

การเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยา ในผู้ป่วยวัณโรคสัมผัสพบเชื้อ ด้วยวิธี Line probe assay ใน
ปีงบประมาณ ๒๕๖๓-๒๕๖๕ ในเขตสุขภาพที่ ๑๑

Surveillance of drug resistant tuberculosis Among TB cases in ๑๑th Health region
by Line probe assay during ๒๐๒๐-๒๐๒๒

ปิ่นกมล วสีวิวัฒน์

สุพัตรา เสี่ยงส่ง

เบญจภรณ์ จงไกรจักร

บุญฤทธิ บุญสนอง

ณัฐปคัมภ์ ศรีวิจิตร

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๑ จังหวัดนครศรีธรรมราช

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

การเฝ้าระวังวัณโรคดื้อยา ในผู้ป่วยวัณโรคเสมหะพบเชื้อ ด้วยวิธี Line probe assay ใน
ปีงบประมาณ 2563-2565 ในเขตสุขภาพที่ 11

Surveillance of drug resistant tuberculosis Among TB cases in 11th Health region
by Line probe assay during 2020-2022

ปิ่นกมล วสีวิวัฒน์
สุพัตรา เส่งส่ง
เบญจภรณ์ จงไกรจักร
บุญฤทธิ์ บุญสนอง
ณัฐปคัมภ์ ศรีวิจิตร

สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ ๑๑ จังหวัดนครศรีธรรมราช

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

คำนำ

การจัดทำรายงานวิจัยฉบับนี้ขึ้นเพื่อเป็นการเฝ้าระวังโรคติดเชื้อ ในผู้ป่วยโรคเอดส์ด้วยวิธี Line probe assay ในปีงบประมาณ 2563-2565 ในเขตสุขภาพที่ 11 เพื่อใช้ในการติดตามสถานการณ์โรคติดเชื้อในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครราชสีมา (สคร.11) โดยผลงานนี้สะท้อนให้เห็นถึงจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อ และอัตราการติดเชื้อที่ตรวจพบ ในปีงบประมาณ 2563-2565 โรงพยาบาลในเขตพื้นที่รับผิดชอบได้ส่งมาตรวจที่ สคร.11 จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์กับหน่วยงานอื่นๆและผู้ที่เกี่ยวข้อง รวมถึงเป็นประโยชน์ในการบริหารจัดการการรักษารวมโรคต่อไป

ทั้งนี้ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปิ่นกมล วสีวิวัฒน์

ผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการเฝ้าระวังโรคติดต่อฯ ในผู้ป่วยโรคเอดส์พบเชื้อ ด้วยวิธี Line probe assay ใน ปีงบประมาณ 2563-2565 ในเขตสุขภาพที่ 11 สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์และสนับสนุนเป็นอย่างดีจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครราชสีมา

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์พันธ์ชัย รัตนสุวรรณ ข้าราชการบำนาญ ตำแหน่ง นายแพทย์เชี่ยวชาญ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ที่ได้ให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการ ถ่ายทอดความรู้ในการทำวิจัย ให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็น ต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คุณค่าและประโยชน์ของงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องแสดงความกตัญญูต่อบิดา มารดาที่ให้การศึกษาอบรมสั่งสอน ให้มีสติปัญญาและคุณธรรมทั้งหลาย อันเป็นเครื่องมือนำไปสู่ความสำเร็จในชีวิตของผู้วิจัย

ปิ่นกมล วสีวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อศึกษาสถานการณ์การดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ในเขตสุขภาพที่ 11 หรือภาคใต้ตอนบน จากตัวอย่างที่ส่งตรวจระหว่างปีงบประมาณ 2563 , 2564 และ 2565 และศึกษารูปแบบการดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยด้านอื่นๆ โดยได้ทำการศึกษาตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะพบเชื้อจากโรงพยาบาลต่างๆ ในเขตสุขภาพที่ 11 ที่ส่งมาตรวจที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช การศึกษานี้วิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบสัดส่วนของจำนวนผู้ป่วยวัณโรคดื้อยากับจำนวนตัวอย่างที่ส่งตรวจทั้งหมด และเปรียบเทียบสัดส่วนปัจจัยด้านอื่นๆ ของผู้ป่วยที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาวัณโรค ผลการศึกษา จากการศึกษานี้ในผู้ป่วยเสมหะพบเชื้อ จำนวนทั้งสิ้น 6,262 ตัวอย่าง เป็นผู้ป่วยรายใหม่ (New case) จำนวน 4,948 ตัวอย่าง, ผู้ป่วยที่เคยมีประวัติเป็นวัณโรค (Re-treatment) จำนวน 410 ตัวอย่าง, ผู้ป่วยที่กำลังรักษา (On-treatment) จำนวน 904 ตัวอย่าง พบว่ามี อัตราผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ที่ดื้อยา RR+/MDR ในปีงบประมาณ 2563 , 2564 และ 2565 ร้อยละ 0.61, 1 และ 1.16 ตามลำดับ โดยพบมากที่สุด คือ จังหวัดนครศรีธรรมราช และพบมากในกลุ่มวัยทำงาน สรุปสถานการณ์ดื้อยาในเขตสุขภาพที่ 11 ยังพบว่าต่ำกว่าระดับประเทศ ซึ่งข้อมูลจากโปรแกรม NTIP ประเทศไทยพบผู้ป่วยรายใหม่ที่ดื้อยา RR+/MDR ในปีงบประมาณ 2563 , 2564 และ 2565 ร้อยละ 1.50, 1.59 และ 1.72 ตามลำดับ จากจำนวนผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนทั้งหมด และพบอัตราการดื้อยา Isoniazid ในปีงบประมาณ 2563 , 2564 และ 2565 ร้อยละ 12.15, 12.44 และ 12.40 ตามลำดับ

จากข้อมูลทั้งหมดที่ศึกษาพบว่ามีสัดส่วนผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR ยังต่ำกว่าค่าประมาณจากองค์การอนามัยโลกเมื่อปี พ.ศ.2565 (Global tuberculosis report 2023, WHO) ที่พบว่าผู้วัณโรครายใหม่มีการดื้อยา RR+/MDR ในประเทศไทย เท่ากับร้อยละ 1.7 และจากข้อมูลทั้ง 3 ปี พบว่าแนวโน้มยังคงที่อยู่ แต่อย่างไรก็ตาม ควรติดตามข้อมูลต่อไปในระยะยาว เพื่อดูแนวโน้มสถานการณ์การดื้อยาต่อไป

คำสำคัญ : วัณโรค, เชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน, ภาคใต้ตอนบน, Line Probe Assay (LPA), ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่, Line probe assay

Abstract

This study aimed to assess tuberculosis drug-resistant situation in smear-positive tuberculosis sample at Office of Disease Prevention and Control Region 11, Nakhon Si Thammarat between 2020, 2021 and 2022. Moreover, we aimed to compare the proportion of tuberculosis drug-resistant associated with various factors. The study analyzed samples from patients with pulmonary tuberculosis who were tested at various hospitals in 11th Health Region and sent for examination to the Office of Disease Prevention and Control Region 11, Nakhon Si Thammarat. The data analysis involved comparing the proportions of drug-resistant tuberculosis cases to the total number of samples tested and evaluating other factors related to drug resistance in tuberculosis patients. The results of the study, which included 6,262 samples from smear-positive patients, revealed 4,948 new cases, 410 Re treatment cases, and 904 On-treatment cases. The study found that the rate of new drug-resistant tuberculosis cases (RR+/MDR) during the fiscal years 2021, 2022, and 2023 were 0.61%, 1%, and 1.16%, respectively. The highest rates were observed in Nakhon Si Thammarat province and were more prevalent in the working-age group. In summary, the drug-resistant tuberculosis situation in 11th Health Region was found to be still lower than the national level, as indicated by data from the National Tuberculosis Information Program (NTIP) in Thailand, which reported rates of 1.50%, 1.59%, and 1.72% for new drug-resistant tuberculosis cases (RR+/MDR) during the fiscal years 2021, 2022, and 2023, respectively, based on the total number of registered patients. The rate of resistance to Isoniazid in the fiscal years 2020, 2021, and 2022 was 12.15%, 12.44%, and 12.40% respectively.

According to the information studied, it was found that the proportion of RR+/MDR tuberculosis patients is still lower than the estimated value reported by the World Health Organization in 2023. The report indicates that the percentage of new tuberculosis cases with RR+/MDR drug resistance in Thailand is 1.7%. Over the course of 3 years, the trend has remained consistent. However, it is advisable to continue monitoring the data in the long term to observe the trend of drug resistance in the future.

Keywords : Tuberculosis, Multidrug-resistance Tuberculosis (MDR-TB), Upper Southern Thailand, New case, Line Probe Assay (LPA)

สารบัญ

คำนำ.....	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ซ
สารบัญแผนภาพ	ฌ
คำย่อ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	11
บทที่ 2 แนวความคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัณโรค.....	14
2.2 การแพร่กระจายเชื้อวัณโรค	15
2.3 ยารักษาวัณโรคแนวที่หนึ่ง (First-line anti-TB drug, FLD).....	20
2.4 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ด้วยวิธี Line probe assay	21
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	29
3.1 กลุ่มตัวอย่าง	29
3.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง	29
3.3 พื้นที่ศึกษา.....	29
3.4 วิธีการศึกษา.....	29
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	37

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม.....	43
ภาคผนวก	45

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2-1 แสดงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Latent TB infection , LTBI).....	16
ตารางที่ 2-2 แสดงพยาธิกำเนิดของการป่วยวัณโรคลุกลาม (active TB disease).....	17
ตารางที่ 2-3 ข้อแตกต่างระหว่างการติดเชื้อวัณโรคแฝงและการป่วยเป็นวัณโรค.....	18
ตารางที่ 3-1 แสดงปริมาณการเตรียม Amplification Reagent mix 1 ตัวอย่าง.....	31
ตารางที่ 3-2 แสดงอุณหภูมิแต่ละรอบ ของการ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification).....	32
ตารางที่ 3-3 แสดงการแปลผลการทดสอบ	36
ตารางที่ 4-1 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะบวกลูกที่นำมาตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line probe assay โดยแบ่งตามประเภทของผู้ป่วย	37
ตารางที่ 4-2 แสดงผลการตรวจหาการดื้อยาวัณโรคในผู้ป่วยรายใหม่ (New case)	38
ตารางที่ 4-3 แสดงผลพบ วัณโรคดื้อ RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11	38
ตารางที่ 4-4 ความชุกของวัณโรคดื้อยาชนิด RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11	39
ตารางที่ 4-5 แสดงความเกี่ยวข้องของประวัติผู้ป่วยกับการดื้อยา RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11	40
ตารางที่ 4-6 แสดงความเกี่ยวข้องของช่วงอายุผู้ป่วยกับการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11	40

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2-1 แสดงการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรค	21
รูปที่ 2-2 แสดง ตำแหน่งที่มีกพบการดื้อยา Rifampicin ของยีน rpoB ที่ชุดตรวจ GenoType MTBDRplus สามารถตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ได้	22
รูปที่ 2-3 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR	24
รูปที่ 2-4 แสดงการทำปฏิกิริยาของ sodium hydroxide DEN buffer	25
รูปที่ 2-5 แสดงการทำปฏิกิริยา hybridization เติม green hybridization buffer HYB	26
รูปที่ 2-6 แสดงการเกิด non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา hybridization	27
รูปที่ 2-7 แสดงการทำปฏิกิริยาของ conjugation buffer	28
รูปที่ 2-8 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Substrate	28
รูปที่ 3-1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม.....	31

สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 2-1 ธรรมชาติของการเกิดโรค.....	19
--	----

คำย่อ

AFB	acid- fast bacilli
AG	aminoglycosides
DM	Diabetes Mellitus
DOT	directly observed treatment
DR-TB	drug resistant tuberculosis
FQs	fluoroquinolones
Hr	isoniazid resistant
H	isoniazid
IC	infection control
IGRAs	Interferon-gamma release assay
LPA	line probe assay
LTBI	latent tuberculosis infection
MAC	Mycobacterium avium complex
MDR-TB	multidrug resistant tuberculosis
MTBC	Mycobacterium tuberculosis complex
NTIP	National Tuberculosis Information Program
NTM	nontuberculous mycobacterium
R, RIF	rifampicin
RR	rifampicin resistant
RR-TB	rifampicin resistant TB
S	streptomycin
SLD	second line drugs
TPT	tuberculosis preventive treatment
TST	tuberculin skin test
WHO	World Health Organization
XDR-TB	extensively drug resistant tuberculosis
Z	pyrazinamide

บทที่ 1

บทนำ

ในปี พ.ศ. 2563 องค์การอนามัยโลกคาดประมาณว่าอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรค (รายใหม่และกลับเป็นซ้ำ) ของโลกสูงถึง 9.9 ล้านคน (127 ต่อแสนประชากร) ในจำนวนนี้เป็นเด็กอายุ 0 - 14 ปี จำนวน 1.1 ล้านคน มีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตสูงถึง 1.3 ล้านคน จากการรายงานพบผู้ป่วยวัณโรค (รายใหม่และกลับเป็นซ้ำ) 5.8 ล้านคน (75 ต่อแสนประชากร) และคาดประมาณผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 7.87 แสนคน หรือคิดเป็น 10 ต่อแสนประชากร โดยเสียชีวิตปีละ 2.14 แสนคน จากการรายงานพบผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี 3.76 แสนคน คิดเป็นร้อยละ 9 ของผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับการตรวจเชื้อเอชไอวี อัตราความสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรค รายใหม่และกลับเป็นซ้ำที่ขึ้นทะเบียนรักษาในปีงบประมาณ 2562 เท่ากับ ร้อยละ 86 สำหรับจำนวนผู้ป่วยวัณโรค ตื้อยา MDR/RR-TB จากรายงานมีจำนวน 1.58 แสนคน และได้รับการรักษาจำนวน 1.5 แสนคน มีอัตรา ความสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรคตื้อยา MDR/RR-TB ที่ขึ้นทะเบียนในปี พ.ศ. 2561 ร้อยละ 59 (WHO, 2021)

