

ศึกษาอัตราและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา Rifampicin และ Isoniazid ด้วยวิธี Line probe assay ในตัวอย่างส่งตรวจที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น เดือนสิงหาคม – ธันวาคม 2565

The Study of mutation rates and patterns of genes associated with Rifampicin and Isoniazid resistant by Line probe assay at the Office of Disease Prevention and Control Region 7 Khon Kaen, August – December 2022

ปวีณา กมลรักษ์ วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)	Paweena Kamonrak B.Sc.(Medical Technology)
ธีระพจน์ สิงห์โตหิน วท.ม.(วิทยาศาสตร์การแพทย์)	Thiraphot Singtohin M.Sc.(Medical Science)
นุชรา กลางประพันธ์ วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)	Noochara Klangprapan B.Sc.(Medical Technology)
วรัญญู พอดี้ วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)	Warunyu Phordee B.Sc.(Medical Technology)
ธิดา โสสว่าง วท.บ.(เทคนิคการแพทย์)	Thirada Sosawang B.Sc.(Medical Technology)
สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น	Office of Disease Prevention and Control Region 7 Khon Kaen

Received: September 4, 2023

Revised: December 12, 2023

Accepted: January 3, 2024

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนในเชื้อวัณโรคที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซินหรือไอโซไนอาซิด หรือดื้อทั้งไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิด โดยใช้ข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ ในสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการวัณโรค ที่กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค ในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่เดือนสิงหาคม - ธันวาคม 2565 จำนวน 312 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาจำนวน 83 ตัวอย่าง ดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว จำนวน 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.95) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ของยีน katG จำนวน 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.86) รูปแบบการกลายพันธุ์ (wild type/mutant) ที่พบมากที่สุด คือ katG WT/ katG MUT1 จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.30) และการกลายพันธุ์ของยีน inhA จำนวน 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.14) รูปแบบที่พบมากที่สุด คือ inhA WT1/ inhA MUT1 จำนวน 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.25) ดื้อต่อยาไรแฟมพิซินเพียงชนิดเดียว 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.56) รูปแบบที่พบมากที่สุด คือ -/ rpoB MUT3 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.41) และดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน (MDR-TB) จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.09) รูปแบบที่พบมากที่สุด คือ rpoB WT8/ rpoB MUT3, katG WT/ katG MUT1 จำนวน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.23) การศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นพื้นฐานหรือประกอบการศึกษาวิจัยเพื่อหาแบบการกลายพันธุ์ของยีนในเขตพื้นที่อื่น ๆ ได้ต่อไป

คำสำคัญ: วัณโรค, รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน, การดื้อยา

ABSTRACT

In this study, a cross-sectional descriptive was used. Aim was to determine the mutation rates and patterns of *M. tuberculosis* genes associated with Rifampicin or Isoniazid resistance or both Rifampicin and Isoniazid resistance. Specimens from hospitals in the responsible area of the Office of Disease Prevention and Control 7, Khon Kaen from August - December 2022 was 312 samples. Results showed 83 samples were drug resistant. The Isoniazid Monoresistant was 56 samples (17.95%). The *katG* gene mutation 67.86% (n=38). The most common wild type/mutant was *katG* WT/*katG* MUT1 25.30% (n=21). The *inhA* gene mutation 32.14% (n=18). The most common pattern was *inhA* WT1/*inhA* MUT1 13.25% (n=11). The Rifampicin Monoresistant was 8 samples (2.56%). The most common pattern was -/ *rpoB* MUT3 2.41% (n=2). The Isoniazid and Rifampicin resistance (MDR-TB) was 19 samples (6.09%) The most common pattern were *rpoB* WT8/ *rpoB* MUT3, *katG* WT/ *katG* MUT1 7.23% (n=6). This study can be used as a basis or supplementary research to find genetic mutation patterns in other areas.

