากการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* เช่น การเกิดขั้วยาออกจากเซลล์ ซึ่ง Zhang และคณะ (84) ได้ทำการทดสอบพบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับเติมสารต้านการขับยา จะส่งผลให้เชื้อมีความไวต่อยามากขึ้น ในขณะที่เมื่อทำให้มีการแสดงออกในยีนที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขับยา มากขึ้น ก็ส่งผลให้เชื้อวัณโรคมีการดื้อยาในระดับต่ำ หรือเกิดการกลายพันธุ์ในยีนอื่นที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา เช่น ยีน *rpsA* และ ยีน *panD* เป็นต้น (12) 2. มีสาเหตุจากผลการทดสอบแบบฟีโนไทป์ที่มีความน่าเชื่อถือต่ำและการใช้ค่า MIC cutoff ที่ต่ำเกินไป ซึ่งมีหลายการศึกษาได้รายงานพบผลบวกลงที่เกิดจากการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ว่ามีประมาณ 22% ในเชื้อ PZA^R และเพื่อลดผลการทดสอบที่ผิดพลาดนี้จึงมีคำแนะนำให้เพิ่มค่า MIC cut-off สำหรับการวินิจฉัยเชื้อดื้อยาเป็น 128, 200 หรือ 300 µg/mL จากเดิมที่ใช้ค่า MIC cut-off ที่ 100 µg/mL หรือลดปริมาณเชื้อทดสอบ AST inoculum ลง เนื่องจากมีรายงานว่าการใช้เชื้อปริมาณมากในการทดสอบความไวต่อยาทำให้ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต่างมากขึ้น ซึ่งสภาวะนี้ยาจะไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ (73) การศึกษานี้จึงทำการทดสอบความไวต่อยาซ้ำโดยลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ลงครึ่งหนึ่งจากเดิมใช้เชื้อปริมาณ 500 ไมโครลิตร เหลือเพียง 250 ไมโครลิตร โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของ Piersimoni และคณะ(72) ในสายพันธุ์ที่มีผลคือดื้อยา Pyrazinamide แต่ตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* หรือพบการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา จำนวนทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ซึ่งพบว่าเชื้อจำนวน 7 สายพันธุ์ มีผลการทดสอบความไวต่อยา

เปลี่ยนเป็น PZA^S และอีกจำนวน 3 สายพันธุ์มีผลการทดสอบความไวต่อยาเหมือนเดิม ทำให้ลดผลบวกลงจาก 21.28% เหลือเพียง 6.38% ในเชื้อ PZA^R สอดคล้องกับการศึกษาของ Morlock และคณะที่รายงานว่า การลดปริมาณเชื้อ AST inoculum ลงสามารถลดการเกิดผลบวกจากวิธี BACTEC MGIT 960 จาก 21.1% เหลือเพียง 5.7% ในเชื้อ PZA^R (73)

เชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide แต่ไม่พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ถูกนำมาหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *rpsA* และ ยีน *panD* ด้วยเทคนิค Gene sequencing พบว่ามีเชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์บนยีน *rpsA* แบบการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงหนึ่งตำแหน่งแต่กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง (Synonymous mutation) ที่โคดอน 212 ซึ่งมีการรายงานว่า การกลายพันธุ์แบบ Arginine212- Arginine สามารถพบได้ทั้งเชื้อที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide จึงเป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา แม้ว่ามีหลายการศึกษาที่รายงานพบการกลายพันธุ์ในยีน *rpsA* ในเชื้อ PZA^R ที่อาจส่งผลต่อการดื้อยา เช่น ตำแหน่ง Glutamic acid433, Alanine438 และ Arginine474 อย่างไรก็ตามพบอัตราการกลายพันธุ์ในระดับต่ำเพียง 1 ใน 10 ของเชื้อ PZA^R ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* (66) ดังนั้นการใช้ยีน *rpsA* เป็นเครื่องหมายในการหาเชื้อที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide อาจไม่มีประโยชน์มากนัก เนื่องจากพบอัตราการกลายพันธุ์ต่ำและยีนมีขนาดใหญ่ ต้องทำการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 3 ถึง 5 ชิ้นเพื่อให้ครอบคลุมยีนทั้งหมด ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้ในงานประจำวันได้ยากและไม่คุ้มทุน เช่นเดียวกับการหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *panD* ที่มีอัตราการค้นพบต่ำประมาณ 2.87% ในเชื้อ PZA^R ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* (9) และหลายการศึกษาในปัจจุบันไม่แนะนำให้ใช้ยีน *rpsA* และยีน *panD* เป็นเครื่องหมายสำหรับการวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide เนื่องจากยังไม่ทราบความสัมพันธ์ที่แน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยาและพบอัตราการกลายพันธุ์ในระดับต่ำ (85)

แม้ว่ามีการศึกษาที่ยืนยันถึงผลการรักษาสำเร็จสูงขึ้นในผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานที่ได้รับการวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide และปรับสูตรยาก่อนการรักษา โดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่มคือ Z^R-MDR-TB และ Z^S-MDR-TB พบว่าผู้ป่วย Z^S-MDR-TB สามารถใช้สูตรยารักษาวัณโรคเพียง 9 เดือนจากสูตรเดิมที่ใช้เวลาในการรักษาถึง 2 ปี และหากเป็นเชื้อดื้อยาหลายขนานที่ดื้อต่อยา Pyrazinamide (Z^R-MDR-TB) มักให้ผลการรักษาไม่ดีขึ้น ผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide จึงมีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน แต่ในปัจจุบันพบว่าห้องปฏิบัติการวัณโรคจากทั่วโลกไม่นิยมทำการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในงานประจำ

จึงพบการรายงานการดื้อต่อยา Pyrazinamide ไม่มากนัก และไม่ถูกบรรจุอยู่ในการประเมินคุณภาพวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (External quality assessment: EQA) เนื่องจากวิธีการทดสอบความไวต่อยาขาดประสิทธิภาพ การทดสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกันหรือทดสอบซ้ำ ๆ อาจให้ผลที่ไม่เหมือนกัน ผลการทดสอบจึงมีความน่าเชื่อถือต่ำ วิธีการทดสอบที่น่าเชื่อถือที่สุด คือ การทดสอบด้วยวิธี radiometric susceptibility โดยเครื่องเพาะเชื้อกึ่งอัตโนมัติ BACTEC 460TB ในการตรวจหาการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มียาเข้มข้น 100 µg/mL ที่ pH 6.0 แต่มีข้อจำกัดคือ ความยุ่งยากในการทำละลายสารกัมมันตรังสีหลังการทดสอบ วิธีนี้จึงไม่นิยมใช้ในปัจจุบัน (11) (13) เครื่องอัตโนมัติ BACTEC MGIT 960 System ถูกนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานแทนโดยใช้หลักการตรวจวัดการเปล่งแสงของสารฟลูออเรสเซนต์ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตเมื่อเชื้อเจริญเติบโตและมีการใช้ออกซิเจน อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง อีกทั้งมีการรายงานผลบวกสูง จากการเติมเชื้อปริมาณมากในการทดสอบ ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต่างมากขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมกับสภาวะออกฤทธิ์ของยา (13) การตรวจทางอนุชีววิทยาโดยตรวจการละลายพันธู์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *pnca* ได้รับการยืนยันว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ สามารถตรวจการดื้อยาที่มาจากกลไกเดียวเท่านั้น และยังไม่มีฐานข้อมูลในการแปลผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ การพัฒนาการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในปัจจุบันยังคงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยมีหลายการศึกษาที่พัฒนาการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ขึ้นเอง เรียกว่า non-commercial methods เพื่อให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าและลดข้อจำกัดของวิธีมาตรฐาน โดยที่ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น ทำการทดสอบในอาหาร Löwenstein-Jensen (LJ) หรือ Middlebrook 7H10/11 agar โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มี pH 5.5 อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อวัณโรค 20% ถึง 25% ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะนี้ ทำให้เกิดผลลบสูง (4) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวการทดสอบความไวต่อยาโดยใช้ Nicotinamide ซึ่งเป็นสารที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวบ่งชี้แทน (surrogate marker) ยา Pyrazinamide ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทดสอบความไวต่อยามากขึ้น โดยสารนี้สามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ออกฤทธิ์ Nicotinic acid ด้วยเอนไซม์ Pyrazinamidase/Nicotinamidase ในสภาวะ pH 6.8 ถึง 8.0 จึงไม่จำเป็นต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสภาวะกรด ซึ่งสาร Nicotinamide นี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ในหลายวิธี