ในปี พ.ศ. 2565 อุตการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำของประเทศไทย 103,000 ราย คิดเป็น 143 รายต่อแสนประชากร ผู้ป่วยวัณโรค เสียชีวิต 11,000 ราย ผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทย ปี พ.ศ. 2563 พบว่ามีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำขึ้นทะเบียนรักษา 71,488 ราย เป็นเด็กอายุ 0 - 14 ปี ที่ได้รับการวินิจฉัยและขึ้นทะเบียนรักษาเพียงร้อยละ 4 ของผู้ป่วยทั้งหมด ผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำในประเทศไทยที่ผ่านมามีแนวโน้มอัตราการรักษาสำเร็จเพิ่มขึ้น รักษาล้มเหลว ขาดยาและโอนออก ลดลง ส่วนอัตราการเสียชีวิตยังคงสูงและเป็นปัญหาของประเทศไทย เนื่องจากผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่เป็นผู้สูงอายุ และมีโรคร่วม และในปี พ.ศ. 2565 มีอัตราผลสำเร็จการรักษาผู้ป่วย วัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ เท่ากับ ร้อยละ 83 ผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวีที่องค์การอนามัยโลกคาดประมาณ 8,900 ราย ผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2565 พบว่าผู้ป่วยวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 5,313 ราย ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 7.4 ในส่วนของ วัณโรคตื้อยาหลายขนานหรือตื้อยา Rifampicin (MDR/RR-TB) องค์การอนามัยโลกคาดว่าในปี 2564 ประเทศไทยมีผู้ป่วย ประมาณ 2,400 ราย คิดเป็น 3.4 รายต่อแสนประชากร โดยพบในผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ร้อยละ 1.7 และพบในผู้ป่วยวัณโรคที่เคยรักษามาก่อนร้อยละ 19.8 (WHO, 2021)

องค์การอนามัยโลกคาดประมาณจำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11 ปี 2563 - 2565 จำนวน 6,853, 6,745 และ 6,724 ราย ตามลำดับ ผลการดำเนินงานจากรายงานในโปรแกรม รายงานข้อมูล วัณโรคของประเทศไทย (National Tuberculosis Information Program:NTIP) ณ วันที่ 30 ตุลาคม 2566จำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ จำนวน 5,206, 4,637 และ 4,867 ตามลำดับ คิดเป็น อัตราความครอบคลุมของการรักษา (TB treatment coverage) ร้อยละ 75.97, 68.75 และ 72.38 ตามลำดับ

แนวโน้มการค้นหาและขึ้นทะเบียนรักษามีแนวโน้มลดลงทั้งภาพรวมประเทศและภาพเขต อัตราความสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ (All Form) ปี 2562-2564 ในภาพรวมประเทศ ร้อยละ 86.32, 85.60 และ 84.47 ตามลำดับ ในเขตสุขภาพที่ 11 อยู่ที่ร้อยละ 88.05, 87.78 และ 86.50 ตามลำดับ ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จการรักษา คือ อัตราการเสียชีวิตสูง ร้อยละ 7.58, 8.23 และ 8.94 ตามลำดับ และอัตราการขาดยา ร้อยละ 3.58, 3.37 และ 3.45 ตามลำดับ

สถานการณ์วัณโรคคือยาเขตสุขภาพที่ 11 ปี 2563- 2565 จากโปรแกรม NTIP ณ วันที่ 30 ต.ค. 2566 พบว่าผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนมีผลทดสอบความไวต่อยา ร้อยละ 86.7, 90.5 และ 90.9 ตามลำดับ ผู้ป่วยวัณโรคปอดต่อยา Rifampicin จำนวน 25, 15, และ 5 ราย ตามลำดับ ผู้ป่วยวัณโรคปอดต่อยาหลายขนาน (MDR-TB) จำนวน 49, 34 และ 29 ตามลำดับ ผู้ป่วยวัณโรคปอดต่อยาหลายขนานชนิดรุนแรง (Pre XDR-TB) จำนวน 4, 0 และ 3 ราย ตามลำดับ ผู้ป่วยวัณโรคปอดต่อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (XDR-TB) จำนวน 1, 0, และ 1 ราย ตามลำดับ

การค้นหาวัณโรค ควรเริ่มต้นด้วยขั้นตอนการตรวจคัดกรองทางคลินิกที่เหมาะสมเพื่อระบุผู้ที่น่าจะเป็นวัณโรค (presumptive TB cases) ตามด้วยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การตรวจทางห้องปฏิบัติการนอกจากจะช่วยยืนยันในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคแล้ว ยังใช้ในการติดตามการรักษา การตรวจความมีชีวิตของเชื้อ ตรวจสอบรูปแบบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคและตรวจการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง โดยวิธีดั้งเดิมและถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและการดื้อยาของเชื้อ คือการเพาะเลี้ยงเชื้อและการทดสอบความไวต่อยา ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงมาก แต่ต้องใช้ระยะเวลานาน ซึ่งทำได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งอาหารชนิดแข็ง (solid media) และอาหารชนิดเหลว (liquid media) ระยะเวลาการเจริญของเชื้อวัณโรคบนอาหารชนิดแข็งที่มีส่วนผสมของไข่อยู่ที่ 2-8 สัปดาห์ ส่วนระยะเวลาการเจริญของเชื้อวัณโรคในอาหารชนิดเหลวอยู่ที่ 1-6 สัปดาห์ เชื้อที่เพาะเลี้ยงขึ้นจำเป็นต้องพิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อ ก่อนที่จะสามารถนำไปการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค (phenotypic DST) ต่อไป ซึ่งการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรคนี้ กรณีทดสอบในอาหารแข็งใช้ระยะเวลาอีกประมาณ 4 สัปดาห์ ในอาหารเหลวใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ เนื่องจากมีระยะเวลานานกว่าผู้ป่วยจะทราบผลการทดสอบความไวต่อยา จึงได้มีการคิดค้นการตรวจด้วยวิธี nucleic acid amplification (NAA) assays โดยนำเอาส่วนประกอบของ nucleic acid ของเชื้อ M. tuberculosis มาทำการเพิ่มขยายจำนวน DNA ของเชื้อกลุ่มเป้าหมายเพื่อให้ตรวจพบได้เร็วและเพิ่มความจำเพาะแต่ข้อจำกัดคือไม่สามารถแยกได้ว่า DNA ที่ตรวจพบเป็น DNA ของเชื้อที่มีชีวิตหรือไม่ โดย Line probe assay ก็เป็นการตรวจวิธีหนึ่งที่สามารถตรวจได้ทั้งยาในกลุ่ม First line drug และ Second line drug ด้วยเหตุผลข้างต้น ด้วยเหตุผลข้างต้นคณะผู้วิจัยเห็นถึงความสำคัญของการตรวจด้วยวิธี Line probe assay จึงนำมาใช้ในการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค เพื่อศึกษาสถานการณ์การดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ในเขตสุขภาพที่ 11 ในระหว่างปีงบประมาณ 2563-2565

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสถานการณ์การดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ในเขตสุขภาพที่ 11 ในระหว่างปีงบประมาณ 2563-2565
2. เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยด้านอื่นๆ ได้แก่เพศ และประเภทการรักษาของผู้ป่วย

บทที่ 2

แนวความคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับวัณโรค

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชื่อ *Mycobacterium tuberculosis* จัดอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* วัณโรคเกิดได้ในทุกอวัยวะของร่างกาย ส่วนใหญ่มักเกิดที่ปอด (ร้อยละ 80) (สำนักวัณโรค, 2564, หน้า 5-6) ซึ่งสามารถแพร่เชื้อได้ง่าย และอาจพบได้ในอวัยวะอื่นๆนอกปอดได้แก่ เยื่อหุ้มปอด ต่อม้ำเหลือง กระดูกสันหลัง ข้อต่อ ช่องท้อง ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบประสาท เป็นต้น

เชื้อ *Mycobacterium* แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1) *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) เป็นสาเหตุของวัณโรคในคนและสัตว์มีจำนวน 8 สายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์อื่นที่พบบ่อยในกลุ่มนี้ เช่น *Mycobacterium africanum* พบได้ในแถบแอฟริกา *Mycobacterium bovis* มักก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งอาจติดต่อมาถึงคนได้โดยการบริโภคนมที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเป็นสายพันธุ์ที่นำมาทำวัคซีนบีซีจี

2) Non- tuberculous mycobacteria (NTM) มีจำนวนมากกว่า 140 สายพันธุ์ เช่น *Mycobacterium avium complex* (MAC) พบในสิ่งแวดล้อม ดิน น้ำ หรือพบในสัตว์ เช่น นก ส่วนใหญ่ไม่ก่อโรคในคน ยกเว้นในผู้ที่ระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอ

3) *Mycobacterium laprae* เป็นสาเหตุของโรคเรื้อน

เชื้อวัณโรคมีลักษณะเป็นรูปแท่ง หนาประมาณ 0.3 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2 - 5 ไมโครเมตร เมื่อย้อมด้วยวิธี Ziehl-Neelsen จะติดสีแดง เชื้อวัณโรคไม่มีแคปซูล ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อาศัยออกซิเจนในการเจริญเติบโต เชื้อวัณโรคที่อยู่ในละอองฝอย เมื่อผู้ป่วยไอ หรือจามออกมา สามารถลอยอยู่ในอากาศได้นานถึง 30 นาที

เชื้อวัณโรคมีความทนทานในสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถถูกทำลายด้วยหลายปัจจัย ได้แก่ สารเคมีบางชนิด ความร้อน แสงแดด และแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยแสงแดดสามารถทำลายเชื้อวัณโรคในเสมหะได้ใช้เวลา 20 - 30 ชั่วโมง และหากถูกรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะตายภายใน 1-2 นาที ซึ่งเชื้อวัณโรคในเสมหะแห้งที่ไม่ถูกแสงแดด

อาจมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 6 เดือน ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สามารถทำลายเชื้อวัณโรคได้ (สำนักวัณโรค, 2564, หน้า 4-5)

2.2 การแพร่กระจายเชื้อวัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อจากคนสู่คนผ่านทางอากาศ (airborne transmission) โดยเมื่อผู้ป่วยวัณโรคปอด หลอดลม หรือกล่องเสียง ไอ จาม พุดตังๆ ตะโกน หัวเราะหรือร้องเพลง ทำให้เกิดละอองฝอย (droplet nuclei) พุ้งกระจายออกมา ละอองฝอยที่มีขนาดใหญ่มากจะตกลงสู่พื้นดินและแห้งไป ละอองฝอยที่มีขนาดเล็ก 1 - 5 ไมโครเมตร จะลอยและกระจายอยู่ในอากาศ ซึ่งผู้สูดหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อวัณโรคเข้าไปในปอดขนาดใหญ่จะติดอยู่ที่จมูกหรือลำคอ ซึ่งมักไม่ก่อให้เกิดโรค แต่อ่อนภาคขนาดเล็กๆ จะเข้าไปสู่ถุงลมในปอด

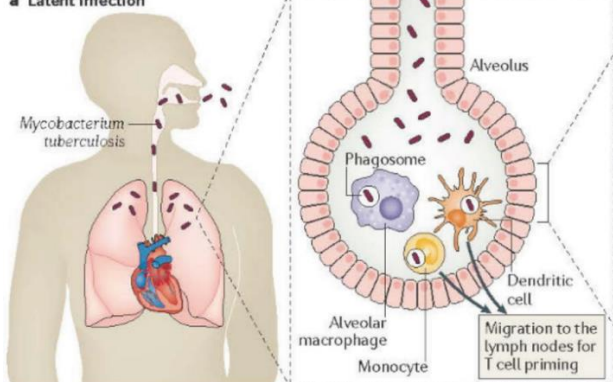
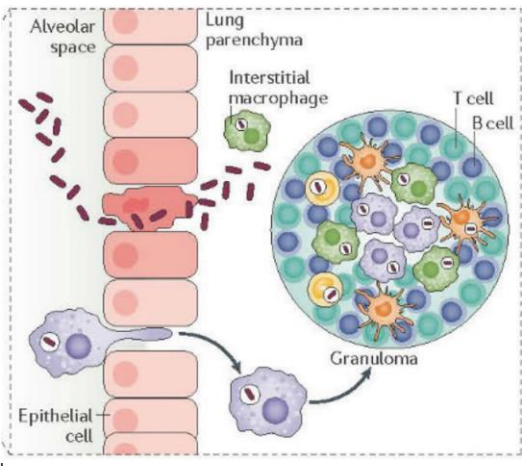
ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายเชื้อวัณโรค อาจแบ่งได้เป็น 3 ด้าน ดังนี้

1. ปัจจัยด้านผู้ป่วยวัณโรค เช่น การป่วยเป็นวัณโรคปอด หลอดลมหรือกล่องเสียง ในระยะที่มีเชื้อในเสมหะ ผู้ป่วยที่มีแผลโพรงในปอดจะมีเชื้อจำนวนมาก เมื่อมีอาการไอ จาม หรืออาการอื่นๆ ที่ทำให้เกิดการหายใจแรงๆ
2. ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น สถานที่อับทึบและคับแคบ แสงแดดส่องไม่ถึง การถ่ายเทอากาศไม่ดี
3. ปัจจัยด้านระบบบริการ เช่น การวินิจฉัยและรักษาล่าช้า การให้ยารักษาไม่ถูกต้อง การรักษาไม่ครบ การทำหัตถการที่ทำให้เกิดละอองฝอย (เช่น การกระตุ้นให้เกิดการไอ เป็นต้น)