Keywords: Tuberculosis, Gene pattern, Drug Resistance

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis; TB) เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เป็นโรคติดต่อที่สำคัญและยังเป็นปัญหาสาธารณสุข เป็นสาเหตุของการป่วยและการตายในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก สถานการณ์วัณโรคจากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO, Global Tuberculosis Report 2021)⁽¹⁾ คาดประมาณว่าในปี พ.ศ. 2563 อุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรค (รายใหม่และกลับเป็นซ้ำ) ของโลกสูงถึง 9.9 ล้านคน (127 ต่อประชากรแสนคน) มีจำนวนผู้ป่วยวัณโรค เสียชีวิตสูงถึง 1.3 ล้านคน แต่จากรายงานองค์การอนามัยโลก พบผู้ป่วยวัณโรค (รายใหม่และกลับเป็นซ้ำ) จำนวน 5.8 ล้านคน (75 ต่อประชากรแสนคน) ในปี พ.ศ. 2562 อัตราความสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำร้อยละ 86 ในปี พ.ศ. 2561 มีอัตราความสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา MDR/RR-TB ร้อยละ 59 สถานการณ์เฝ้าระวังวัณโรคดื้อยาทั่วโลกโดยองค์การอนามัยโลก⁽²⁾ พบว่าประมาณร้อยละ 3.5 (95% CI 2.2-3.5%) ของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ทั่วโลก เป็น MDR-TB และพบสูงถึงประมาณร้อยละ 20.5 (95% CI 13.6-27.5%) ในผู้ป่วยที่เคยรักษามาก่อน โดยร้อยละ 9 (95% CI 6.5-11.5%) ของผู้ป่วย MDR-TB เป็นวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมาก (XDR-TB)

สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทย ปี ค.ศ. 2021-2025 ประเทศไทยอยู่ในกลุ่มของประเทศที่มีภาระวัณโรคและวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี อุบัติการณ์วัณโรคของประเทศไทยในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่จำนวนผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำที่ค้นพบ และขึ้นทะเบียนรักษามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น สำหรับค่าคาดประมาณโดยองค์การอนามัยโลก อัตราการค้นพบและขึ้นทะเบียนรักษา (Treatment Coverage)

ของผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยพบ ร้อยละ 53, 57, 74, 80 และ 84 ปี พ.ศ. 2558-2562 ตามลำดับ ปี พ.ศ. 2563 ลดลงเป็น ร้อยละ 82 และจากรายงานวัณโรคระดับโลก โดยองค์การอนามัยโลก (WHO, Global Tuberculosis Report 2021) คาดประมาณว่าในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทย มีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ 105,000 ราย หรือคิดเป็น 150 ต่อประชากรแสนคน ผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิต 12,000 ราย ผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2563 พบว่ามีผู้ป่วยวัณโรค รายใหม่และกลับเป็นซ้ำขึ้นทะเบียนรักษา 85,837 ราย ผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำในประเทศไทยที่ผ่านมา มีแนวโน้มอัตราการรักษาสำเร็จเพิ่มขึ้น รักษาล้มเหลว ขาดยา และโอนออกลดลง ส่วนอัตราการเสียชีวิต ยังคงสูง และเป็นปัญหาของประเทศไทย เนื่องจากผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่สูงอายุและมีโรคร่วม ผลการดำเนินงาน วัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2563 พบว่าผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด MDR/RR-TB ที่องค์การอนามัยโลกคาดประมาณ ในปี พ.ศ. 2562 มีจำนวน 2,500 ราย หรือคิดเป็น 3.60 ต่อประชากรแสนคน โดยพบผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด MDR/RR-TB ร้อยละ 1.7 ในผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ และร้อยละ 10 ในผู้ป่วยที่มีประวัติการรักษาวัณโรคมาก่อน ผลการดำเนินงานวัณโรคของประเทศไทยปี พ.ศ. 2563 พบผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด MDR/RR-TB ที่มีผลยืนยัน ทางห้องปฏิบัติการ 1,302 ราย และได้รับการรักษา 1,204 ราย และวัณโรคดื้อยาชนิด pre-XDR/XDR-TB ที่มีผลยืนยันทางห้องปฏิบัติการ 65 ราย และได้รับการรักษา 62 ราย และอัตราผลสำเร็จการรักษาผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา ชนิด MDR/RR-TB และผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาชนิด XDR-TB ที่ขึ้นทะเบียนรักษาในปี 2561 เท่ากับร้อยละ 63 และ 81 ตามลำดับ⁽³⁾