เช่น วิธี Resazurin microtiter assay (REMA) ให้ความไวเท่ากับ 100% และความจำเพาะเท่ากับ 98% (23) เป็นต้น

การศึกษานี้ได้พัฒนาชุดทดสอบสำหรับการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide โดยใช้ Nicotinamide ผสมในอาหารทดสอบชนิด colorimetric biphasic medium (Nicotinamide Colorimetric Biphasic Medium Assay: NIC-CBMA) อ้างอิงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ biphasic medium ที่พัฒนาโดย Cui และคณะ ซึ่งเป็นอาหารผสมระหว่างอาหารชนิดแข็ง LJ medium ที่ใช้เป็นฐาน (slant) และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Middlebrook 7H9 medium ที่ใช้เป็นส่วนบน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค เนื่องจากเชื้อวัณโรคบางสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ผสมไข่หรืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น (22) นอกจากนี้มีการเติมสาร colorimetric redox indicator สำหรับตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ สาร 2,3,5-diphenyl tetrazolium chloride (STC) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเท่ากับ 10 µg/mL ทำให้สามารถอ่านผลได้เร็วยิ่งขึ้น โดยใช้ Nicotinamide ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 250, 500, 1,000 และ 2,000 µg/mL จากการทดสอบในเชื้อวัณโรคทั้งหมด 150 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะของผลการทดสอบด้วยชุด NIC-CBMA สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า เมื่อมีเชื้อเจริญเติบโตจะพบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากไม่มีสีเป็นสีชมพูและ/หรือมีโคโลนีเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง โดยมีระยะเวลาการตรวจพบ (Time to detection: TTD) อยู่ระหว่าง 10 ถึง 20 วัน และมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 13.8 วัน ซึ่งเร็วกว่าการทดสอบด้วยวิธีมาตรฐานแบบ Agar proportion ที่ใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 4 สัปดาห์ เนื่องจากการใช้สาร STC เป็นตัวช่วยสำหรับตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ชุดทดสอบ NIC-CBMA เป็น Biphasic media ที่ผสมระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LJ medium และอาหารเหลว Middlebrook 7H9 medium ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคได้ดีกว่า จากการศึกษาของ Gonzalo และคณะ ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด biphasic media ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide พบว่ามีระยะเวลาการตรวจพบที่ 14 ถึง 21 วัน (49) ซึ่งช้ากว่าวิธี BACTEC MGIT 960 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 8 ถึง 10 วัน เนื่องมาจากวิธี BACTEC MGIT เป็นเครื่องตรวจหาการเจริญเติบโตของเชื้อแบบอัตโนมัติที่ทำการตรวจวัดทุก ๆ 60 นาที แต่ชุดทดสอบ NIC-CBMA มีข้อดีกว่า BACTEC MGIT 960 เนื่องจากใช้ Nicotinamide ในการทดสอบแทน Pyrazinamide จึงลดการเกิดผลลบลปลอมจากสภาวะการทดสอบที่เป็นกรดและผลบวกปลอมจากสภาวะที่เป็นด่าง

เนื่องจากปริมาณเชื้อที่มากเกินไป สอดคล้องกับงานวิจัยของ Martin และคณะ (23) ทำการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี REMA และกำหนดค่า Nicotinamide มากกว่า 250 µg/mL ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา Pyrazinamide มีความไวและความจำเพาะ 100% และ 98% ตามลำดับ และพบว่าเชื้อ จำนวน 8 สายพันธุ์ให้ผลบวกด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 นอกจากนี้ ชุดทดสอบ NIC-CBMA ยังสามารถจำแนกการปนเปื้อนที่มีสาเหตุมาจากเชื้อที่ไม่ใช่มัคโคแบคทีเรีย (non-mycobacteria) และเชื้อรา โดยพบว่าเมื่อมีการปนเปื้อนเชื้อเหล่านี้จะทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเปลี่ยนจากสีเขียว-เหลือง เป็นสีเขียวมรกต ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีความขุ่นขึ้น และเมื่อเขย่าจะพบว่าอาหารแข็งจะเหลวและเน่าในที่สุด ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Agar proportion หรือ Broth microdilution รวมทั้ง BACTEC 460TB หรือ BACTEC MGIT 960 System ที่ไม่สามารถแยกการปนเปื้อนของเชื้อที่ไม่ใช่มัคโคแบคทีเรีย (non-mycobacteria) ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามชุดทดสอบนี้ไม่สามารถจำแนกการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มมัคโคแบคทีเรียได้ จึงอาจทำให้เกิดผลบวกหากมีเชื้อในกลุ่มมัคโคแบคทีเรียอื่นเจริญปนอยู่กับเชื้อวัณโรค จึงแนะนำให้มีการเพิ่มหลอดทดสอบที่ผสมสาร rho-nitrobenzoic acid (PNB) ในการใช้เป็นหลอดควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น ซึ่งหลอดทดสอบนี้ไม่ควรมีการเปลี่ยนแปลงสีเนื่องจากเชื้อวัณโรคไม่สามารถเจริญในอาหารที่ผสมสารนี้ (86) นอกจากนี้การทดสอบด้วยชุด NIC-CBMA ยังสามารถป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อได้ เนื่องจากใช้สาร STC ที่มีความคงตัวสูง จึงสามารถเติมสารนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนนำไปบ่มเพาะเชื้อได้ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่นิยมนำสาร redox indicator ที่ไม่คงตัว เช่น วิธี Resazurin microtiter assay (REMA) ที่ใช้สาร Resazurin เป็น redox indicator และวิธี Microplate tetrazolium reduction assay ที่ใช้สาร MTT เป็น redox indicator ทำให้การทดสอบด้วยวิธีเหล่านี้ต้องมีขั้นตอนการเติมสาร redox indicator หลังจากขั้นตอนการบ่มเชื้อไปแล้ว 7 ถึง 10 วัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของเชื้อวัณโรคจากการเปิดหรือปิดฝา