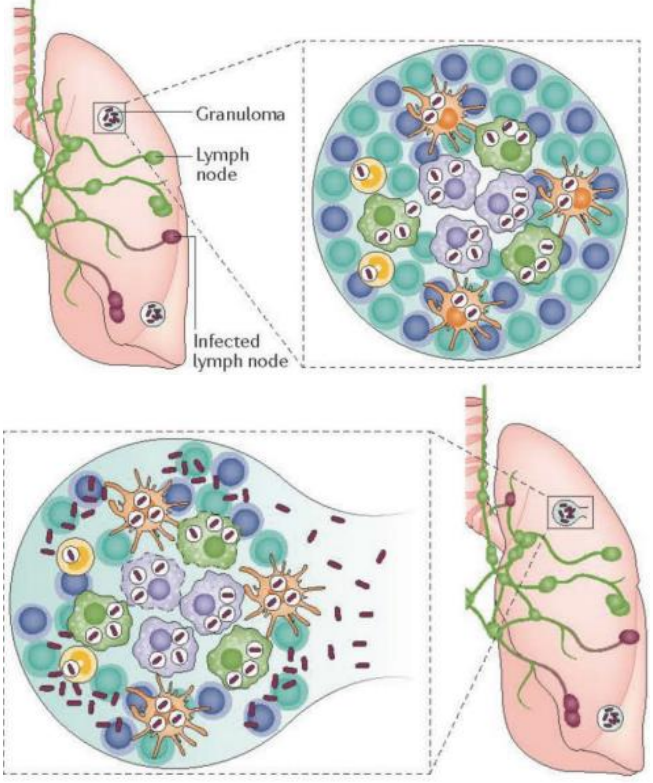
การติดเชื้อและการป่วยเป็นวัณโรค (TB infection and TB disease) เกิดจากเมื่อสูดหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าไปถึงถุงลมในปอด macrophage ในถุงลมปอดเป็นระบบภูมิคุ้มกันแรกที่สามารถกำจัดเชื้อได้ ทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อวัณโรค

ถ้าภูมิคุ้มกันด่านแรกไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปหมดได้ เชื้อวัณโรคมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น และสามารถผ่านผนังถุงลม (ซึ่งเชื้ออาจจะเข้าไปโดยตรง หรือโดย macrophages ที่มีเชื้อวัณโรค) เข้าไปยังเนื้อเยื่อของปอด ในขณะเดียวกัน dendritic cells และ monocytes จะนำเชื้อวัณโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองในปอด เพื่อสร้าง T cell เกิดกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้ง T cells และ B cells มารวมตัวที่เนื้อเยื่อปอด และล้อมรอบกลุ่ม macrophages และ cells อื่นๆ ที่มีเชื้อวัณโรคอยู่ เรียกว่า granuloma เป็นกระบวนการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (latent TB infection) (สำนักวัณโรค, 2564, หน้า 5-6) ดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 แสดงพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Latent TB infection , LTBI)

รูปภาพ	คำอธิบาย
 a Latent infection Alveolus Alveolar macrophage Monocyte Dendritic cell Phagosome Migration to the lymph nodes for T cell priming	เมื่อสูดหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าไปถึงถุงลมในปอด macrophage ในถุงลมปอดเป็นระบบภูมิคุ้มกันแรกที่สามารถกำจัดเชื้อได้ ทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อวัณโรค
 Alveolar space Lung parenchyma Interstitial macrophage T cell B cell Epithelial cell Granuloma ที่มา: Pai M, et al. Tuberculosis. Nat Rev Dis Primers. 2016.	ถ้าภูมิคุ้มกันด่านแรกไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ทั้งหมด เชื้อวัณโรคจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น และสามารถผ่านผนังถุงลม (ซึ่งเชื้ออาจจะเข้าไปโดยตรง หรือโดย macrophages ที่มีเชื้อวัณโรค) เข้าไปยังเนื้อเยื่อของปอด ในขณะเดียวกัน dendritic cells และ monocytes จะนำเชื้อวัณโรคไปยังต่อมน้ำเหลืองในปอด เพื่อสร้าง T cell เกิดกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทั้ง T cells และ B cells มารวมตัวที่เนื้อเยื่อปอด และล้อมรอบกลุ่ม macrophages และ cells อื่นๆ ที่มีเชื้อวัณโรคอยู่ เรียกว่า granuloma เป็นกระบวนการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (latent TB infection)

ตารางที่ 2-2 แสดงพยาธิกำเนิดของการป่วยวัณโรคลุกลาม (active TB disease)

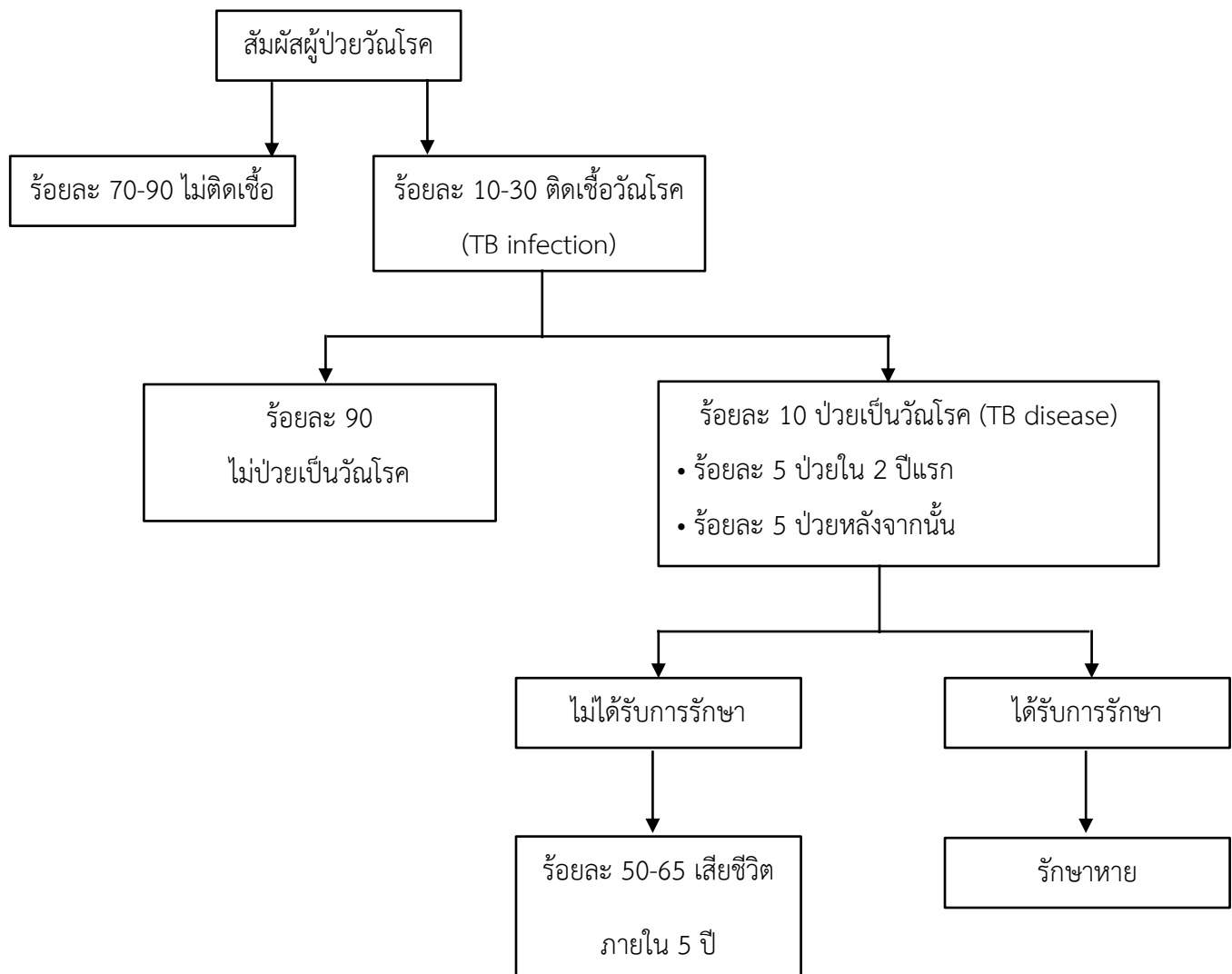
รูปภาพ	คำอธิบาย
 ที่มา: Pai M, et al. Tuberculosis. Nat Rev Dis Primers. 2016.	ถ้าเชื้อวัณโรคใน granuloma มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ มีปริมาณมากเกินไปที่ granuloma จะควบคุมได้ เชื้อจะสามารถเข้าสู่กระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังอวัยวะต่างๆ หรือกลับเข้ามายังระบบทางเดินหายใจ ทำให้เกิดพยาธิสภาพในปอดหรือ/และอวัยวะต่างๆ ได้ เป็นกระบวนการป่วยวัณโรคระยะลุกลาม (active TB disease)

ตารางที่ 2-3 ข้อแตกต่างระหว่างการติดเชื้อวัณโรคแฝงและการป่วยเป็นวัณโรค (สำนักวัณโรค, 2564, หน้า15-6)

ติดเชื้อวัณโรคแฝง (latent TB infection)	ป่วยเป็นวัณโรค (TB disease : Active TB)
มีเชื้อวัณโรคในร่างกายจำนวนน้อย เชื้อยังมีชีวิตแต่ไม่ลุกลาม (alive, but not active)	มีเชื้อวัณโรคในร่างกายจำนวนมาก เชื้อยังมีชีวิตและลุกลาม (active)
ไม่แพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น	อาจแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น
ไม่มีอาการ	อาจมีอาการใดอาการหนึ่ง ดังต่อไปนี้ ไอ ไข้ เจ็บหน้าอก ไอมีเลือดหรือเสมหะปน น้ำหนักลด เหงื่อออกผิดปกติตอนกลางคืน อ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย เบื่ออาหาร (ระยะเริ่มแรกอาจไม่มีอาการ)
ทดสอบ TST หรือ IGRA ให้ผล positive	ทดสอบ TST หรือ IGRA ให้ผล positive
ภาพถ่ายรังสีทรวงอก ปกติ	ภาพถ่ายรังสีทรวงอก มักพบความผิดปกติเข้าได้กับวัณโรค (แต่อาจจะปกติในกรณีที่ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันต่ำรุนแรงหรือเป็นวัณโรคนอกปอด)
การตรวจเสมหะ AFB smear หรือ culture ให้ผล negative	การตรวจเสมหะ AFB smear หรือ culture มักจะให้ผล positive (แต่อาจมีผล negative ได้ถ้าเป็นวัณโรคนอกปอด หรือวัณโรคที่มีแผลเล็กๆ หรือป่วยเป็นวัณโรคระยะเริ่มแรก)
พิจารณาให้การรักษา latent TB infection เพื่อป้องกันการเป็น active TB disease	ให้การรักษา active TB disease
ไม่จำเป็นต้องแยกจากบุคคลอื่น	อาจต้องแยกจากบุคคลอื่น
ไม่ใช่ผู้ป่วยวัณโรค	เป็นผู้ป่วยวัณโรค

(ที่มา: Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know; 2021.)

แผนภาพที่ 2-1 ธรรมชาติของการเกิดโรค



2.3 ยารักษาวัณโรคแนวที่หนึ่ง (First-line anti-TB drug, FLD)

วัณโรคเป็นเชื้อที่ทนทานมาก จึงจำเป็นต้องใช้ยาหลายตัวร่วมกันเพื่อให้สามารถควบคุมเชื้อได้อย่างรวดเร็ว ยารักษาวัณโรคแนวที่หนึ่ง (First-line anti-TB drug, FLD) เป็นสูตรยาสำหรับผู้ป่วยใหม่ที่เชื้อไวต่อยา (new patient regimen with drug susceptible) ที่ยังไม่เคยรักษา หรือ เคยรักษามาไม่เกิน 1 เดือน ด้วยสูตรยา 2HRZE / 4HR ซึ่งประกอบไปด้วยยา 4 ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดออกฤทธิ์ต่างกันไป ดังรูปที่ 2-1 ได้แก่

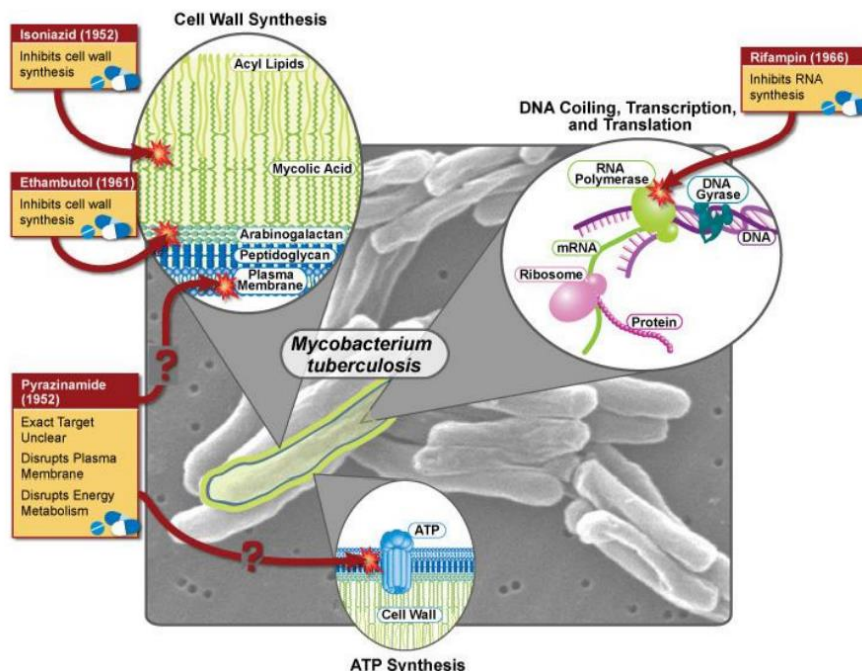
1. ไอโซไนอะซิด (Isoniazid : H) : ยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ cell wall ของ mycobacteria การจะออกฤทธิ์ได้ต้องอาศัยเอนไซม์ mycobacterial catalase peroxidase (Kat G) ของเชื้อ จะได้ active form ซึ่ง active form ของ INH จะจับกับ Acyl carriers protein (AcpM) และ beta-ketoacyl carrier protein synthase (KasA) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการสังเคราะห์ mycolic acid โดยการจับเป็นแบบ covalent ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์ mycolic acid จึงทำให้ยาไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ

2. ริแฟมพิซิน (Rifampicin : R) : สาร Rifampin จับกับ β -subunit ของ bacterial DNA-dependent RNA polymerase และยับยั้ง RNA synthesis ของเชื้อ โดยที่ rifampin จะจับกับ RNA polymerase ของแบคทีเรียเท่านั้น โดยไม่จับกับ RNA polymerase ของ eukaryotic cells จึงทำให้ยา Rifampicin ยับยั้งการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) ของเชื้อได้

3. ไพราซินามิด (Pyrazinamide : Z) : ยับยั้งเอนไซม์ Fatty acid synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้แบคทีเรียสังเคราะห์กรดไขมันสำหรับตัวเอง นอกจากนี้ยายังเข้าไปจับกับโปรตีนชนิด Ribosomal protein S1 มีผลไปยับยั้งกระบวนการ Trans-translation (กระบวนการสร้างโปรตีนในแบคทีเรีย) ด้วยกลไกข้างต้น จึงส่งผลทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้

4. อีแธมบูทอล (Ethambutol : E) : เป็น inhibitor ของเอนไซม์ mycobacterial arabinosyl transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ polymerization ของ arabinoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ mycobacterial cell wall จึงทำให้ยาไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของเชื้อ

รูปที่ 2-1 แสดงการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรค



(ที่มา : the Centers for Disease Control and Prevention, CDC/ Dr. Ray Butler; Janice Carr.)