สถานการณ์วัณโรคในเขตสุขภาพที่ 7 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2563 - 28 กุมภาพันธ์ 2564 พบว่า จังหวัดขอนแก่นมีอัตราการรายงานผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำจำนวน 1,037 ราย ซึ่งสูงสุดเป็นลำดับที่ 2 ของประเทศ อัตราการรายงานผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำ Notification rate 57.50 เขตสุขภาพที่มีอัตราการรายงานผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และกลับเป็นซ้ำทุกประเภท (คนไทย ไม่ใช่คนไทย และเรือนจำ) ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม 2563 - 28 กุมภาพันธ์ 2564 สูงสุด 2 อันดับแรก คือ เขตสุขภาพที่ 13 (62.00 ต่อประชากรแสนคน) รองลงมาคือเขตสุขภาพที่ 7 (50.20 ต่อประชากรแสนคน)⁽⁴⁾

ปัจจุบันประเทศไทย มีนโยบายเร่งรัดการคัดกรองวัณโรคโดยการถ่ายภาพรังสีทรวงอก (chest X-ray) วินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธีอณูชีววิทยา (molecular testing) ทดสอบความไวของเชื้อต่อยารักษาวัณโรค (DST) ในผู้ป่วยวัณโรคและรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยสูตรยาที่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ระยะเวลาการรักษาสั้นลง ซึ่งทำให้สถานการณ์วัณโรคของประเทศไทยดีขึ้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการ⁽⁵⁾ แบ่งออกเป็น 5 วิธี ดังนี้ การตรวจหาเชื้อ acid-fast bacilli (AFB) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination), การเพาะเลี้ยงเชื้อและ พิสูจน์ยืนยันชนิดของเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture and identification), การทดสอบความไวต่อยา (Drug susceptibility testing; DST), การตรวจทางโมเลกุลหรืออณูชีววิทยา (Molecular biology) และการตรวจหา การตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อวัณโรค (immune reactivity testing)

การตรวจทางอณูชีววิทยา⁽⁵⁾ ที่ต้องการอนามัยโลกแนะนำ มีเทคนิค 2 วิธี คือ เทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplification) เช่น Real-time PCR, Xpert MTB/RIF assay และเทคนิค amplification and reverse hybridization เช่น วิธี Line Probe Assay (LPA) โดยต้องมีจำนวนเชื้ออย่างน้อย 160 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีนี้จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการและอุปกรณ์ที่มีศักยภาพสำหรับงาน molecular และบุคลากรต้องมีความชำนาญ ปัจจุบันมีการใช้ LPA ในการทดสอบการดื้อยาในกลุ่ม FLD (ไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิด) เพื่อตรวจหา MDR-TB แต่มีข้อจำกัด คือ สามารถใช้ได้ดีในรายที่มีผล AFB smear บวก หรือใช้กับเชื้อที่เพาะขึ้นแล้ว (culture isolate)