เมื่อพิจารณาผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อวัณโรคโดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit ของเชื้อ *M. tuberculosis* ทั้งหมด 150 สายพันธุ์ แบ่งเป็นสายพันธุ์ PZA^S จำนวน 110 สายพันธุ์ และเชื้อ PZA^R จำนวน 40 สายพันธุ์ โดยกำหนดค่าของ Nicotinamide ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 µg/mL เป็นค่าความเข้มข้นวิกฤตในการวินิจฉัยเชื้อที่ดื้อยา

Pyrazinamide พบว่ามีค่าความถูกต้อง (Accuracy) ของชุดทดสอบที่ 97.33% เมื่อเทียบกับวิธี BACTEC MGIT 960 เชื้อ PZA^R จำนวน 40 สายพันธุ์มีผลติดต่อยาเมื่อทดสอบด้วยวิธี NIC-CBMA ทั้งหมด อย่างไรก็ตามในจำนวนนี้มีเชื้อจำนวน 3 สายพันธุ์ที่ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* ซึ่งผลที่ไม่สอดคล้องระหว่างการทดสอบด้วยวิธีพีไนโทปและจีไนโทปนี้อาจมีสาเหตุมาจากเชื้อเกิดการดื้อยาจากกลไกอื่น ๆ เช่น การขับยาออก (efflux pump) หรือกลไกที่ยังไม่ทราบสาเหตุ ในขณะที่เชื้อ PZA^S เมื่อทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 จำนวน 110 สายพันธุ์ มีผลไวต่อยาเมื่อทดสอบด้วยวิธี NIC-CBMA จำนวน 106 สายพันธุ์ และเชื้อ PZA^S อีกจำนวน 4 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบติดต่อยาเมื่อทดสอบด้วยวิธี NIC-CBMA ในจำนวนนี้พบว่าเชื้อจำนวน 2 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์แบบไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา เชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA* และเชื้ออีกจำนวน 1 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์บนยีน *pncA* ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา ซึ่งสาเหตุของผลที่ไม่สอดคล้องระหว่างการตรวจด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 และวิธี NIC-CBMA นั้นอาจมีสาเหตุมาจาก 1. ผลลบลวงของการตรวจด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ซึ่งมีการรายงานว่าเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Middlebrook 7H9 medium ที่ pH 5.9 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรคได้ 2. ผลบวกลวงจากการทดสอบด้วยวิธี NIC-CBMA ที่อาจเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อกลุ่มมัคโคแบคทีเรียชนิดอื่น หรือความผิดพลาดที่เกิดจากการใช้ชุดทดสอบแบบ non-commercial methods ที่มีแนวโน้มเกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากยังขาดการวางมาตรฐาน (87) จึงควรมีการทดสอบซ้ำในเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องต่อไป

ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะที่สูงในการตรวจวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA kit และให้ผลที่สอดคล้องกับการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค DNA sequencing ในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 100% ความจำเพาะเท่ากับ 96.36% จากงานวิจัยของ Hu และคณะ ได้ทำการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิค Microplate Alamar Blue assay (MABA) ใช้ Nicotinamide ความเข้มข้น 8 ถึง 2,000 µg/mL โดยทำการทดสอบในเชื้อวัณโรคจำนวน 125 สายพันธุ์ และกำหนดค่าความเข้มข้นของ Nicotinamide ที่มากกว่า 500 µg/mL เป็นค่า MIC cut-off สำหรับวินิจฉัยเชื้อดื้อต่อยา Pyrazinamide ได้ค่าความไวเท่ากับ 100% ความจำเพาะเท่ากับ 95.2% (70) และการศึกษาของ Martin และคณะที่พัฒนาเทคนิค Nitrate

reductase assay ในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ใช้ค่า MIC cut-off ของ Nicotinamide มากกว่า 500 µg/mL ในการวินิจฉัยเชื้อดื้อยา Pyrazinamide โดยทำการทดสอบในเชื้อวัณโรคทั้งหมด 34 สายพันธุ์ มีค่าความไวเท่ากับ 91% ความจำเพาะเท่ากับ 94% เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 (88) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีข้างต้นมีความยุ่งยากในการทดสอบ เนื่องจากต้องมีการเติมสารสำหรับการตรวจวัดการเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากบ่มเชื้อแล้วประมาณหนึ่งสัปดาห์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการฟุ้งกระจายของเชื้อจากการเปิดและปิดฝาได้

ในการสืบค้นข้อมูลวิธีการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยเทคนิคต่าง ๆ มีการกำหนดค่า MIC cut-off ของ Nicotinamide ที่แตกต่างกัน (250 ถึง 1,000 µg/mL) ซึ่งส่วนใหญ่กำหนดค่า MIC cut-off ของ Nicotinamide มากกว่า 500 µg/mL ในการจำแนกเชื้อวัณโรคที่ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide โดยการกำหนดค่า MIC cut-off ที่แตกต่างกันอาจขึ้นอยู่กับความแตกต่างในสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคที่ใช้ทดสอบในแต่ละภูมิภาค ดังนั้นในการกำหนดค่า MIC cut-off ของ Nicotinamide ที่เหมาะสมที่สุดในการใช้ทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ควรทำการวิจัยแบบพหุสถาบัน (Multicenter Study) กับเชื้อวัณโรคด้วยจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น เพื่อสะท้อนถึงค่า MIC cut-off ในการใช้แยกเชื้อที่ดื้อและไวต่อยาที่แท้จริง ส่งผลให้การวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะมีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบผลทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี NIC-CBMA กับผลของวิธี BACTEC MGIT 960 ที่ยังไม่ได้ปรับแก้ไขผลบวกลงนั้น พบว่ามีความไวของการทดสอบเท่ากับ 85.11% ความจำเพาะของการทดสอบเท่ากับ 96.12% ทั้งนี้ค่าความไวที่ลดลงเป็นผลเนื่องมาจากมีเชื้อจำนวน 7 สายพันธุ์ที่พบว่าดื้อต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 แต่ไวต่อยาด้วยวิธี NIC-CBMA และไม่พบการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากผลบวกลงจากการทดสอบด้วยวิธี BACTEC MGIT 960 ดังที่ได้อภิปรายในข้างต้น และแก้ไขด้วยการปรับลดปริมาณเชื้อทดสอบลง ทำให้เพิ่มความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ NIC-CBMA มากขึ้น

ชุดทดสอบ NIC-CBMA สามารถเตรียมได้ง่ายและมีราคาถูก เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้เองหรือห้องปฏิบัติการที่มีข้อจำกัดในการใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่มีราคาสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาลขนาดเล็กที่มีเครื่องมือจำกัด อีกทั้งให้ผลที่น่าเชื่อถือ มีความไวและความจำเพาะสูง ลดความผิดพลาดของผลการทดสอบจากความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเติมสาร redox indicator ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ต้น ทำให้ไม่เกิดการฟุ้งกระจายของเชื้อ

จากการเปิดและปิดฝา และการเปลี่ยนแปลงสีชัดเจนทำให้อ่านผลการทดสอบได้ง่ายด้วยตาเปล่า สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำวันในการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ได้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมในการรักษาวัณโรคดื้อยาหลายขนาน สามารถลดโอกาสการเกิดเชื้อดื้อยาจากการได้รับยาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่เพียงพอได้



บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ของเชื้อ *M. tuberculosis* โดยใช้ชุดทดสอบ NIC-CBMA ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960 PZA kit และหาการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในยีน *pncA* ยีน *rpsA* และยีน *panD* ด้วยเทคนิค DNA sequencing

การทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide (PZA) ของเชื้อวัณโรคดื้อยาทั้งหมด 150 สายพันธุ์ ด้วยวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT 960 PZA ให้ผลการทดสอบดื้อต่อยา Pyrazinamide (PZA^R) จำนวน 40 สายพันธุ์ คิดเป็น 26.67% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด และเชื้ออีก 110 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบไวต่อยา Pyrazinamide (PZA^S) คิดเป็น 73.33% ของเชื้อทดสอบทั้งหมด

จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *pncA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Pyrazinamide พบได้ 25 แบบ ได้แก่ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง promoter -11 เบส Adenine เปลี่ยนเป็นเบส Cytosine จำนวน 3 สายพันธุ์ และ เบส Adenine เปลี่ยนเป็นเบส Guanine จำนวน 2 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์ตำแหน่งโคดอน 90 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Isoleucine เป็น Serine (Isoleucine90-Serine) จำนวน 3 สายพันธุ์ กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 136 ซึ่งมีการแทรกเข้ามาของเบส Cytosine มีจำนวน 3 สายพันธุ์ การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งโคดอน 139 มีจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยพบการกลายพันธุ์ได้ 3 แบบ ได้แก่ Valine139-Glycine, Valine139-Alanine และ Valine139-Leucine การกลายพันธุ์แบบ Aspartic acid12-Alanine พบจำนวน 2 สายพันธุ์ แบบ Serine104-Arginine พบจำนวน 2 สายพันธุ์ ส่วนการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาอีก 16 แบบ พบแบบละ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Glycine2 4 -Aspartic acid, Leucine3 5 -Proline, Tyrosine4 1 STOP, Threonine4 7-Proline, Proline6 2-Leucine, Serine6 7-Proline, Tryptophan 6 8- Glycine, Cysteine7 2-Tyrosine, Tyrosine1 0 3 STOP, Glycine105-Valine, Tryptophan119-Arginine, Leucine120-Arginine, การกลายพันธุ์พร้อมกัน 2 ตำแหน่ง คือ Aspartate126-Histidine และ Aspartate129-Tyrosine, Leucine172-Proline, การแทรกเข้ามาของเบส Thymine และ Guanine ที่โคดอน 150, การแทรกเข้ามาของเบส Guanine และ Cytosine ที่โคดอน 177

การศึกษานี้พบการกลายพันธุ์ใหม่ในเชื้อ PZA^R ที่ไม่พบในงานวิจัยก่อนหน้า จำนวน 3 แบบ ได้แก่ การแทรกเข้ามาของเบส Thymine ที่โคดอน 97, การแทรกเข้ามาของเบส Cytosine ที่โคดอน 132, การขาดหายของเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 493 ถึง 496 และการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในเชื้อ PZA^S จำนวน 1 แบบ ได้แก่ Aspartic acid63-Proline นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์บนยีน *pnca* ในเชื้อ PZA^S ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่ไม่สัมพันธ์กับการดื้อยา จำนวน 2 แบบ ได้แก่ แบบ Isoleucine31-Threonine พบจำนวน 7 สายพันธุ์ และแบบ Valine163-Alanine พบจำนวน 1 สายพันธุ์ และการกลายพันธุ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการดื้อยา Pyrazinamide อีกจำนวน 2 แบบ ได้แก่ Threonine61-Proline พบจำนวน 4 สายพันธุ์ และแบบ Phenylalanine106-Leucine พบจำนวน 1 สายพันธุ์

จากการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide ด้วยชุดทดสอบ NIC-CBMA พบว่าสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เหลวจากไม่มีสีเป็นสีชมพู และ/หรือ มีโคลนเชื้อเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง โดยมีระยะเวลาการตรวจพบ (Time to detection: TTD) อยู่ในระหว่าง 10 ถึง 20 วัน และมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 13.8 วัน และค่าความเข้มข้นวิกฤตของ Nicotinamide ที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1000 µg/mL ใช้ในการวินิจฉัยการดื้อยา Pyrazinamide ได้ดีที่สุด โดยพบว่าเชื้อ PZA^R เมื่อตรวจด้วย BACTEC MGIT960 จำนวน 40 สายพันธุ์ให้ผลการทดสอบดื้อต่อยาด้วยวิธี NIC-CBMA ทั้งหมด ในขณะที่เชื้อ PZA^S จำนวน 110 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบไวต่อยาด้วยวิธี NIC-CBMA จำนวน 106 สายพันธุ์และอีก จำนวน 4 สายพันธุ์ ให้ผลดื้อต่อยาด้วยวิธี NIC-CBMA คิดเป็นความไวเท่ากับ 100% ความจำเพาะเท่ากับ 96.36 % ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 90.91% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 100% เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐาน BACTEC MGIT960

ชุดทดสอบ NIC-CBMA นี้ไม่สามารถจำแนกการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่ม Mycobacterium ได้ จึงอาจทำให้เกิดผลบวกหลงหากมีเชื้อชนิดอื่นในกลุ่ม Mycobacterium เจริญปนอยู่กับเชื้อวัณโรค จึงแนะนำให้มีการเพิ่มหลอดทดสอบที่ผสมสาร rho-nitrobenzoic acid (PNB) ในการใช้เป็นหลอดควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น เนื่องจากเชื้อวัณโรคไม่สามารถเจริญในอาหารที่ผสมสารนี้ ในขณะที่เชื้อกลุ่ม Mycobacterium จะสามารถเจริญเติบโตและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของ redox indicator ได้ นอกจากนี้ควรทำการวิจัยแบบพหุสถาบัน (Multicenter Study) กับเชื้อ

วัณโรคด้วยจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น เพื่อกำหนดค่า MIC cut-off ที่เหมาะสมในการใช้แยกเชื้อที่
ดื้อและไวต่อยา Pyrazinamide ที่แท้จริง ส่งผลให้การวิเคราะห์ค่าความไวและความจำเพาะมีความ
น่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้น



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีในการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1.1 การเตรียม Nicotinamide ความเข้มข้นตั้งต้น 1 g/mL

สามารถเตรียมได้โดยละลาย Nicotinamide (บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา) 1 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านตัวกรอง 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียม STC (2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride) ความเข้มข้น 3 mg/mL

สามารถเตรียมได้โดยละลาย STC (บริษัท Tokyo Chemical Industry จำกัด ประเทศญี่ปุ่น) ปริมาณ 0.003 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกรองผ่านตัวกรอง 0.2 ไมครอน โดยเตรียมทันทีก่อนใช้

2. วิธีเตรียม EDTA ความเข้มข้น 0.5 M (pH 8.0)

ละลาย EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) จำนวน 18.61 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปรับค่า pH โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้ได้ pH เท่ากับ 8.0 ผสมจนให้ EDTA ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. วิธีเตรียม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 M (pH 8.0)

ละลาย Tris base จำนวน 12.11 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับค่า pH โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated HCl) ให้ได้ pH เท่ากับ 8.0 ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. วิธีเตรียม Tris EDTA บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า (1X TE buffer)