2.4 การตรวจหาวัณโรคและวัณโรคดื้อยา ด้วยวิธี Line probe assay

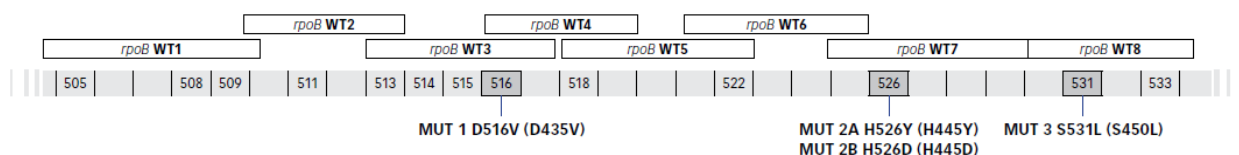
Line probe assay (LPA) เป็นการตรวจหาการดื้อยารักษาวัณโรคโดยการอ่านแผ่นแถบการตรวจ (Strip) ที่สามารถดูรูปแบบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคได้จากการอ่านแถบสีและวิเคราะห์รูปแบบของแถบสีที่ปรากฏขึ้นมา อาศัยหลักการ polymerase chain reaction และ reverse hybridization เพื่อตรวจจับชิ้นส่วนของเชื้อวัณโรค ในสิ่งส่งตรวจและตรวจจับส่วนของ nucleotide ใน gene ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา (single nucleotide polymorphisms: SNPs) โดยต้องมีจำนวนเชื้ออย่างน้อย 160 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้วิธีนี้จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ที่มีศักยภาพสำหรับงานด้านอนุชีวโมเลกุล และบุคลากรต้องมีความชำนาญ (สำนักวัณโรค, 2562, หน้า 36) ปัจจุบันมีการใช้ LPA ในการทดสอบการดื้อยาทั้งยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ได้แก่ Isoniazid และ Rifampicin ซึ่งเป็นยาชนิดหลักและสำคัญในการรักษาวัณโรค การดื้อต่อยา Isoniazid ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *katG* และ *inhA* ส่วนการดื้อต่อยา Rifampicin จะตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ซึ่งความไวของการทดสอบหาการดื้อยา Isoniazid และ Rifampicin อยู่ที่ 94.5% และ 95.8% ตามลำดับ ส่วนความจำเพาะอยู่ที่ 99.3% และ 98.4% การทดสอบการดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 2 ด้วยวิธี LPA สามารถทดสอบการดื้อยาได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Fluoroquinolones และ กลุ่ม second-line injectable drugs ความไวของการทดสอบหาการ

ตัวยารักษาวัณโรคแนวที่ 2 น้อยกว่าการทดสอบหาการดื้อยารักษาวัณโรคแนวที่ 1 ซึ่งกลุ่ม Fluoroquinolones และ กลุ่ม second-line injectable drugs มีความไวของการทดสอบอยู่ที่ 86.2% และ 87.0% ตามลำดับ ส่วนความจำเพาะอยู่ที่ 98.6% และ 99.5% ตามลำดับ (Bruker Daltonics GmbH & Co, 2023; Hain Lifescience, 2012)

การตรวจหาการดื้อยา Rifampicin โดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ ยีน *rpoB* ส่วนตรวจหาการดื้อยา Isoniazid สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ 2 ยีน โดยยีน *katG* เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ Catalase peroxidase เพื่อเปลี่ยน Isoniazid จาก pro-drug ให้เป็น active form โดยการกลายพันธุ์นี้ จะสัมพันธ์กับ high level resistance คือ เชื้อจะดื้อต่อยา Isoniazid ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ส่วนยีน *inhA* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ Isoniazid มาออกฤทธิ์ ถ้ามีการกลายพันธุ์จะสัมพันธ์กับ low level resistance คือเชื้อดื้อต่อ 0.2 µg/mL แต่อย่างไรก็ตาม Isoniazid ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL ซึ่งในกลุ่มนี้ยังสามารถพิจารณาใช้ Isoniazid ในขนาดที่สูงขึ้นในการรักษาได้ (วรวัฒน์ จำปาเงิน และคณะ, 2561 หน้า 1-9)

การตรวจหาการดื้อยา Rifampicin เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของ ยีน *rpoB* ที่ตำแหน่ง codon 505 ถึง 533 ส่วนการตรวจหาการดื้อยา Isoniazid สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ 2 ยีน โดยยีน *inhA* ตรวจการกลายพันธุ์ของ *inhA* promoter ที่ตำแหน่ง -16 ถึง -8 nucleotides upstream และยีน *katG* ตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 315 ซึ่งครอบคลุม WT probes (wild-type probes) และจำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของ MUT probes (Mutations probes) โดยบน Strip จะเคลือบด้วย probe ที่จำเพาะ ทั้ง WT probes และ MUT probes ดังรูปที่ 2-2

รูปที่ 2-2 แสดงตำแหน่งที่มักพบการดื้อยา Rifampicin ของยีน *rpoB* ที่ชุดตรวจ GenoType MTBDRplus สามารถตรวจหาการดื้อยา Rifampicin ได้



(ที่มา : Hain, 2012)

การทดสอบด้วยเทคนิค Line probe assay (LPA) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่

1) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยหลักการ polymerase chain reaction

เป็นการเพิ่มจำนวนยีนหรือชิ้นส่วน DNA ที่สนใจในหลอดทดลองแบบซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ (repeated cycles) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ polymerase โดยจำนวน DNA ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเป็นลักษณะแบบ exponential curve คำนวณได้เท่ากับ 2^n (เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำ PCR) จนถึงระยะหนึ่งที่ปริมาณของ PCR product คงที่ และองค์ประกอบในการทำ PCR ลดลงซึ่งการดำเนินไปของปฏิกิริยาจะไม่ให้ product ตามสูตร 2^n จะเรียกสิ่งที่เกิดขึ้นนี้ ว่าปรากฏการณ์ “plateau effect” โดยองค์ประกอบในการทำ PCR มีดังนี้ (FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 48-49; เมธี ศรีประพันธ์, 2557)

1.1 Template หรือ DNA ตั้งต้น

1.2 Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์(oligonucleotides) สายสั้น นิยมใช้ความยาวประมาณ 18 – 26 bp

1.3 Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วย dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ A, T, C, G ที่จะใช้ในการสร้าง PCR product สายใหม่

1.4 Thermostable DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสาย DNA เส้นใหม่หรือ PCR product ใน ตำแหน่งยีนที่ต้องการโดยการนำ deoxynucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่เบส A, T, C G มาต่อในตำแหน่งที่ถัด จาก primers ในแต่ละข้างด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์โดยให้มีความจำเพาะกับ DNA ต้นแบบในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ (polymerase activity) รวมถึงเอนไซม์ยังทำหน้าที่ในการตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ในบริเวณที่มีการเติมเบส A, T, C, G ไม่ถูกต้องในทิศทาง $3' \rightarrow 5'$ (exonuclease activity) หรือ proofreading activity โดย เอนไซม์ที่จะต้องมีประสิทธิภาพในการทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงโดยเอนไซม์ที่นิยมใช้มากที่สุดในงาน PCR คือ Taq DNA polymerase แต่ถ้าต้องการความถูกต้องของการสร้างสาย DNA อาจใช้ Pfu DNA polymerase ในปฏิกิริยา PCR ปกติ จะใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ 2.5-5 unit/100μl ของ PCR reaction

1.5 PCR buffer และองค์ประกอบอื่นๆ ในปฏิกิริยา PCR โดย PCR buffer จะช่วยให้ปฏิกิริยา PCR เกิดได้ อย่างมีประสิทธิภาพโดย buffer จะสอดคล้องกับชนิดของ DNA polymerase ที่ใช้

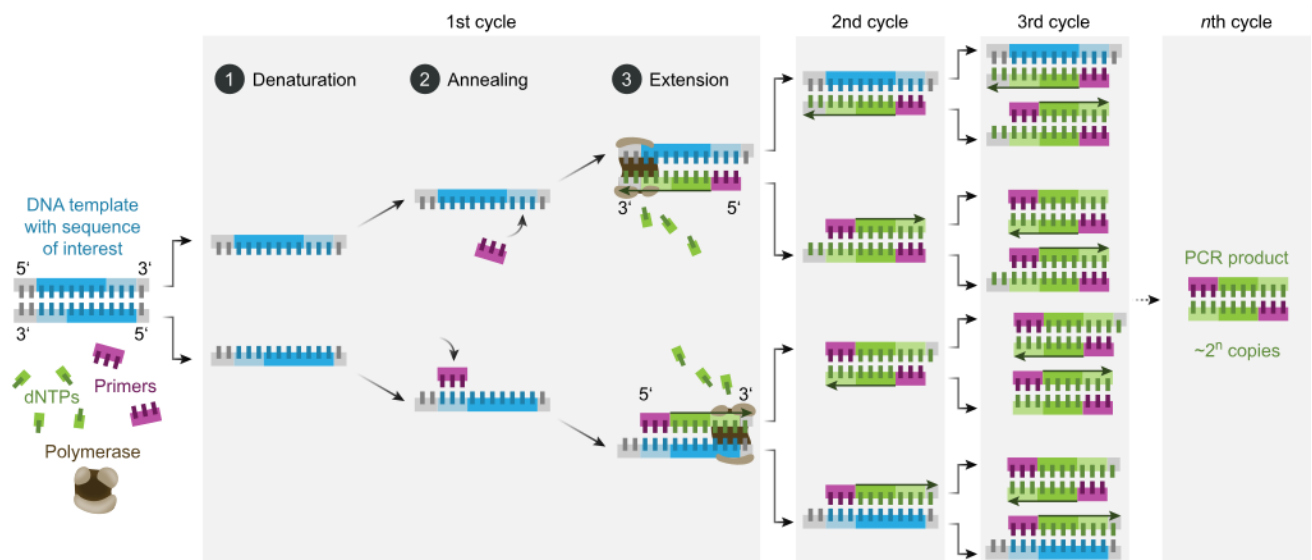
ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation step เป็นขั้นตอนแยกสาย DNA template สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Annealing step เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ primers ในปฏิกิริยา PCR เข้าจับกับ DNA template ในตำแหน่งที่จำเพาะ เพื่อเตรียมที่จะสร้าง PCR product ใหม่ ขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส

3. Extension step เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่โดยเริ่มจากจุดต้นของ primers ใน DNA template แต่ละข้างโดยการนำ dNTPs ต่างๆ มาต่อกันในลักษณะที่คู่สมกับ DNA template ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase โดยจะต้องใช้อุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้

รูปที่ 2-3 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR



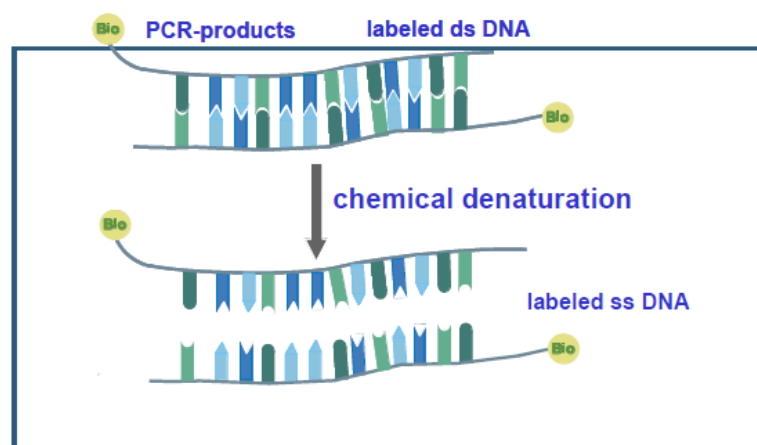
(ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction#/media/File:Polymerase_chain_reaction-en.svg)

2) ย้อมสีแถบการตรวจ (Strip) ด้วยหลักการ Reverse hybridization

เป็นการตรวจหาชนิดของการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอได้หลายชนิดในการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว โดยนำ PCR product (Amplicons) ที่ติดฉลากด้วย biotin มาทำปฏิกิริยากับ probe ที่ตรึงอยู่บนแผ่นไนลอนเมมเบรน หลังจากนั้นตรวจวัดการเกิดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารตั้งต้น (Substrate) ซึ่งขั้นตอนของปฏิกิริยา Reverse hybridization ของน้ำยา GenoType® MTBDRplus^[2] มีดังนี้