นิยามในการศึกษา

1. ผู้ป่วยใหม่ (New Case) หมายถึง ผู้ป่วยที่ไม่เคยรักษาวัณโรคมาก่อน หรือรักษาน้อยกว่า 1 เดือน
2. ผู้ป่วย Pre-Treatment หมายถึง ผู้ป่วยใหม่กลุ่มเสี่ยงวัณโรคดื้อยา
3. ผู้ป่วย On-Treatment หมายถึง ผู้ป่วยระหว่างการรักษาที่ผลเสมหะยังเป็นบวกหลังการรักษา 2 เดือน
4. ผู้ป่วย Re-Treatment หมายถึง ผู้ป่วยที่มีประวัติรักษาวัณโรคมาก่อน
5. กลุ่มยารักษาวัณโรคลำดับแรก⁽⁶⁾ (First line anti-tuberculosis drugs) หมายถึง ยารักษาวัณโรคชนิดรับประทานแนวที่ 1 ได้แก่ Isoniazid (INH, H), Rifampicin (R), Pyrazinamide (Z) และ Ethambutol (E) ยากลุ่มนี้เป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด และผู้ป่วยทนต่อผลข้างเคียงของยาได้ดีที่สุด ดังนั้น ถ้าผลการตรวจทดสอบความไวต่อยา (DST) และการตอบสนองทางคลินิกบ่งชี้ว่าผู้ป่วยยังตอบสนองต่อยาควรเลือกใช้ยากลุ่มนี้ร่วมด้วยในการรักษา
6. การดื้อยาของเชื้อวัณโรค⁽⁶⁾ (Drug resistance in TB) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของยีน (Mutation) ที่สัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของยารักษาวัณโรค สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายรูปแบบ เช่น Point mutation, Insertion, Deletion และ Fullgene deletion จึงเกิดการแปลรหัส mRNA ที่ผิดปกติเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หรือโมเลกุล เป้าหมายต่างๆ ภายในตัวเชื้อที่ยารักษาวัณโรคจะต้องไปออกฤทธิ์
7. Mono-resistant TB⁽²⁾ หมายถึง วัณโรคดื้อยาเพียงชนิดเดียว
8. Multi-drug resistant TB (MDR-TB)⁽²⁾ หมายถึง วัณโรคดื้อยาหลายชนิดที่ดื้อยา H และ R พร้อมกัน และอาจจะดื้อต่อยาชนิดอื่น ๆ ด้วยก็ได้ ซึ่งยา H และ R ถือเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาวัณโรค
9. Wild type gene (WT) หมายถึง ยีนดั้งเดิม
10. Mutant gene หมายถึง ยีนที่มีการกลายพันธุ์
11. รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน ประกอบด้วยรูปแบบ wild type/mutant ดังนี้ -/- หมายถึง Wild type gene ไม่หาย และไม่พบ Mutant gene, -/mutant หมายถึง Wild type gene ไม่หาย แต่พบ Mutant gene, wild type/- หมายถึง Wild type gene หาย แต่ไม่พบ Mutant gene และ wild type/mutant หมายถึง Wild type gene หาย และพบ Mutant gene
12. การตรวจหายีนดื้อยารักษาวัณโรคโดยวิธี Line Probe Assay (LPA)⁽⁶⁾ อาศัยหลักการ Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค ร่วมกับหลักการ Hybridization โดยใช้ยีนที่จำเพาะ (Specific oligonucleotide probe) ที่ติดฉลากด้วยสาร Biotin ได้แก่ กลุ่ม Mutant probe ต่าง ๆ เพื่อตรวจจับชิ้นส่วน Nucleotide ในยีนของเชื้อวัณโรค ที่เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับการดื้อยา จะปรากฏเป็นแถบสีเกิดขึ้นบนแถบทดสอบบริเวณที่แปลผลการตรวจพบยีนดื้อยา ขณะเดียวกันจะทำให้กลุ่ม Wild type

probe ไม่สามารถจับกับยีนดั้งเดิม (Wild type gene) ได้เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ไปแล้ว จึงทำให้ปรากฏแถบสีเกิดขึ้นบนแถบทดสอบบริเวณที่แปลผลการตรวจพบยีนดั้งเดิม

13. High level resistance⁽¹²⁾ หมายถึง การกลายพันธุ์ของ katG สัมพันธ์กับ High level resistance คือ มากกว่าร้อยละ 1 ของเชื้อต่อต่อ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของไอโซไนอาซิด

14. Low level resistance⁽¹²⁾ หมายถึง การกลายพันธุ์ของ inhA สัมพันธ์กับ Low level resistance คือ มากกว่าร้อยละ 1 ของเชื้อต่อต่อ 0.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่ยังไม่ถึง 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของไอโซไนอาซิด

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอัตราและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซิน (rpoB gene) หรือไอโซไนอาซิด (katG และ inhA gene) หรือคือทั้งไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิดของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างส่งตรวจที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น

วิธีการศึกษา

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการวัณโรค (ผู้ป่วย New case, Pre-, On-, Re-Treatment) ที่กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค ในสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่เดือน สิงหาคม – ธันวาคม 2565 จำนวน 312 ตัวอย่าง

เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

เกณฑ์คัดเข้า: มีข้อมูลครบถ้วน ดังนี้

1. บันทึกข้อมูลส่งตรวจผ่านทางโปรแกรม NTIP
2. ผล AFB Smear เป็นบวก
3. ส่งตรวจ 1 ครั้ง/คน/ปีงบประมาณ

2. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- 2.1 แบบเก็บข้อมูลการอ่านผลตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LPA
- 2.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermocycler รุ่น GTQ-Cycler 24, HAIN, Germany

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line Probe Assay (LPA) โดยชุดทดสอบ Genotype® MTBDRplus Ver2.0 (Hain Life Science, Nehren, Germany) ในตัวอย่างเสมหะ จำนวน 312 ตัวอย่าง

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. รวบรวมข้อมูลการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Line Probe Assay (LPA) บันทึกผลการกลายพันธุ์ของยีนลงในแบบฟอร์มเก็บข้อมูล

2. คำนวนอัตราการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซินหรือไอโซไนอาซิดหรือดื้อทั้งไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิดด้วยสถิติ ร้อยละ

3. คำนวนอัตราและรูปแบบการดื้อต่อยาไรแฟมพิซินหรือไอโซไนอาซิดหรือดื้อทั้งไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิดด้วยสถิติร้อยละ

การวิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย: ใช้หลักสถิติเชิงพรรณนา ร้อยละ

ผลการศึกษา

1. การทดสอบความไวต่อยาไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซิน

ข้อมูลผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการวัณโรค ด้วยวิธี Line Probe Assay ในสิ่งส่งตรวจจากโรงพยาบาลในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่น ตั้งแต่เดือนสิงหาคม – ธันวาคม 2565 จำนวน 312 ตัวอย่าง จากผลการทดสอบความไวต่อยาไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซิน พบว่าตัวอย่างเชื้อวัณโรคแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อวัณโรคกลุ่มที่ไวต่อยา พบเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาทั้งไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน จำนวน 229 ตัวอย่าง (ร้อยละ 73.40) เป็นผู้ป่วย New case 177 คน (ร้อยละ 77.29) และผู้ป่วย Pre-Treatment 26 คน (ร้อยละ 11.35) On-Treatment 18 คน (ร้อยละ 7.86) และผู้ป่วย Re-Treatment 8 คน (ร้อยละ 3.49) เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา จำนวน 83 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.60) เป็นผู้ป่วย New case 59 คน (ร้อยละ 71.08) และผู้ป่วย Pre-Treatment 5 คน (ร้อยละ 6.02) On-Treatment 10 คน (ร้อยละ 12.05) และผู้ป่วย Re-Treatment 9 คน (ร้อยละ 10.84) มีการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว จำนวนสูงที่สุด 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.90) รองลงมาดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน จำนวน 19 ตัวอย่าง (ร้อยละ 6.10) และดื้อต่อยาไรแฟมพิซินเพียงชนิดเดียว จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.60) รายละเอียด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปแบบการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซิน จากการทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค (n=312)

การทดสอบความไวต่อยา	รูปแบบการดื้อต่อยา	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)
Susceptible (n=229)	INH + RIF Susceptible	229 (73.40)
Resistant (n=83)	INH Monoresistance	56 (17.95)
	RIF Monoresistance	8 (2.56)
	INH+RIF resistance	19 (6.09)

เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยา จำนวน 83 ตัวอย่าง มีการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว เป็นเพศชายมากที่สุด จำนวน 38 คน (ร้อยละ 69.09) กลุ่มผู้ป่วยอายุมากกว่า 60 ปี พบมากที่สุดจำนวน 25 คน (ร้อยละ 44.64) การดื้อต่อยาไรแฟมพิซินเพียงชนิดเดียว เป็นเพศหญิงมากที่สุด จำนวน 5 คน (ร้อยละ 17.86) กลุ่มผู้ป่วยอายุมากกว่า 60 ปี พบมากที่สุดจำนวน 4 คน (ร้อยละ 50.00) และการดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน เป็นเพศชายมากที่สุด จำนวน 14 คน (ร้อยละ 25.45) กลุ่มผู้ป่วยอายุระหว่าง 46-60 ปี พบมากที่สุดจำนวน 8 คน (ร้อยละ 42.11) รายละเอียด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างประเภทของการดื้อยาไอโซไนอาซิด ไรแฟมพิซิน และดื้อทั้งไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน กับ Demographic Variables ของผู้ป่วย (n=83)