ผสม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 M pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 3) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เข้ากับ EDTA ความเข้มข้น 0.5 M pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. วิธีเตรียม TBE (Tris/borate/EDTA) บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 5 เท่า (5X TBE buffer)

ละลาย Tris base จำนวน 54 กรัม และ boric acid จำนวน 27.5 กรัม ใน EDTA ความเข้มข้น 0.5 M pH 8.0 (ที่เตรียมได้จากข้อ 2) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับค่า pH โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated HCl) ให้ได้ pH เท่ากับ 8.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

6. การเตรียมน้ำยา Nitrate reduction test

6.1 น้ำยา Sodium nitrate (NaNO_3) substrate

ละลาย Sodium nitrate (NaNO_3) จำนวน 0.085 กรัม Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) จำนวน 0.117 กรัม Sodium phosphate dibasic dodecahydrate ($\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) จำนวน 0.485 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6.2 น้ำยา 1 (50% concentrated HCl)

เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (concentrated HCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร

6.3 น้ำยา 2 (0.2% Sulfanilamide)

ละลาย sulfanilamide จำนวน 0.2 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6.4 น้ำยา 3 (0.1% Naphthylenediamine Dihydrochloride)

ละลาย N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride จำนวน 0.1 กรัม ในน้ำ
กลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร



ภาคผนวก ข
ผลการทดสอบทั้งหมด

ตารางที่ 26 สรุปผลการทดสอบการทดสอบความไวต่อยา Pyrazinamide เมื่อตรวจด้วยวิธี BACTEC MGIT960 PZA kit และชุดการทดสอบ NIC-CBMA และการหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ในยีน *pncA*, ยีน *rpsA* และยีน *panD*

| ลำดับ | ประเภทเชื้อดื้อยา | รูปแบบการดื้อยาต้านวัณโรค | การทดสอบความไวต่อยา PZA | | ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน <i>pncA</i> , ยีน <i>rpsA</i> และยีน <i>panD</i> | | การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับการดื้อยา PZA |
|-------|-------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| | | | BACTEC MGIT | NIC-CBMA ($\mu\text{g/mL}$) | ตำแหน่งและนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไป | ตำแหน่งโคดอนและกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไป | |
| 1 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 2 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 3 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 4 | MDR | SHRE | S* | <250 | None | None | |
| 5 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 6 | MDR | SHRE | S* | <250 | None | None | |
| 7 | MDR | HR | S* | 500 | A181C | Thr61Pro | Indeterminate |
| 8 | Pre-XDR | SHREOML | R* | >2000 | T359G | Leu120Arg | Resistant |
| 9 | MDR | HR | S* | 2 | A181C | Thr61Pro | Indeterminate |
| 10 | Pre-XDR | SHREOML | S* | 2 | T316C | Phe106Leu | Indeterminate |
| 11 | MDR | SHR | R* | >2000 | T269G | Ile90Ser | Resistant |
| 12 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 13 | MDR | SHR | S* | <250 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 14 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 15 | MDR | HR | R*>S* | 500 | None | None | |
| 16 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 17 | Pre-XDR | SHROML | S* | 1000 | A407G | Asp136Gly | Resistant |
| 18 | MDR | SHRE | R* | 2000 | 408insert C | Frameshift cd.136 | Resistant |
| 19 | Pre-XDR | HREOL | R* | 2000 | 408insert C | Frameshift cd.136 | Resistant |

| | | | | | | | |
|----|---------|---------|-------|-------|---------------------|----------------------|-------------|
| 20 | MDR | SHRE | R* | 2000 | A139C | Thr47Pro | Resistant |
| 21 | MDR | SHR | R*>S* | 500 | None | None | |
| 22 | MDR | SHR | R*>S* | 500 | None | None | |
| 23 | MDR | SHRE | S* | 1000 | None | None | |
| 24 | MDR | SHR | R* | 2000 | 394 insertion C | Frameshift cd.132 | New |
| 25 | MDR | HR | S* | <250 | NA | NA | |
| 26 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 27 | MDR | HR | R*>S* | 500 | None | None | |
| 28 | MDR | SHR | R* | 1000 | C309G | Tyr103STOP | Resistant |
| 29 | Pre-XDR | SHROML | R* | 1000 | A-11C | None | Resistant |
| 30 | MDR | SHRE | S* | 500 | NA | NA | |
| 31 | Pre-XDR | HROML | S* | <250 | None | None | |
| 32 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 33 | MDR | SHRE | R* | >2000 | 493-496 deletion | Frameshift cd.165 | New |
| 34 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 35 | MDR | HRE | R*>S* | <250 | None | None | |
| 36 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 37 | MDR | HRE | S* | 500 | None | None | |
| 38 | XDR | HREKOML | S* | 500 | None | None | |
| 39 | Pre-XDR | HREK | R* | >2000 | T416G | Val139Gly | Resistant |
| 40 | Pre-XDR | HROML | S* | <250 | None | None | |
| 41 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 42 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 43 | MDR | SHRE | R* | >2000 | T416C | Val139Ala | Resistant |
| 44 | MDR | HRE | R* | >2000 | A-11G | None | Resistant |
| 45 | XDR | HREKOML | R* | >2000 | T104C | Lue35Pro | Resistant |
| 46 | MDR | HR | S* | <250 | A188C | Asp63Pro | New |
| 47 | MDR | SHR | S* | <250 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 48 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 49 | MDR | SHR | S* | <250 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |

| | | | | | | | |
|----|---------|---------|-------|-------|--------------|-------------------------|---------------|
| 50 | MDR | SHR | R* | >2000 | G376C, G385T | Asp126His, Asp129Tyr | Resistant |
| 51 | Pre-XDR | SHREOML | R* | >2000 | A-11C | None | Resistant |
| 52 | Pre-XDR | SHROML | S* | 500 | NA | NA | |
| 53 | MDR | HRE | S* | 500 | NA | NA | |
| 54 | MDR | SHRE | S* | <250 | None | None | |
| 55 | MDR | SHRE | R* | >2000 | T355C | Trp119Arg | Resistant |
| 56 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 57 | MDR | HR | R* | >2000 | T202G | Trp68Gly | Resistant |
| 58 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 59 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 60 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 61 | Pre-XDR | HRO | S* | 500 | None | None | |
| 62 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 63 | MDR | HR | R* | 2000 | T269G | Ile90Ser | Resistant |
| 64 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 65 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 66 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 67 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 68 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 69 | MDR | HR | R*>R* | 2000 | None | None | |
| 70 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 71 | MDR | SHR | R* | >2000 | G215A | Cys72Tyr | Resistant |
| 72 | PRE-XDR | SHROML | S* | 500 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 73 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 74 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 75 | MDR | SHR | S* | 500 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 76 | MDR | SHR | R*>S* | 500 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 77 | MDR | HR | S* | <250 | NA | NA | |
| 78 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 79 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 80 | MDR | HR | S* | 500 | A181C | Thr61Pro | Indeterminate |