2.1 แยกสาย DNA ของ Amplicons ที่ติดฉลากด้วย biotin ด้วย sodium hydroxide (DEN buffer) เป็น single stranded DNA (ssDNA) **รูปที่ 2-4**

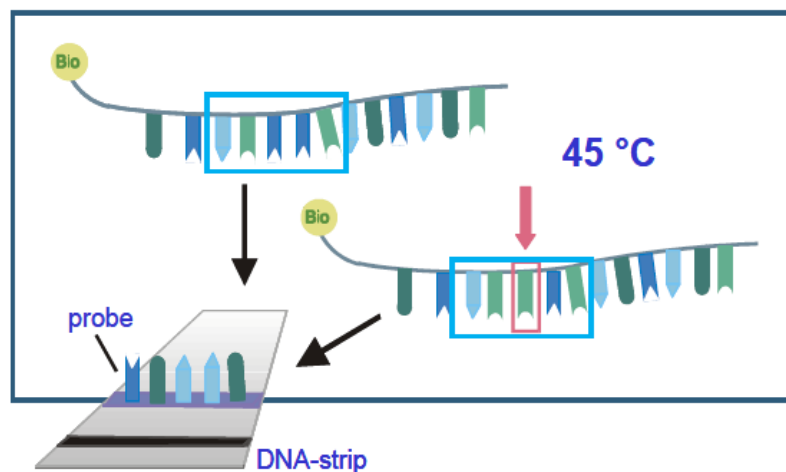
รูปที่ 2-4 แสดงการทำปฏิกิริยาของ sodium hydroxide (DEN buffer)



(ที่มา : FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 58)

2.2 เมื่อเติม green hybridization buffer (HYB) จะทำให้เกิดปฏิกิริยา hybridization ของ Amplicons ที่ติดฉลากด้วย biotin กับ probe โดยการจับกันอย่างจำเพาะ ในขณะที่มีบางตำแหน่งอาจจะไม่จำเพาะกับ Probe ตามลูกศรสีแดง ใน**รูปที่ 2-5**

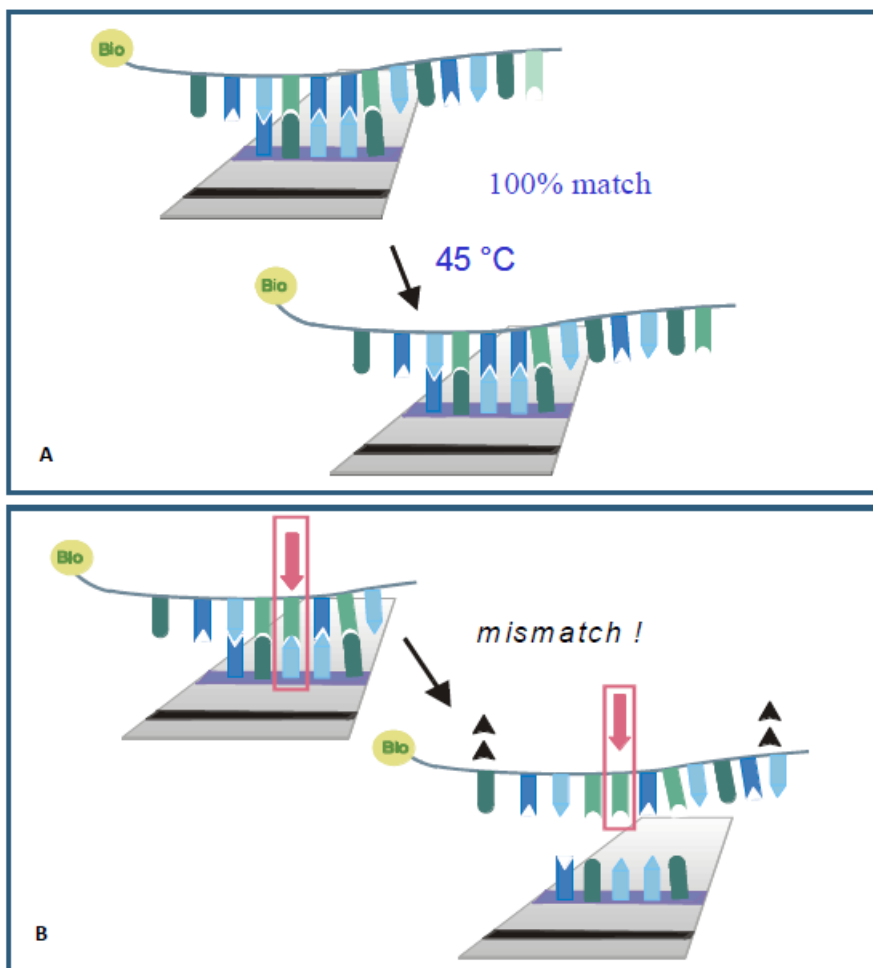
รูปที่ 2-5 แสดงการทำปฏิกิริยา hybridization เติม green hybridization buffer (HYB)



(ที่มา : FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 58)

2.3 ในตำแหน่งที่ Amplicons ที่ติดฉลากด้วย biotin กับ probe จับกันไม่จำเพาะ เมื่อเติม stringent wash buffer (STR) ก็จะหลุดออกจากกัน เพื่อป้องกันการเกิด non-specific bands บน strip wash โดยใน(A) แสดงถึงการจับกันอย่างจำเพาะของ Amplicons กับ probe (A=T & C≡G) และ (B) แสดงถึงการจับที่ไม่จำเพาะของ single nucleotide เมื่อทำปฏิกิริยาด้วย stringent wash buffer (STR) ก็จะหลุดออกจากกัน เพื่อป้องกันการเกิด non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา hybridization ดังรูปที่ 2-5

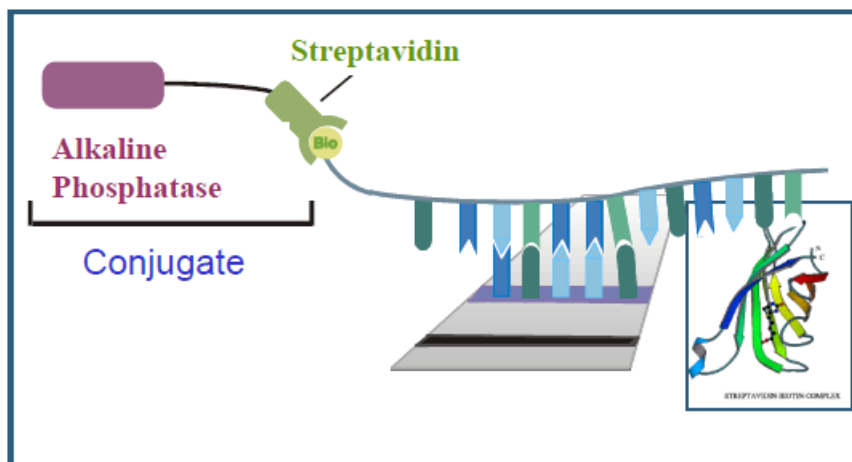
รูปที่ 2-6 แสดงการเกิด non-specific bands บน strip จากปฏิกิริยา hybridization



(ที่มา : FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 60)

2.4 conjugation buffer ซึ่งประกอบด้วย streptavidin-alkaline phosphatase เมื่อเติมลงไป streptavidin จับกับ biotin ดังรูปที่ 2-6

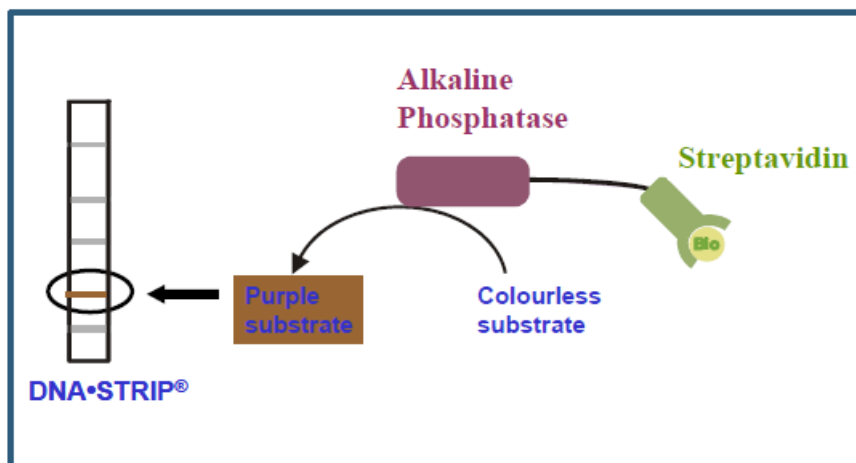
รูปที่ 2-7 แสดงการทำปฏิกิริยาของ conjugation buffer



(ที่มา : FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 61)

2.5 เมื่อเติม Substrate (hydrogen peroxide) ลงไป ไปจับกับ alkaline phosphatase ทำให้แถบบน stipe เปลี่ยนจากไม่มีสี เป็นสีม่วง ทำให้สามารถอ่านแถบที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่าได้ ดังรูปที่ 2-7

รูปที่ 2-8 แสดงการทำปฏิกิริยาของ Substrate



(ที่มา : FIND foundation for innovative new diagnostics, 2008, หน้า 62)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study) ทำการศึกษาตัวอย่างเสมหะที่พบเชื้อ acid-fast bacilli (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ส่งมาตรวจการดื้อยาวัณโรคแนวที่ 1 ทางวิธีอณูชีววิทยา ด้วยเทคนิค Line probe assay ที่ สคร.11 ในปีงบประมาณ 2563-2565 จำนวนทั้งสิ้น 6,262 ตัวอย่าง แบ่งตามประเภทของผู้ป่วยได้ 3 กลุ่ม จำนวนที่สูงที่สุดได้แก่ ผู้ป่วยรายใหม่ (New case) จำนวน 4,948 ตัวอย่าง, ผู้ป่วยที่กำลังรักษา (On-treatment) จำนวน 904 ตัวอย่าง และผู้ป่วยที่เคยมีประวัติเป็นวัณโรค (Re-treatment) จำนวน 410 ตัวอย่าง

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างผู้ป่วยที่พบว่ามีความผิดปกติจากภาพถ่ายรังสีทรวงอก และผลการตรวจเสมหะพบเชื้อ acid-fast bacilli (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำมาตรวจการดื้อยาวัณโรคแนวที่ 1 ทางวิธีอณูชีววิทยา ด้วยเทคนิค Line probe assay เพื่อตรวจการดื้อยา Rifampicin และ Isoniazid

3.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ผู้ป่วยมีอาการเข้าข่ายสงสัยวัณโรคที่มีความผิดปกติจากภาพถ่ายรังสีทรวงอก เก็บตัวอย่างเสมหะหลังตื่นนอนตอนเช้า (Collect sputum) เพื่อนำตรวจหาเชื้อ acid-fast bacilli (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ก่อนนำตัวอย่างส่งมาตรวจการดื้อยาวัณโรคแนวที่ 1 ทางวิธีอณูชีววิทยา ด้วยเทคนิค Line probe assay ที่ สคร.11

3.3 พื้นที่ศึกษา

โรงพยาบาลต่างๆ ในเขตสุขภาพที่ 11 (7 จังหวัดภาคใต้ตอนบน) ที่ส่งมาตรวจที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 11 จังหวัดนครศรีธรรมราช

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 วัสดุ และ อุปกรณ์

3.4.1 Biosafety Cabinets Class II

3.4.2 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาโพลีเมอเรส (PCR Thermal cycler)

3.4.3 Twin shaking water bath

3.4.4 เครื่อง TwinCubator®

3.4.5 เครื่องสำรองไฟฟ้า (UPS)

3.4.6 Tube พลาสติกกันแหลม มีฝาปิด ขนาด 50 ml

3.4.7 Centrifuge ที่ใส่ Tube ฝาปิดขนาด 50 ml ที่ปั่นความเร็วรอบได้ 3,000 g

3.4.8 Micro-centrifuge ที่ใช้ปั่น Eppendorf Tube 1.5 ml ความเร็วรอบตั้งแต่ 4,000 - 13,000 rpm

3.4.9 Micro-centrifuge ที่ใช้ปั่น Eppendorf Tube ขนาด 0.2 ml

3.4.10 Microtube rack สำหรับ Eppendorf Tube ขนาด 1.5 ml

3.4.11 Microtube rack สำหรับ Eppendorf Tube ขนาด 0.2 ml

3.4.12 Eppendorf Tube ขนาด 1.5 ml

3.4.13 Heat block (100 °C)

3.4.14 Vortex

3.4.15 Auto pipette + Tip ขนาด 1-10 µl

3.4.16 Auto pipette + Tip ขนาด 10-100 µl

3.4.17 Auto pipette + Tip ขนาด 100 – 1000 µl

3.4.18 Auto pipette + Tip ขนาด 1-5 ml

3.4.19 นาฬิกาจับเวลา

3.4.20 Forceps

3.4.2 น้ำยา

3.5.1 GenoLyse® (Hain LifeScience, Nehren, Germany)

3.5.2 Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain LifeScience, Nehren, Germany)