Demographic Variables	INH Monoresistant		RIF Monoresistant		INH+RIF Resistant (MDR)	
	n	%	n	%	n	%
เพศ						
ชาย	38	69.09	3	5.45	14	25.45
หญิง	18	64.29	5	17.86	5	17.86
อายุ (ปี)						
15-30	6	10.71	1	12.50	2	10.53
31-45	10	17.86	1	12.50	2	10.53
46-60	15	26.79	2	25.00	8	42.11
>60	25	44.64	4	50.00	7	36.84

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซินและไอโซไนอาซิด เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยาจำนวน 83 ตัวอย่าง ดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว จำนวน 56 ตัวอย่าง พบการกลายพันธุ์ของยีน katG จำนวน 38 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67.86) และการกลายพันธุ์ของยีน inhA จำนวน 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.14) รายละเอียด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว (n=56)

katG n (%)	inhA n (%)	inhA & katG n (%)
38 (67.86%)	18 (32.14%)	0 (0.00%)

การดื้อยาไรแฟมพิซินเพียงชนิดเดียว พบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100.00) และการดื้อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน พบการกลายพันธุ์ของยีน katG ร่วมกับ rpoB จำนวน 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 73.68) และการกลายพันธุ์ของยีน inhA ร่วมกับ rpoB จำนวน 5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26.32) รายละเอียด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รูปแบบการดื้อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน (n=19)

katG & rpoB n (%)	inhA & rpoB n (%)
14 (73.68%)	5 (26.32%)

การดื้อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว (Isoniazid Monoresistant; INH-MR) พบรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน katG (wild type/mutant) ที่พบมากที่สุด คือ katG WT/ katG MUT1 จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 25.30) รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน inhA ที่พบมากที่สุด ได้แก่ inhA WT1/ inhA MUT1 จำนวน 11

ตัวอย่าง (ร้อยละ 13.25) การดื้อต่อยาไรแฟมพิซินเพียงชนิดเดียว (Rifampicin Monoresistant; RIF-MR) รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่พบบ่อยที่สุด คือ -/ *rpoB* MUT3 จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.41) การดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน (MDR-TB) รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *katG* ร่วมกับ *rpoB* ที่พบบ่อยที่สุด คือ *rpoB* WT8/ *rpoB* MUT3 ร่วมกับ *katG* WT/ *katG* MUT1 จำนวน 6 ตัวอย่าง (ร้อยละ 7.23) และรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน *inhA* ร่วมกับ *rpoB* ที่พบบ่อยที่สุด *rpoB* WT8/ *rpoB* MUT3 ร่วมกับ *inhA* WT1/ *inhA* MUT1 จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3.61) รายละเอียด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไอโซไนอาซิด ไรแฟมพิซิน และไอโซไนอาซิด ร่วมกับไรแฟมพิซิน

Band missing/Mutation band: LPA			จำนวน
<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	ตัวอย่าง (ร้อยละ)
-/-	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	21 (25.30)
-/-	-/ <i>katG</i> MUT1	-/-	17 (20.48)
-/-	-/-	-/ <i>inhA</i> MUT1	5 (6.02)
-/-	-/-	<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT1	11 (13.25)
-/-	-/-	<i>inhA</i> WT1/ <i>inhA</i> MUT2	1 (1.20)
-/-	-/-	<i>inhA</i> WT2/ <i>inhA</i> MUT3B	1 (1.20)
-/ <i>rpoB</i> MUT2A	-/-	-/-	1 (1.20)
-/ <i>rpoB</i> MUT3	-/-	-/-	2 (2.41)
<i>rpoB</i> WT3, WT4/-	-/-	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT3 /-	-/-	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT7 / <i>rpoB</i> MUT2B	-/-	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT8 /-	-/-	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT8 / <i>rpoB</i> MUT3	-/-	-/-	1 (1.20)
-/ <i>rpoB</i> MUT2A	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	2 (2.41)
-/ <i>rpoB</i> MUT3	-/ <i>katG</i> MUT1	-/-	1 (1.20)
-/ <i>rpoB</i> MUT3	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	2 (2.41)
<i>rpoB</i> WT7/ -	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT7/ <i>rpoB</i> MUT2B	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT8/ -	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT8/ <i>rpoB</i> MUT3	<i>katG</i> WT/ <i>katG</i> MUT1	-/-	6 (7.23)
<i>rpoB</i> WT7/ <i>rpoB</i> MUT2B	-/-	-/ <i>inhA</i> MUT1	1 (1.20)
<i>rpoB</i> WT8/ <i>rpoB</i> MUT3	-/-	-/ <i>inhA</i> MUT1	1 (1.20)