| | | | | | | | |
|-----|---------|----------|-------|-------|---------------------|----------------------|-------------|
| 81 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 82 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 83 | MDR | HRE | S* | 500 | T488C | V163A | Susceptible |
| 84 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 85 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 86 | Pre-XDR | SHROML | S* | 500 | None | None | |
| 87 | PRE-XDR | SHREO | S* | <250 | None | None | |
| 88 | MDR | SHRE | R* | >2000 | T199C | Ser67Pro | Resistant |
| 89 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 90 | Pre-XDR | SHROML | R*>R* | 2000 | A636C* | Arg212Arg* | Susceptible |
| 91 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 92 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 93 | MDR | SHR | R* | >2000 | A310C | Ser104Arg | Resistant |
| 94 | XDR | SHREKOML | R* | 2000 | A-11G | None | Resistant |
| 95 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 96 | MDR | HRE | S* | <250 | None | None | |
| 97 | Pre-XDR | SHRO | R*>S* | 500 | None | None | |
| 98 | MDR | SHR | R* | 2000 | 529 insertion GC | Frameshift cd.177 | Resistant |
| 99 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 100 | MDR | SHR | R* | 2000 | G415C | Val139Leu | Resistant |
| 101 | MDR | HR | S* | 500 | NA | NA | |
| 102 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 103 | MDR | SHR | S* | <250 | T92C | Ile31Thr | Susceptible |
| 104 | Pre-XDR | SHREOML | R* | >2000 | A-11C | None | Resistant |
| 105 | MDR | SHRE | S* | 500 | None | None | |
| 106 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 107 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 108 | MDR | HRE | S* | 500 | None | None | |
| 109 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 110 | MDR | SHRE | R* | 1000 | A35C | Asp12Ala | Resistant |
| 111 | Pre-XDR | SHREOML | R* | 2000 | G314T | Gly105Val | Resistant |

| | | | | | | | |
|-----|---------|----------|-------|-------|---------------------|----------------------|---------------|
| 112 | MDR | HR | S* | 500 | NA | NA | |
| 113 | Pre-XDR | SHREO | R* | 1000 | C123G | Tyr41STOP | Resistant |
| 114 | MDR | SHRE | R* | >2000 | G71A | Gly24Asp | Resistant |
| 115 | MDR | SHR | S* | <250 | None | None | |
| 116 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 117 | XDR | HROMLK | R* | >2000 | 408 insertion C | Frameshift cd.136 | Resistant |
| 118 | MDR | SHR | R* | >2000 | T269G | Ile90Ser | Resistant |
| 119 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 120 | MDR | HR | S* | 500 | NA | NA | |
| 121 | MDR | HR | S* | 500 | None | None | |
| 122 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 123 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 124 | Pre-XDR | SHRK | S* | <250 | None | None | |
| 125 | Pre-XDR | HREO | R* | >2000 | A310C | Ser104Arg | Resistant |
| 126 | MDR | SHR | S* | 500 | None | None | |
| 127 | Pre-XDR | SHRK | S* | 500 | A181C | Thr61Pro | Indeterminate |
| 128 | MDR | SHR | R*>R* | >2000 | A636C* | Arg212Arg* | Susceptible |
| 129 | Pre-XDR | HREOML | S* | 500 | None | None | |
| 130 | MDR | SHRE | S* | 500 | NA | NA | |
| 131 | PRE-XDR | HREOML | R* | >2000 | T515C | Leu172Pro | Resistant |
| 132 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 133 | MDR | SHR | S* | 500 | NA | NA | |
| 134 | PRE-XDR | SHROML | S* | 500 | NA | NA | |
| 135 | MDR | SHRE | S* | <250 | NA | NA | |
| 136 | MDR | HRE | R* | 1000 | 449 insertion TG | Frameshift cd.150 | Resistant |
| 137 | XDR | SHREKOML | S* | <250 | NA | NA | |
| 138 | Pre-XDR | SHROML | S* | <250 | NA | NA | |
| 139 | XDR | SHRKOML | R* | 1000 | C185T | Pro62Leu | Resistant |
| 140 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 141 | MDR | SHRE | S* | 500 | NA | NA | |

| | | | | | | | |
|-----|-----|------|----|------|-----------------|---------------------|-----------|
| 142 | MDR | HR | S* | <250 | NA | NA | |
| 143 | MDR | HR | S* | <250 | None | None | |
| 144 | MDR | HR | R* | 2000 | A35C | Asp12Ala | Resistant |
| 145 | MDR | SHR | R* | 1000 | 292 insertion T | Frameshift cd.97 | New |
| 146 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 147 | MDR | SHR | S* | <250 | NA | NA | |
| 148 | MDR | SHR | S* | 500 | NA | NA | |
| 149 | MDR | SHRE | S* | 500 | NA | NA | |
| 150 | MDR | SHR | S* | 500 | NA | NA | |

หมายเหตุ S หมายถึงยา Streptomycin, R หมายถึงยา Rifampicin, H หมายถึงยา Isoniazid, E หมายถึงยา Ethambutol, L หมายถึงยา Levofloxacin, M หมายถึงยา Moxifloxacin, O หมายถึงยา Ofloxacin, K หมายถึงยา Kanamycin, R หมายถึง ติ้อต้อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT960, S* หมายถึง ไวต้อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT960, R*>S* หมายถึง ไวต้อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT960 โดยการลด AST inoculum, R*>R* หมายถึง ติ้อต้อยา Pyrazinamide เมื่อทดสอบด้วย BACTEC MGIT960 โดยการลด AST inoculum, Resistance หมายถึง การกลายพันธุ์สัมพันธ์กับการติ้อต้อยา Pyrazinamide, Susceptible หมายถึง การกลายพันธุ์ไม่สัมพันธ์กับการติ้อต้อยา Pyrazinamide, New หมายถึง การกลายพันธุ์ใหม่ที่พบในการศึกษานี้, Indeterminate หมายถึง การกลายพันธุ์สัมพันธ์ที่ไม่ทราบบทบาทแน่ชัดเกี่ยวกับการติ้อต้อยา, * หมายถึง การกลายพันธุ์ในยีน *rpsA*, NA หมายถึง ไม่มีผลการวิเคราะห์ DNA sequencing, None หมายถึง ไม่พบการกลายพันธุ์ในยีน *pncA*, MDR หมายถึง วัณโรคติ้อต้อยาหลายขนาน, Pre-XDR-TB หมายถึง วัณโรคติ้อต้อยาหลายขนานชนิดรุนแรง, XDR หมายถึง วัณโรคติ้อต้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก

บรรณานุกรม

1. Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. Report No.: 978-92-4-156551-6.
2. Elimination DoT. Basic TB Facts: Centers for disease control and prevention; 2016 [cited 2017 2 December]. Available from: <https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>.
3. Kenneth T. *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis 2012 [cited 2017 May 15]. Available from: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>.
4. Diagnostics B. BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit Product and Procedure Manual. 2005. p. Available from: <http://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-960pza.pdf>.
5. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ.2561. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2561 2561. 120 p.
6. World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2016.
7. กระทรวงสาธารณสุข. กรมควบคุมโรค. สำนักวัณโรค. แนวทางการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed: สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
8. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
9. Ramirez-Busby SM, Valafar F. Systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(9):5267-77.
10. Njire M, Tan Y, Mugweru J, Wang C, Guo J, Yew W, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Advances in Medical Sciences*. 2016;61(1):63-71.
11. Zhang Y, Chiu Chang K, Leung C-C, Wai Yew W, Gicquel B, Fallows D, et al. 'Z(S)-MDR-TB' versus 'Z(R)-MDR-TB': improving treatment of MDR-TB by identifying pyrazinamide susceptibility. *Emerging Microbes & Infections*. 2012;1(7):e5.
12. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology spectrum*. 2013;2(4):1-12.
13. Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(10):4499-505.
14. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, et al. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes [Internet]. 2nd edition. Wayne (PA): Clinical and

Laboratory Standards Institute; 2011 Mar. (CLSI publication / Clinical and Laboratory Standards Institute, No. 31.5.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>

15. Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the Fully Automated BACTEC MGIT 960 System for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide, Streptomycin, Isoniazid, Rifampin, and Ethambutol and Comparison with the Radiometric BACTEC 460TB Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(3):1109-14.