3.4.3 วิธีการทดสอบ

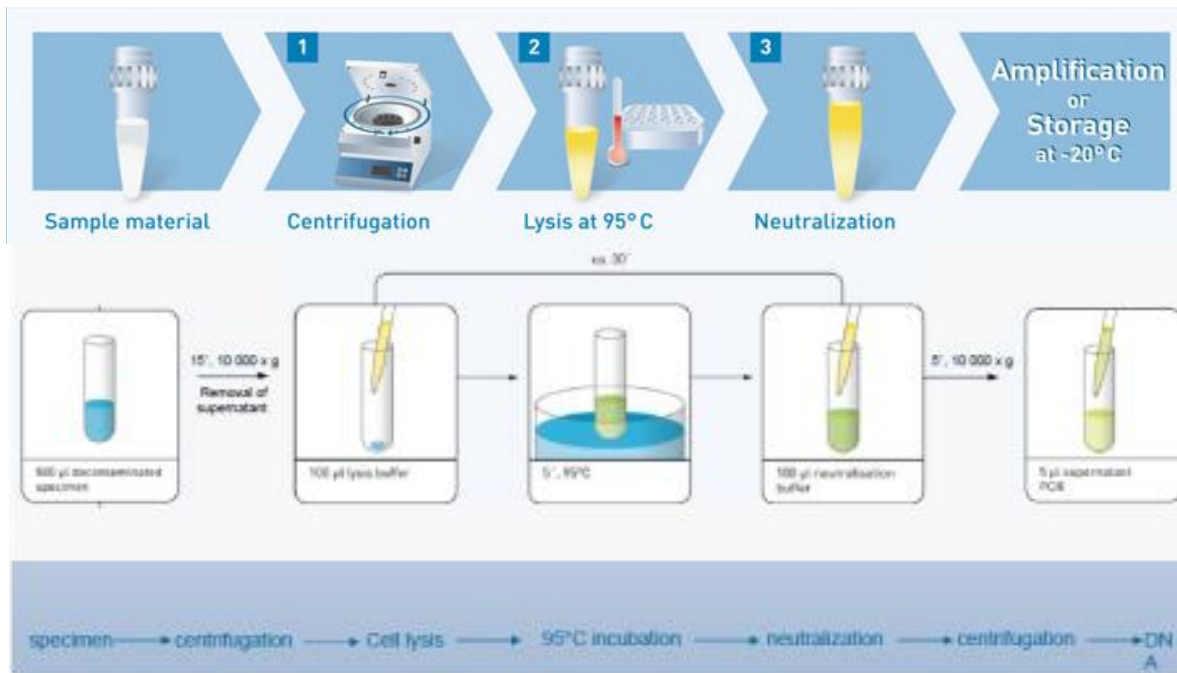
3.4.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม

- 1) ดูดตะกอนเสมหะ (treated sputum) ปริมาณ 500 µl ใส่หลอดทดลอง screw cap tube ขนาด 1.5 ml
- 2) ปั่นที่ 13,500 rpm, นาน 5 นาที
- 3) ใช้ micropipette ดูด supernatant ทิ้งให้หมด
- 4) เติม 100 µl ของ Lysis Buffer (A-LYS) vortex , Spin down บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิ 95°C ใน

waterbath

- 5) เติม 100 μl ของ Neutralization Buffer (A-NB) vortex แล้ว Centrifuge full speed 5 นาที
- 6) คูด supernatant 100 μ (DNA solution) เก็บใส่ หลอดทดลอง screw cap tube ขนาด 1.5 ml เก็บที่-20°C
- 7) คูด DNA solution 5 μl ไปทำการทดสอบด้วยเทคนิค Line probe assay ต่อ

รูปที่ 3-1 แสดงขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม



3.4.3.2 การตรวจหาไวรัสโรคติดต่อ ด้วยเทคนิค Line probe assay

1. ขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification)

1.1 เตรียม Amplification Reagent mix ในห้องเตรียม DNA

- Amplification Mixes A (AM-A) ประกอบด้วย Buffer, Nucleotides, Taq polymerase
- Amplification Mixes B (AM-B) ประกอบด้วย Salts, Specific primers, Dye

ตารางที่ 3-1 แสดงปริมาณการเตรียม Amplification Reagent mix 1 ตัวอย่าง

Reagent	Volume
AM-A	10 μl
AM-B	35 μl
DNA solution	5 μl
Final Volume	50 μl / 1 sample

1.2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) ด้วยเครื่อง GTQ-Cycler 24

Manual

1. ปุ่มเปิด-ปิดอยู่ด้านหลังเครื่อง
2. เปิด-ปิดฝาเครื่องให้ล็อกเข้าที่ ใส่ Reaction Tube (0.2 ml) ในเครื่อง GTQ-Cycler 24
3. Start PCR Program เลือก “Run Program” บนหน้าจอ
4. เลือก Program ที่จะใช้ Run; “MDR DIR” = Clinical specimens

ตารางที่ 3-2 แสดงอุณหภูมิแต่ละรอบ ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification)

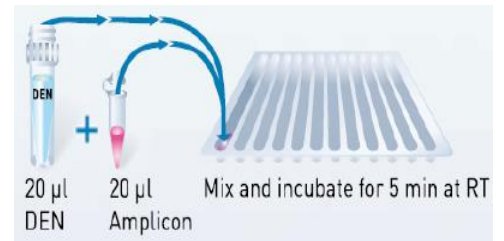
เวลา	อุณหภูมิ	จำนวนรอบ
15 นาที	95°C	1 รอบ
30 วินาที	95°C	20 รอบ
2 นาที	65°C	
25 วินาที	95°C	30 รอบ
40 วินาที	50°C	
40 วินาที	70°C	
8 นาที	70°C	1 รอบ
Heating rate		≤2.2°C / วินาที

5. เลือก Reaction Volume ที่ต้องการ เลือก “50 µl” กด “OK”
6. รายละเอียด Program ขึ้นที่หน้าจอ Touch Screen ดู “Temperature Curve” เลือก “View Trace”
7. หลังจาก Program Run เสร็จ จั๊บเวลา ≈ 2 Hrs จะมีข้อความ “Unit IS IDLE” ขึ้นที่หน้าจอขวาบน แต่ถ้าขึ้น “Unit Holding” แสดงว่ากำลัง Run Test อีกรอบ กด Stop ได้เลย
8. End Program: กด “Stop” เข้า “Display ที่ Home” แล้ว Switch Off ปิดเครื่อง
9. Amplification product สามารถเก็บได้ที่ 8 ถึง -20 °C

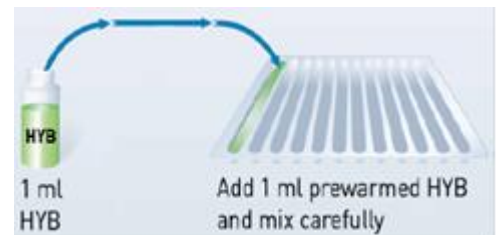
2. ขั้นตอนตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Hybridization โดยนำ PCR Product มา hybrid กับ probe บน nylon membrane strip และนำไปทำปฏิกิริยา chromogenic reaction

1. อุ้มน้ำยา HYB และ STR ที่อุณหภูมิ 45 °C ส่วน RIN และ น้ำกลั่นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. เติม 20 µl ของ Denaturation Solution คุณสมบัตินี้เพื่อ Denature DNA amplicons (DEN, ฝาสีฟ้า) ตรงมุมwellsของ Plastic Tray และ เติม 20 µl ของ DNA amplicon (PCR product สีม่วง) ปิเปิดขึ้นลงเพื่อ mix บ่มที่ อุณหภูมิห้อง 5 นาที



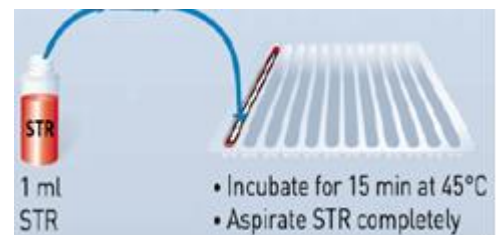
3. เติม 1 ml ของHybridization Buffer (HYB, ฝาสีเขียว) ด้านตรงข้ามกับwell ที่ใส่สารไว้ครั้งแรก พลิกTrayขึ้นลงจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenous) <ระวังปิเปิดโดนTrayหรือ Liquid>



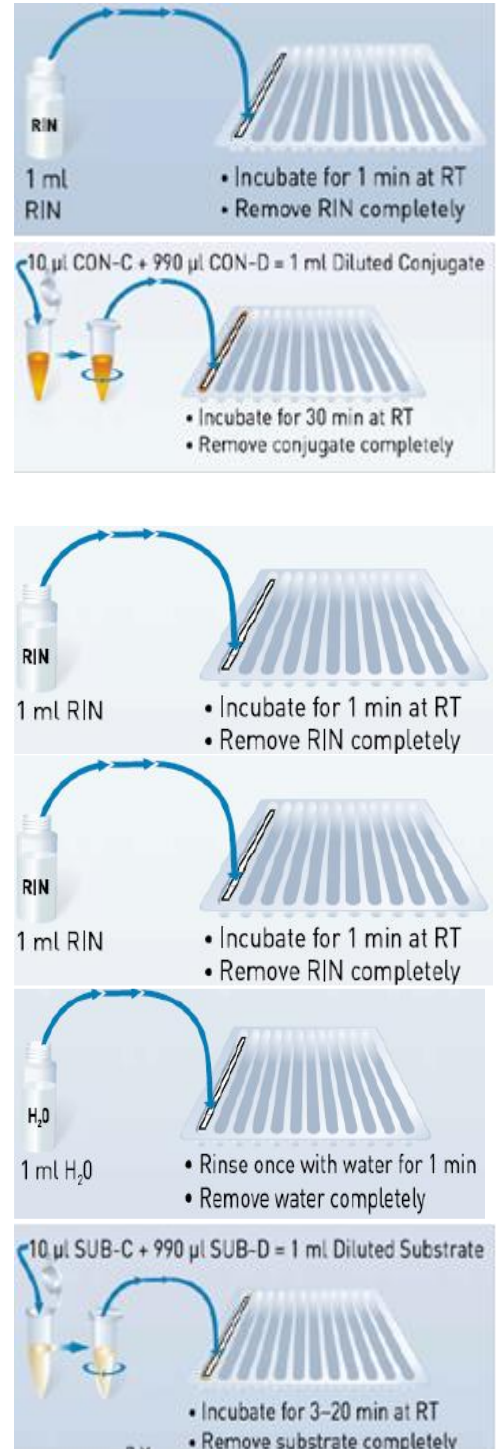
4. วางแผ่น DNA STRIP ลงใน well ของ Plastic Tray (เอาด้านตัวเลขไว้ด้านล่างTray) นำ Plastic Tray วางบนภาชนะให้ความร้อนของเครื่อง TwinCubator® บ่มที่ 45 °C 30 นาที (Program P1 Step1) แล้วใช้ Pasteur pipette ดูด Hybridization Buffer (HYB) ออกจาก well



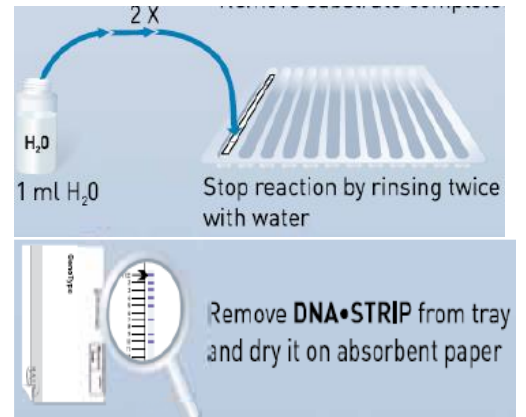
5. เติม 1 ml ของ Stringen Wash Solution (STR, ฝาสีแดง) บ่มที่ 45 °C 15 นาที Shake บน TwinCubator®(Program P1 Step2) แล้วใช้ Pasteur pipette ดูด Stringen Wash Solution (STR) ออกจาก well



6. ล้าง Strip ด้วย 1 ml ของ Rinse Solution (RIN)
1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง Shake บน
TwinCubator® (Program P1 Step3) แล้วเท
RINทิ้งและคว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษ
7. เติม 1 ml ของ Diluted Conjugate (10 μ l
CON-C + 990 μ l CON-D) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30
นาที Shake บน TwinCubator® (Program P1
Step4) แล้วล้าง Conjugate ออกด้วยน้ำและคว่ำ
Tray ลงซับกับกระดาษ
8. ล้าง Strip ด้วย 1 ml ของ Rinse Solution (RIN)
1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง Shake บน
TwinCubator® (Program P1 Step5) แล้วเท
RINทิ้งและคว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษ
9. ล้าง Strip อีกครั้งด้วย 1 ml ของ Rinse
Solution (RIN) 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง Shake บน
TwinCubator® (Program P1 Step6)
แล้วเท RIN ทิ้งและคว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษ
10. แล้วเติม 1 ml ของน้ำกลั่น 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
Shake บน TwinCubator® (Program P1
Step7) แล้วเทน้ำกลั่นทิ้งและ
คว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษ
11. เติม 1 ml ของ Diluted substrate (10 μ l SUB-
C + 990 μ l SUB-D) บ่มระหว่างเวลา 3-20 นาที
ที่อุณหภูมิห้อง (Program P1 Step8) เพื่อให้สี
ของ Background ชัดเจนขึ้นเท Substrate ทิ้งและ
คว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษ



12. หยุดการทำปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ
(Program P1 Step9, 10) แล้วเทน้ำกลั่นทิ้งและ
คว่ำ Tray ลงซับกับกระดาษแล้วหยิบแผ่น Strip มา
อ่านผล
13. วางแถบ Strip ลงบน data sheet และแปลผล



3. อ่านผลและแปลผลการทดสอบ

- 1) วาง membrane strips บน data sheet
- 2) แปลผลจาก data sheet โดยเมื่อวาง strips บน data sheet ส่วนบนของ strip ควรวางให้ตรง
Marker lane บน sheet (ตามภาคผนวกที่ 1)

ตารางที่ 3-3 แสดงการแปลผลการทดสอบ

ตำแหน่งแถบ	การแปลผลการทดสอบ
Marker lane	ตำแหน่งส่วนบนสุดของ membrane
TUB	มีเชื้อ <i>Mycobacterium spp.</i>
Conjugate Control (CC)	มีการจับกันของ conjugate บน Strip กับ chromogenic reagent แสดงถึงการทำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ในขั้นตอน Conjugation
Amplification Control (AC)	มีการจับกันของ Substrate กับ Alkaline Phosphatase ทำให้แถบทดสอบเปลี่ยนเป็นสีม่วง แสดงถึงการทำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ในขั้นตอน Amplification
<i>rpoB</i> MT probe	มีแถบขึ้นแสดงถึงการกลายพันธุ์ของยีน <i>rpoB</i> ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Rifampicin
<i>rpoB</i> WT probe	มีแถบขึ้นแสดงสายพันธุ์ดั้งเดิม หรือ สายพันธุ์ปกติ (Wild type) ของยีน <i>rpoB</i> ที่ไม่มีการดื้อยา Rifampicin
<i>katG</i> MT probe	มีแถบขึ้นแสดงถึงการกลายพันธุ์ของยีน <i>katG</i> ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Isoniazid
<i>katG</i> WT probe	มีแถบขึ้นแสดงสายพันธุ์ดั้งเดิม หรือ สายพันธุ์ปกติ (Wild type) ของยีน <i>katG</i> ที่ไม่มีการดื้อยา Isoniazid
<i>inhA</i> MT probe	มีแถบขึ้นแสดงถึงการกลายพันธุ์ของยีน <i>inhA</i> ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยา Isoniazid
<i>inhA</i> WT probe	มีแถบขึ้นแสดงสายพันธุ์ดั้งเดิม หรือ สายพันธุ์ปกติ (Wild type) ของยีน <i>inhA</i> ที่ไม่มีการดื้อยา Isoniazid

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะบวกที่นำมาตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line probe assay ในปีงบประมาณ 2563 ถึง 2565 จำนวนทั้งสิ้น 6,262 ตัวอย่าง แบ่งตามประเภทของผู้ป่วยได้ 3 กลุ่ม จำนวนที่สูงที่สุดได้แก่ ผู้ป่วยรายใหม่ (New case) จำนวน 4,948 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 79.02 รองลงมา คือ ผู้ป่วยที่กำลังรักษา (On-treatment) จำนวน 904 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 14.43 และผู้ป่วยที่เคยมีประวัติเป็นวัณโรค (Re-treatment) จำนวน 410 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.55 ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แสดงจำนวนตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะบวกที่นำมาตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line probe assay โดยแบ่งตามประเภทของผู้ป่วย

ประเภทของผู้ป่วย	ปีงบประมาณ			รวม
	2563	2564	2565	
ผู้ป่วยรายใหม่ (New case)	2116 (79.94%)	1800 (76.50%)	1032 (81.77%)	4,948 (79.02%)
ผู้ป่วยที่เคยมีประวัติเป็นวัณโรค (Re-treatment)	186 (7.03%)	153 (6.50%)	71 (5.63%)	410 (6.55%)
ผู้ป่วยที่กำลังรักษา (On-treatment)	345 (13.03%)	400 (17.00%)	159 (12.60%)	904 (14.43%)
รวม	2,647	2,353	1,262	6,262

จากการตรวจวัณโรคด้วยวิธี Line probe assay ของตัวอย่างในปีงบประมาณ 2563 ถึง 2565 พบว่าตัวอย่างผู้ป่วยรายใหม่ (New case) มีอัตราการดื้อยา Isoniazid ไม่แตกต่างกัน คือ ร้อยละ 12 อัตราการดื้อยา Rifampicin มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือ ร้อยละ 0.09, 0.17 และ 0.58 ตามลำดับ และพบว่าอัตราการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) ทั้ง 3 ปี ไม่แตกต่างกันมาก โดยอยู่ในช่วงร้อยละ 0.5 ถึง ร้อยละ 0.8 ดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 แสดงผลการตรวจหาการดื้อยาวัณโรคในผู้ป่วยรายใหม่ (New case)

ประเภทการดื้อยา	ปีงบประมาณ			รวม
	2563	2564	2565	
ผู้ป่วยรายใหม่ (New case) ทั้งหมด	2116	1800	1032	4,948
- วัณโรคดื้อยา Isoniazid	257 (12.15%)	224 (12.44%)	128 (12.40%)	609 (12.31%)
- วัณโรคดื้อยา Rifampicin	2 (0.09%)	3 (0.17%)	6 (0.58%)	11 (0.22%)
- วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB)	11 (0.52%)	15 (0.83%)	6 (0.58%)	32 (0.65%)
- ผู้ป่วย RR+/MDR	13 (0.61%)	18 (1%)	12 (1.16%)	43 (0.87%)

วัณโรคชนิด RR+/MDR ในปีงบประมาณ 2563 ถึง 2565 มีจำนวนทั้งหมด 43 ราย พบว่า จ. นครศรีธรรมราช มีผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR สูงที่สุด คิดเป็นร้อยละ 25.58 แต่ในปีงบประมาณ 2563 มีผู้ป่วย RR+/MDR สูงที่สุดพบใน จ.สุราษฎร์ธานี ปีงบประมาณ 2564 ได้แก่ จ.นครศรีธรรมราช และ จ.ภูเก็ต ส่วนในปีงบประมาณ 2565 ได้แก่ จ.ชุมพร ดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 แสดงผลพบวัณโรคชนิด RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11

จังหวัด	ปีงบประมาณ			รวม
	2563	2564	2565	
นครศรีธรรมราช	3	4	4	11 (25.58%)
สุราษฎร์ธานี	4	3	1	8 (18.60%)
ชุมพร	0	3	5	8 (18.60%)
กระบี่	3	1	2	6 (13.95%)
ภูเก็ต	2	4	0	6 (13.95%)
ระนอง	0	1	0	1 (2.33%)
พังงา	1	2	0	3 (6.98%)
รวม	13 (30.23%)	18 (41.86%)	12 (27.91%)	43 (100%)

ในเขตสุขภาพที่ 11 จังหวัดที่มีความชุกของวัณโรคชนิด RR+/MDR สูงที่สุด ในปีงบประมาณ 2563, 2564 และ 2565 คือ จังหวัดกระบี่, จังหวัดภูเก็ต และจังหวัดชุมพร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ความชุกของวัณโรคดื้อยา RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11

จังหวัด	ความชุกของวัณโรคดื้อยา RR+/MDR (ต่อแสนประชากร)		
	2563	2564	2565
นครศรีธรรมราช	0.19	0.26	0.26
สุราษฎร์ธานี	0.37	0.28	0.09
ชุมพร	0.00	0.59	0.98
กระบี่	0.63	0.21	0.42
ภูเก็ต	0.48	0.95	0.00
ระนอง	0.00	0.51	0.00
พังงา	0.37	0.75	0.00
รวม	0.29	0.40	0.27

จากการศึกษาประวัติของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) ที่บันทึกในโปรแกรม NTIP จำนวน 43 ราย พบว่า ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มประชากรเสี่ยงต่อวัณโรค คิดเป็นร้อยละ 34.88 รองลงมาคือ ผู้ป่วย HIV คิดเป็นร้อยละ 13.95 ดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 แสดงความเกี่ยวข้องของประวัติผู้ป่วยกับการดื้อยา RR+/MDR ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11

ประวัติผู้ป่วย	2563	2564	2565	รวม
ประชากรเสี่ยงต่อวัณโรค	4 (26.67%)	6 (40%)	5 (33.33%)	15 (34.88%)
ผู้ป่วย HIV	1 (16.67%)	2 (33.33%)	3 (50%)	6 (13.95%)
ผู้สัมผัสใกล้ชิด	3 (60%)	2 (40%)	0	5 (11.63%)
ผู้สัมผัสร่วมบ้าน TB	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)	5 (9.30%)
แรงงานต่างด้าว	2 (50%)	2 (50%)	0	4 (6.98%)
ผู้ป่วยเบาหวาน	1 (33.33%)	2 (66.67%)	0	3 (2.33%)
ผู้สัมผัสร่วมบ้าน MDR	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (2.33%)
ผู้ที่สูบบุหรี่	0	0	1 (100%)	1 (2.33%)
ไม่มีความเสี่ยง	0	0	1 (100%)	1 (2.33%)
Prisoner	0	1 (100%)	0	1 (2.33%)
รวม	11 (30.23%)	15 (41.86%)	6 (27.91%)	43 (100%)

จากการศึกษาอายุของผู้ป่วยที่เป็นผู้วัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) จำนวน 43 ราย พบว่า ส่วนใหญ่ผู้ป่วยอยู่ในช่วงอายุ 45-54 ปี คิดเป็นร้อยละ 32.56 และพบในผู้ชายเป็นส่วนใหญ่ คิดเป็นร้อยละ 58.14 ดังตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 แสดงความเกี่ยวข้องของช่วงอายุผู้ป่วยกับการดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) ในพื้นที่เขตสุขภาพที่ 11

อายุ	2563		2564		2565		รวม
	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	ชาย	หญิง	
18-24	0	0	0	0	0	1 (100%)	1 (2.33%)
25-34	2 (25%)	0	2 (25%)	1 (12.50%)	2 (25%)	1 (12.50%)	8 (18.60%)
35-44	1 (12.50%)	0	1 (12.50%)	2 (25%)	2 (25%)	2 (25%)	8 (18.60%)
45-54	5 (35.71%)	1 (7.14%)	5 (35.71%)	1 (7.14%)	1 (7.14%)	1 (7.14%)	14 (32.56%)
55-64	1 (14.28%)	2 (28.56%)	0	3 (42.85%)	1 (14.29%)	0	7 (16.28%)
>65	1 (20%)	0	1 (14.28%)	2 (28.56%)	0	1 (20%)	5 (11.63%)
รวม	10 (23.26%)	3 (6.98%)	9 (20.93%)	9 (20.93%)	6 (13.95%)	6 (13.95%)	43 (100%)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาด้วยการรวบรวมข้อมูลจากตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะบวกรายใหม่ เกือบทั้ง 7 จังหวัดในเขตสุขภาพที่ 11 ที่ส่งตรวจมายัง สคร.11 ในช่วงปีงบประมาณ 2563 ถึง 2565 มีจำนวนลดลง อาจเนื่องมาจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ในประเทศไทย จากข้อมูลทั้งหมดที่ศึกษาพบว่าผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR ร้อยละ 0.87 ซึ่งยังต่ำกว่าค่าประมาณจากองค์การอนามัยโลกเมื่อปี พ.ศ.2565 (Global tuberculosis report 2023, WHO) ที่พบว่าผู้ป่วยวัณโรครายใหม่มีการดื้อยา RR+/MDR ในประเทศไทย เท่ากับร้อยละ 1.7 เนื่องจาก สคร.11 เป็นหน่วยงานที่ให้บริการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและควบคุมโรคในระบบเครือข่ายห้องปฏิบัติการ (Public Health Lab) ของกรมควบคุมโรค เพื่อการป้องกันควบคุมโรคและภัยสุขภาพ จากข้อมูลที่น่ามาศึกษาทั้งสิ้นมี 4,948 ตัวอย่าง แต่มีตัวอย่างผู้ป่วยเสมหะบวกรายใหม่จำนวนหนึ่งถูกส่งไปตรวจยังห้องปฏิบัติการวัณโรคอื่นๆ เช่น ห้องปฏิบัติการของหน่วยงานเอกชน จึงอาจจะทำให้ตัวอย่างที่นำมาศึกษาในครั้งนี้นี้ยังไม่ครอบคลุมตัวอย่างของผู้ป่วยทั้งหมดในเขตสุขภาพที่ 11 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบผู้ป่วยดื้อยาน้อยกว่าความเป็นจริงได้ และจากข้อมูลทั้ง 3 ปี พบว่าแนวโน้มการดื้อยาวัณโรคยังคงที่อยู่ แต่อย่างไรก็ควรติดตามข้อมูลต่อไปในระยะยาว เพื่อดูแลแนวโน้มสถานการณ์การดื้อยาต่อไป

จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR ในเขตสุขภาพที่ 11 ทั้งสิ้นจำนวน 43 คน คิดเป็นร้อยละ 0.87 และพบว่าแนวโน้มในปีงบประมาณ 2563 ถึง 2565 คงที่อยู่ คือ 0.61, 1.0 และ 1.16 ตามลำดับ และพบว่ายังต่ำกว่าระดับประเทศ จึงอาจจะยังไม่ถึงขั้นจะต้องปรับเปลี่ยนแนวทางการรักษา เนื่องจากยังพบการดื้อยาในระดับที่ต่ำอยู่ แต่ควรจะมีการติดตามการดื้อยาของเชื้อวัณโรคอย่างสม่ำเสมอ

จากการศึกษาความชุกของผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR ในเขตสุขภาพที่ 11 ในปีงบประมาณ 2563 จังหวัดกระบี่มีความชุกของผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR สูงที่สุด คือ 0.63 รายต่อแสนประชากร แต่ลดลงในปีงบประมาณ 2564 อาจเนื่องมาจากสถานการณ์การระบาดของโรคโคโรนาไวรัสในประเทศไทย จึงอาจจะทำให้การคัดกรองหาวัณโรคลดลง ส่วนในปีงบประมาณ 2564 จังหวัดภูเก็ตมีความชุกของผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR สูงที่สุดคือ 0.95 รายต่อแสนประชากร อาจเนื่องมาจากจังหวัดภูเก็ตเป็นจังหวัดที่มีแรงงานเคลื่อนย้ายจำนวนมาก ทำให้มีประชากรแฝงเยอะ จำนวนประชากรที่นำมาคำนวณความชุกจึงต่ำกว่าประชากรที่แท้จริง จึงอาจจะทำให้ค่าความชุกสูงได้ ในส่วนของจังหวัดชุมพร พบว่าความชุกของผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR เพิ่มขึ้นในทุกๆปี ตั้งแต่

ปี 2563 ถึง 2565 และความชุกของผู้ป่วยวัณโรคชนิด RR+/MDR สูงที่สุดในปีงบประมาณ 2565 คือ 0.98 รายต่อแสนประชากร จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่ามีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาจำนวนมาก ส่งผลให้เป็นการเพิ่มภาระงานของเจ้าหน้าที่สาธารณสุขเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของวัณโรคดื้อยา จึงควรมีการรักษาวัณโรค ร่วมกับการมีพี่เลี้ยงกำกับกับการรับประทานยา (directly observed therapy, DOT) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษาวัณโรคโดยติดตามการรับประทานยาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้การรักษาวัณโรคได้ผลการรักษาที่หายขาด (cure) ลดการเกิดเป็นซ้ำ (relapse) และลดปัญหาการเกิดเชื้อดื้อยา (drug resistance)