16. Whitfield MG, Soeters HM, Warren RM, York T, Sampson SL, Streicher EM, et al. A Global Perspective on Pyrazinamide Resistance: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0133869.

17. Singh P, Mishra AK, Malonia SK, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, et al. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacteria*. *The Journal of communicable diseases*. 2006;38(3):288-98.

18. Miotto P, Cabibbe AM, Feuerriegel S, Casali N, Drobniewski F, Rodionova Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide resistance determinants: a multicenter study. *MBio*. 2014;5(5):e01819-14.

19. Ghiasi M, Pande T, Pai M. Advances in Tuberculosis Diagnostics. *Current Tropical Medicine Reports*. 2015;2(2):54-61.

20. World Health Organization. Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis Geneva, Switzerland: World Health Organization 2010 [cited 2018 1 NOV]. Available from: https://www.who.int/tb/laboratory/whopolicy_noncommercialculture_and_dst_methods_mar2011.pdf.

21. Asmar S, Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(1184).

22. Cui Z, Wang J, Zhu C, Huang X, Lu J, Wang Q, et al. Evaluation of a novel biphasic culture medium for recovery of *Mycobacteria*: A Multi-Center Study. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e36331.

23. Martin A, Takiff H, Vandamme P, Swings J, Palomino JC, Portaels F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58(2):327-31.

24. Mirabal NC, Yzquierdo SL, Lemus D, Madruga M, Milián Y, Echemendía M, et al. Evaluation of colorimetric methods using nicotinamide for rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(8):2729-33.

25. Dorothee Heemskerk MC, Ben Marais, Jeremy Farrar. Tuberculosis in adults and children. London: SpringerBriefs in Public Health; 2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK344402/>

26. Geffen N. Battling the white plague, A brief history of Tuberculosis: the Global TB Community Advisory Board; 2011 [updated Jul 1, 2011; cited 2017 Dec 23]. Available from: <http://www.tbonline.info/posts/2011/6/29/battling-white-plague/>.
27. De Cock KM. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. B. R. Bloom (editor). Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. xv+637pp. Price £57.50. ISBN 1-55581-072-1. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1995;89(5):579-80.
28. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respiratory Medicine. 2006;100(11):1862-70.
29. กระทรวงสาธารณสุข. กรมควบคุมโรค. สำนักวัณโรค. แผนงานควบคุมวัณโรคปีงบประมาณ 2560. 2560.
30. สุนทรชิต ก. โรคติดเชื้ออวัยวะ (Opportunistic Infections) วัณโรค (Tuberculosis). 2558 [cited 31 มกราคม 2560]. กรุงเทพมหานคร: วังการแพทย์. Available from: <http://www.wongkarnpat.com/magazinepat.php>.
31. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(1):152-7.
32. World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
33. สำนักวัณโรค. แนวทางปฏิบัติป้องกันควบคุมวัณโรคที่ยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก. กรุงเทพมหานคร: กรมควบคุมโรค; 2561. Available from: <https://ddc.moph.go.th/uploads/files/478e3f0bb78a24bedcaa273508f9e8d4.pdf>.
34. McGrath M, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Warner DF. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2013;69(2):292-302.
35. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2015;19(11):1276-89.
36. McHugh TD. Tuberculosis: Laboratory diagnosis and treatment strategies 2013. 1-270 p.
37. กระทรวงสาธารณสุข ก. สำนักป้องกันควบคุมโรคที่ 10 เชียงใหม่. คู่มือการเพาะแยกเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ 2551.
38. Hillemann D, Richter E, Rusch-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 Automated System for Recovery of Mycobacteria from 9,558 Extrapulmonary Specimens, Including Urine Samples. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(11):4014.
39. สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย. หนังสือที่ระลึกครบรอบ 80 ปี สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed 2558.
40. Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, Schiller I, Dendukuri N, Tollefson D, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane

Database Syst Rev. 2019;6:Cd009593.

41. Willby MJ, Wijkander M, Havumaki J, Johnson K, Werngren J, Hoffner S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis pncA* Mutations by the Nipro Genoscholar PZA-TB II Assay Compared to Conventional Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62(1):e01871-17.
42. Paramasivan2 RRaCN. What is new in the diagnosis of tuberculosis? PartII; Techniques for drug susceptibility testing.2013.
43. Becton DaC. BD BACTEC™ MGIT™ automated mycobacterial detection system.
44. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018. Available from: https://www.who.int/tb/publications/2018/WHO_technical_drug_susceptibility_testing/en/.
45. Pawar S, Shah S, Udgaonkar U. Comparison of Conventional Lowenstein Jensen Medium and Middlebrook Biphasic Medium for isolation of *Mycobacterium Tuberculosis*. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2016;3:1583-6.
46. Ghatole M SC, Kamale P, Kandle S, Jahagirdar V, Yemul V. Evaluation of Biphasic Culture System for Mycobacterial Isolation from the Sputum of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2005;23(2):111-3.
47. Shibayama H, Galvan FJ, Contreras C. Microculture in biphasic medium with silicone-coated slides for isolation of mycobacteria. *Bull Pan Am Health Organ.* 1996;30(3):197-205.
48. Hoffner SE, Haile M, Kallenius G. A biphasic system for primary isolation of mycobacteria compared to solid medium and broth culture. *Journal of Medical Microbiology.* 1992;37(5):332-4.
49. Gonzalo X, Drobniowski F, Hoffner S, Werngren J. Evaluation of a biphasic media assay for pyrazinamide drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2014;69(11):3001-5.
50. Terry L Riss P, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor. *Cell Viability Assays* 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
51. Dojindo. CTC 2019 [Available from: <https://www.dojindo.eu.com/store/p/147-CTC.aspx>].
52. Ogata J, Kikura-Hanajiri R, Yoshimatsu K, Kiuchi F, Goda Y. [Detection method for the ability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed germination by the use of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC)]. *Yakugaku Zasshi.* 2008;128(11):1707-11.
53. Industry TC. 2,3-Diphenyl-5-(2-thienyl)tetrazolium Chloride 2019 [Available from: <https://www.tcichemicals.com/eshop/en/ap/commodity/B0325/>].
54. Park YK, Koh W-J, Kim SO, Shin S, Kim BJ, Cho S-N, et al. Clarithromycin susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride microplate assay with Middlebrook 7H9 broth. *Journal of Korean Medical Science.* 2009;24(3):511-2.