จากการศึกษาประวัติของผู้ป่วยที่เป็นผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด RR+/MDR ในโปรแกรม NTIP พบว่าส่วนใหญ่ เป็นประชากรเสี่ยงต่อวัณโรค ที่ไม่มีการแยกกลุ่มผู้ป่วยที่ชัดเจน เนื่องมาจากข้อจำกัดของโปรแกรมที่ใช้ในปีงบประมาณ 2563-2564 มีการบันทึกข้อมูลผู้ป่วยไม่ครบถ้วน จึงอาจจะทำให้ข้อมูลในส่วนนี้ขาดหายไป โดยผู้ป่วยที่พบส่วนใหญ่ อยู่ในกลุ่มวัยทำงานมากที่สุด คืออายุตั้งแต่ 25 -54 ปี และรองลงมาคือกลุ่มผู้สูงอายุ คืออายุตั้งแต่ 55 ปีขึ้นไป จึงควรเพิ่มการค้นหาในผู้สัมผัสใกล้ชิด และผู้สัมผัสร่วมบ้านในการตรวจหาวัณโรคระยะแฝงเพิ่มมากขึ้น เพื่อช่วยลดอุบัติการณ์การเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยวัณโรคในอนาคตได้

บรรณานุกรม

- Bruker Daltonics GmbH & Co. KG. Rapid diagnostics of tuberculosis and its resistances. Bremen, Germany; 2023.
- FIND foundation for innovative new diagnostics. Molecular Detection of Drug-Resistant Tuberculosis By Line Probe Assay. Geneva, Switzerland
- World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Geneva, Switzerland: WHO; 2021.
- World Health Organization. Line probe assays for detection of drug-resistant tuberculosis interpretation and reporting manual for laboratory staff and clinicians: WHO; 2022.
- Hain Lifescience. GenoType MTBDRplus. Nehren, Germany; 2012.
- James M. Musser, Vivek Kapur, Diana L. Williams, Barry N. Kreiswirth, Dick van Soolingen, and Jan D. A. van Embden. (1996). Characterization of the Catalase-Peroxidase Gene (katG) and inhA Locus in Isoniazid-Resistant and -Susceptible Strains of Mycobacterium tuberculosis by Automated DNA Sequencing: Restricted Array of Mutations Associated with Drug Resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 173, 196-202
- สำนักบริหารการทะเบียน กรมการปกครอง. (2565). สถิติประชากรทางการทะเบียนราษฎร. สืบค้น 5 ธันวาคม 2566. จาก <https://stat.bora.dopa.go.th/stat/statnew/statMONTH/statmonth/#/Mainpage>
- สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2564. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2564
- สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. แนวทางการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2558
- สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. แนวทางบริหารจัดการและการปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการด้านวัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2562
- วรวัฒน์ จำปาเงิน และคณะ. 2561. วัณโรคดื้อยาไอโซไนอาซิด: แนวทางปฏิบัติจากองค์การอนามัยโลก ปี 2018. วารสารอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 4(2), 1-9.

เมธี ศรีประพันธ์. (2557). Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique [Internet]. [สืบค้น 2023 Dec 1].
จาก http://www.mtc.or.th/pdf_que/pdf1_14.pdf

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 ตัวอย่างการแปลผลการทดสอบ

Genetic Organization and Phenotypes

#	CC	AC	TUB	<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT3	<i>rpoB</i> WT4	<i>rpoB</i> WT5	<i>rpoB</i> WT6	<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> WT8	<i>rpoB</i> MUT1	<i>rpoB</i> MUT2A	<i>rpoB</i> MUT2B	<i>rpoB</i> MUT3	<i>katG</i>	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT1	<i>katG</i> MUT2	<i>inhA</i>	<i>inhA</i> WT1	<i>inhA</i> WT2	<i>inhA</i> MUT1	<i>inhA</i> MUT2	<i>inhA</i> MUT3A	<i>inhA</i> MUT3B	TUB	<i>rpoB</i> WT	<i>rpoB</i> MUT	<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT	<i>inhA</i> WT	<i>inhA</i> MUT	RMP	INH		
1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	■	□	□	■	■	■	□	□	□	□	+	+	-	+	-	+	-	+			
2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	□	□	□	■	■	■	□	□	□	□	+	-	+	-	+	+	-		+		+
3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	■	□	□	■	■	■	□	□	□	□	+	+	-	+	-	-	+	+			+
4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	□	□	□	■	■	■	□	□	■	□	+	-	+	-	+	+		+		+	
5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	■	□	□	□	■	■	■	□	□	□	□	+	-	-	-	-	+	-		+		+

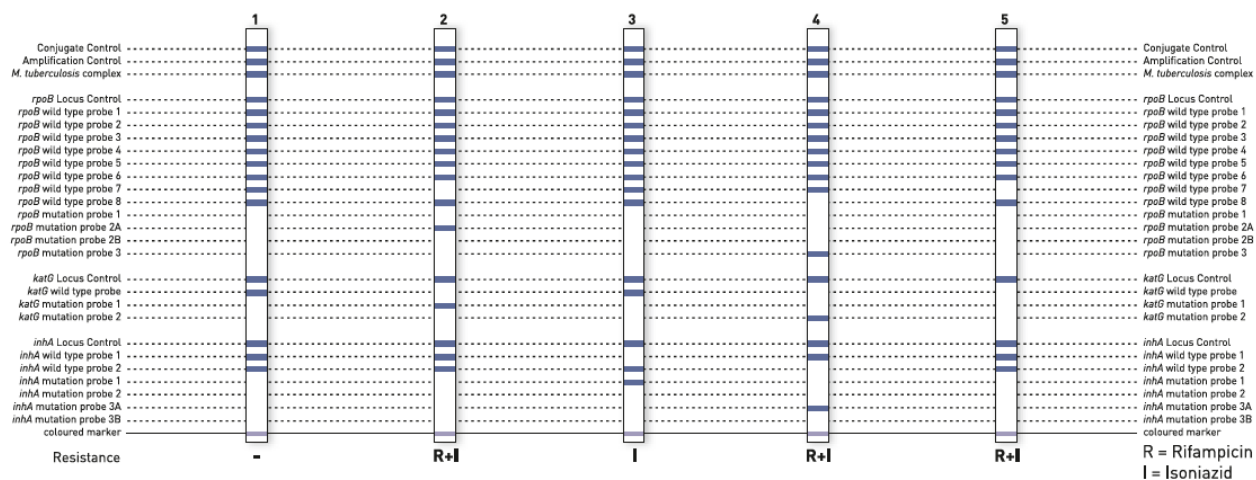
Gene Clusters:

- rpoB* cluster: *rpoB*, *rpoB* WT1-WT8, *rpoB* MUT1, *rpoB* MUT2A, *rpoB* MUT2B, *rpoB* MUT3
- katG* cluster: *katG*, *katG* WT, *katG* MUT1, *katG* MUT2
- inhA* cluster: *inhA*, *inhA* WT1-WT2, *inhA* MUT1, *inhA* MUT2, *inhA* MUT3A, *inhA* MUT3B

Phenotypes:

- RMP:** sensitive, resistant
- INH:** sensitive, resistant

ที่มา : Bruker Daltonics GmbH & Co. KG., 2023



ที่มา : Hain Lifescience, 2012

ภาคผนวก 2 ตารางการแปลผลการทดสอบการดื้อยา Rifampicin (Hain Lifescience, 2012)

Target region	MTBDRplus probe	Mutation or region interrogated	Interpretation	Additional diagnostic action ^a	Clinical implications
<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT1 not developed	Mutation(s) in codons 505–509 (424–428) ^b	Resistance to rifampicin (Rif) inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT2 not developed	Mutation(s) in codons 510–513 (429–432) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT2/3	<i>rpoB</i> WT2 and WT3 not developed	Mutation(s) in codons 510–517 (429–436) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT3/4	<i>rpoB</i> MUT1 developed	D516V (D435V) ^b	Resistance to Rif detected	No additional diagnostic action required.	Rif is not effective

Target region	MTBDRplus probe	Mutation or region interrogated	Interpretation	Additional diagnostic action ^a	Clinical implications
	<i>rpoB</i> WT3, WT4 and MUT1 not developed	Mutation(s) in codons 513–519 (432–438) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT4/5	<i>rpoB</i> WT4 and WT5 not developed	Mutation(s) in codons 516–522 (435–441) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c .
<i>rpoB</i> WT5/6	<i>rpoB</i> WT5 and WT6 not developed	Mutation(s) in codons 518–525 (437–444) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> MUT2A developed	H526Y (H445Y) ^b	Resistance to Rif detected	No additional diagnostic action required	Rif is not effective
	<i>rpoB</i> MUT2B developed	H526D (H445D) ^b	Resistance to Rif detected	No additional diagnostic action required	Rif is not effective
	<i>rpoB</i> WT7, MUT2A and MUT2B not developed	Mutation(s) in codons 526–529 (445–448) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c
<i>rpoB</i> WT8	<i>rpoB</i> MUT3 developed	S531L (S450L) ^b	Resistance to Rif detected	No additional diagnostic action required	Rif is not effective
	<i>rpoB</i> WT8 and MUT3 not developed	Mutation(s) in codons 530–533 (449–452) ^b	Resistance to Rif inferred	Optional: Perform sequencing of <i>rpoB</i> to identify the specific mutation.	Rif is not effective ^c

^a The decision to perform the optional diagnostic actions should be guided by considerations of the patient's risk group for resistance and by the prevalence of resistance in the setting, as these factors affect the positive predictive value of the test. Silent mutations may be of greater concern in low-resistant settings.

^b MTB codon numbering according to Andre et al. (21) is reported in parentheses.

^c This recommendation does not apply if sequencing identifies a silent mutation.

ภาคผนวก 3 ตารางแสดงการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่สอดคล้องกับการหายไปของ wild type และ Mutation band (Hain Lifescience, 2012)

Failing wild type band(s)	Codons analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>rpoB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>rpoB</i> WT2	510-513		E510H L511P*
<i>rpoB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>rpoB</i> WT3/WT4	513-519	<i>rpoB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>rpoB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>rpoB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>rpoB</i> WT7	526-529	<i>rpoB</i> MUT2A <i>rpoB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>rpoB</i> WT8	530-533	<i>rpoB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

* These rare mutations have only been detected theoretically (in silico).

ภาคผนวก 4 ตารางแสดงการกลายพันธุ์ของยีน *KatG* ที่สอดคล้องกับการหายไปของ wild type และ Mutation band (Hain Lifescience, 2012)

Failing wild type band	Codon analyzed	Developing mutation band	Mutation
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

ภาคผนวก 5 ตารางแสดงการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง *inhA* promoter (*inhA* gene) ที่สอดคล้องกับการหายไปของ wild type และ Mutation band (Hain Lifescience, 2012)

Failing wild type band	Analyzed nucleic acid position	Developing mutation band	Mutation
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

ภาคผนวก 6 ตารางแสดงผลพบวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB (MDR-TB)) ในพื้นที่ต่างๆ ในเขตสุขภาพที่ 11

จังหวัด	ปีงบประมาณ			รวม
	2563	2564	2565	
นครศรีธรรมราช	2 (22.22%)	4 (44.45%)	3 (33.33%)	9 (28.13%)
สุราษฎร์ธานี	4 (66.67%)	2 (33.33%)	0	6 (18.75%)
กระบี่	3 (50%)	1 (16.67%)	2 (33.33%)	6 (18.75%)
ภูเก็ต	2 (40%)	3 (60%)	0	5 (15.63%)
ระนอง	0	1 (100%)	0	1 (3.13%)
พังงา	0	1 (100%)	0	1 (3.13%)
ชุมพร	0	3 (75%)	1 (25%)	4 (12.50%)
รวม	11 (34.38%)	15 (46.87%)	6 (18.75%)	32 (100%)

ภาคผนวก 7 ตารางแสดงผลพบวัณโรคดื้อยา Rifampicin (Mono Rifampicin resistance; RR-TB) ในพื้นที่ต่างๆ ในเขตสุขภาพที่ 11

จังหวัด	ปีงบประมาณ			รวม
	2563	2564	2565	
ชุมพร	0	0	4 (100%)	4 (36.36%)
นครศรีธรรมราช	1 (50%)	0	1 (50%)	2 (18.18%)
สุราษฎร์ธานี	0	1 (50%)	1 (50%)	2 (18.18%)
พังงา	1 (50%)	1 (50%)	0	2 (18.18%)
ภูเก็ต	0	1 (100%)	0	1 (9.09%)
กระบี่	0	0	0	0
ระนอง	0	0	0	0
รวม	2 (18.18%)	3 (27.27%)	6 (54.55%)	11 (100%)

ภาคผนวก 8 ตารางแสดงจำนวนประชากร ในเขตสุขภาพที่ 11 ณ เดือนกันยายน ปี 2563, 2564 และ 2565 ตามลำดับ

จังหวัด	จำนวนประชากร ในเขตสุขภาพที่ 11 (คน)		
	2563	2564	2565
นครศรีธรรมราช	1,550,577	1,549,321	1,546,037
สุราษฎร์ธานี	1,067,277	1,072,025	1,072,460
ชุมพร	508,922	509,344	509,414
กระบี่	477,444	478,854	479,999
ภูเก็ต	415,462	419,217	417,541
ระนอง	194,175	194,674	194,364
พังงา	268,160	268,130	267,595
รวม	4,482,017	4,491,565	4,487,410

ข้อมูลจาก สถิติประชากรทางการทะเบียนราษฎร(รายเดือน) สำนักบริหารการทะเบียน กรมการปกครอง