55. Lee SM, Kim K, Chang C. Detection of Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Using Middlebrook 7H9 Broth Medium with 2,3-Diphenyl-5-Thienyl-(2)-Tetrazolium Chloride. *Annals of Clinical Microbiology*. 2018;21:47.
56. Lee SM, Kim J, Jeong J, Park Y, Bai G-H, Lee E, et al. Evaluation of the Broth Microdilution Method Using 2,3-Diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium Chloride for Rapidly Growing Mycobacteria Susceptibility Testing. *Journal of Korean Medical Science*. 2007;22:784-90.
57. Coban AY, Deveci A, Sunter AT, Palomino JC, Martin A. Resazurin microtiter assay for isoniazid, rifampicin, ethambutol and streptomycin resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: Updated meta-analysis. *International Journal of Mycobacteriology*. 2014;3(4):230-41.
58. Mohammadzadeh A, Farnia P, Ghazvini K, Behdani M, Rashed T, Ghanaat J. Rapid and low-cost colorimetric method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55(Pt 12):1657-9.
59. Li H, Zhou LP, Luo J, Yu JP, Yang H, Wei HP. Rapid colorimetric pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2016;20(4):462-7.
60. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(11):3616-9.
61. Hundie GB, Woldemeskel D, Gessesse A. Evaluation of Direct Colorimetric MTT Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0169188.
62. den Hertog AL, Menting S, Pfeldt R, Warns M, Siddiqi SH, Anthony RM. Pyrazinamide Is Active against *Mycobacterium tuberculosis* Cultures at Neutral pH and Low Temperature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(8):4956-60.
63. Murray MF. Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both *Mycobacterium tuberculosis* and human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(4):453-60.
64. Zhang J-L, Zheng Q-C, Li Z-Q, Zhang H-X. Molecular Dynamics Simulations Suggest Ligand's Binding to Nicotinamidase/Pyrazinamidase. *PloS one*. 2012;7:e39546.
65. Asif M. Mini Review Study of Antitubercular Drugs of Nicotinamide, Thioisonicotinamide and Pyrazinamide Derivatives. *Journal of Agriculture and Life Sciences*. 2014;1.
66. Wanliang Shi PC, Hongxia Niu, Shuo Zhang, Tone Tønjum, Bingdong Zhu, Ying Zhang. Introducing RpsA Point Mutations Δ438A and D123A into the Chromosome of *M. tuberculosis* Confirms their Role in Causing Resistance to Pyrazinamide. *American Society for Microbiology*. 2019.
67. Tan Y, Hu Z, Zhang T, Cai X, Kuang H, Liu Y, et al. Role of *pncA* and *rpsA* Gene Sequencing

in Detection of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Southern China. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(1):291-7.

68. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*. 2013;2(6):e34.

69. Pandey B, Grover S, Tyagi C, Goyal S, Jamal S, Singh A, et al. Molecular principles behind pyrazinamide resistance due to mutations in *panD* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*. 2016;581(1):31-42.

70. Hu Y, Wu X, Luo J, Fu Y, Zhao L, Ma Y, et al. Detection of pyrazinamide resistance of *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide as a surrogate. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017;23(11):835-8.

71. Buderer NM. Statistical methodology: I. Incorporating the prevalence of disease into the sample size calculation for sensitivity and specificity. *Academic Emergency Medicine*. 1996;3(9):895-900.

72. Piersimoni C, Mustazzolu A, Giannoni F, Bornigia S, Gherardi G, Fattorini L. Prevention of False Resistance Results Obtained in Testing the Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 System Using a Reduced Inoculum. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(1):291-4.

73. Morlock GP, Tyrrell FC, Baynham D, Escuyer VE, Green N, Kim Y, et al. Using Reduced Inoculum Densities of *Mycobacterium tuberculosis* in MGIT Pyrazinamide Susceptibility Testing to Prevent False-Resistant Results and Improve Accuracy: A Multicenter Evaluation. *Tuberculosis Research and Treatment*. 2017;2017:9.

74. Bwalya P, Yamaguchi T, Mulundu G, Nakajima C, Mbulo G, Solo ES, et al. Genotypic characterization of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Lusaka, Zambia. *Tuberculosis (Edinb)*. 2018;109:117-22.

75. Maslov DA, Zaichikova MV, Chernousova LN, Shur KV, Bekker OB, Smirnova TG, et al. Resistance to pyrazinamide in Russian *Mycobacterium tuberculosis* isolates: *pncA* sequencing versus Bactec MGIT 960. *Tuberculosis (Edinb)*. 2015;95(5):608-12.

76. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chaiprasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol*. 2010;10:223.

77. Jureen P, Werngren J, Toro JC, Hoffner S. Pyrazinamide resistance and *pncA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(5):1852-4.

78. Streicher EM, Maharaj K, York T, Van Heerden C, Barnard M, Diacon A, et al. Rapid sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis pncA* gene for detection of pyrazinamide

susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(11):4056-7.

79. Yadon AN, Maharaj K, Adamson JH, Lai YP, Sacchettini JC, Ioerger TR, et al. A comprehensive characterization of PncA polymorphisms that confer resistance to pyrazinamide. *Nature Communications*. 2017;8(1):588.
80. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal Structure of the Pyrazinamidase of *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into Natural and Acquired Resistance to Pyrazinamide. *PLOS ONE*. 2011;6(1):e15785.
81. Foongladda S, Klayut W, Pholwat S, Houpt E. Comparison and development of pyrazinamide susceptibility testing methods for tuberculosis in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015;83(3):270-3.
82. Cancino-Munoz I, Moreno-Molina M, Furio V, Goig GA, Torres-Puente M, Chiner-Oms A, et al. Cryptic Resistance Mutations Associated With Misdiagnoses of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019;220(2):316-20.
83. Zignol M, Dean AS, Alikhanova N, Andres S, Cabibbe AM, Cirillo DM, et al. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(10):1185-92.
84. Zhang Y, Zhang J, Cui P, Zhang Y, Zhang W. Identification of Novel Efflux Proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c Involved in Pyrazinamide Resistance *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(8):e00940-17.
85. Alexander DC, Ma JH, Guthrie JL, Blair J, Chedore P, Jamieson FB. Gene sequencing for routine verification of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a role for *pncA* but not *rpsA*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(11):3726-8.
86. Agarwal A, Dhole T, Sharma Y. Evaluation of p-nitro benzoic acid (PNB) inhibition test to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tuberculous mycobacteria using microscopic observation of drug susceptibility (MODS) methodology. *The Indian journal of tuberculosis*. 2014;61:232-5.
87. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2003;7:6-21.
88. Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;61(1):123-7.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

| | |
|-------------------|---|
| ชื่อ-สกุล | นางสาววราภรณ์ เกื่อนสุวรรณ |
| วัน เดือน ปี เกิด | 27 ตุลาคม 2534 |
| สถานที่เกิด | ปทุมธานี |
| วุฒิการศึกษา | จบการศึกษาระดับปริญญาตรี จากคณะสหเวชศาสตร์ สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 จากนั้นได้ทำงานเป็นนักเทคนิคการแพทย์ ประจำหน่วยงานจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กลุ่มงานพยาธิวิทยา สถาบันโรคทรวงอก และในปีการศึกษา 2559 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตรบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| ที่อยู่ปัจจุบัน | บ้านเลขที่ 14 หมู่ที่ 7 ต.ไทรใหญ่ อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี 11150 |