rpoB WT8/ rpoB MUT3	-/-	inhA WT1/ inhA MUT1	3 (3.61)
---------------------	-----	---------------------	----------

การกลายพันธุ์ของยีน katG พบ katG wild type band 1 หาย จำนวน 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65.38) การกลายพันธุ์ของยีน katG ตำแหน่ง MUT1 จำนวน 52 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100.00) การกลายพันธุ์ของยีน inhA พบ inhA wild type band 1 หาย จำนวน 15 ตัวอย่าง (ร้อยละ 65.22) inhA wild type band 2 หาย จำนวน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.35) การกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่ง MUT1 จำนวน 21 ตัวอย่าง (ร้อยละ 91.30) และการกลายพันธุ์ของยีน inhA ตำแหน่ง MUT2 และ MUT3B จำนวน 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 8.70) รายละเอียด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไอโซไนอาซิด

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน	Locus											
	WT1(-)		WT2(-)		MUT1(+)		MUT2(+)		MUT3A(+)		MUT3B(+)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
katG Gene (52)	34	65.38	0	0.00	52	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
inhA Gene (23)	15	65.22	1	4.35	21	91.30	1	4.35	0	0.00	1	4.35

การกลายพันธุ์ของยีน rpoB พบ rpoB wild type band 8 หาย จำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 48.15) rpoB wild type band 7 หาย จำนวน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 14.81) rpoB wild type band 3 และ 4 หาย จำนวน 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.11) การกลายพันธุ์ของยีน rpoB ตำแหน่ง MUT3 จำนวน 16 ตัวอย่าง (ร้อยละ 59.26) และการกลายพันธุ์ของยีน rpoB ตำแหน่ง MUT2A และ MUT2B จำนวนละ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 11.11) รายละเอียด ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซิน

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB Gene (27)		
Locus	n	%
WT1(-)	0	0.00
WT2(-)	0	0.00
WT3(-)	2	7.41
WT4(-)	1	3.70
WT5(-)	0	0.00
WT6(-)	0	0.00
WT7(-)	4	14.81
WT8(-)	13	48.15

ตารางที่ 7 รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไรแฟมพิซิน (ต่อ)

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB Gene (27)		
Locus	n	%
MUT1(+)	0	0.00
MUT2A(+)	3	11.11
MUT2B(+)	3	11.11
MUT3(+)	16	59.26

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อยาไอโซไนอาซิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Charan และคณะ ปี 2563⁽⁷⁾ โดยพบการกลายพันธุ์ของยีน katG มากกว่า inhA การกลายพันธุ์ของยีน inhA และ katG ในเชื้อวัณโรคกลุ่ม isoniazid mono-resistance พบว่าผู้ป่วยจำนวน 192 คน มีการดื้อยาไอโซไนอาซิดเพียงชนิดเดียว คิดเป็น 64.40% มีการกลายพันธุ์ของยีน katG (125; 65.10%) ยีน inhA (54; 28.10%) และกลายพันธุ์ทั้ง 2 ยีน (13; 6.70%) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tavakkoli และ Nazemi ปี 2561⁽⁸⁾ ศึกษาจีโนมไทป์ของการกลายพันธุ์ ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาในไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซิน โดยการตรวจคัดกรองยีน katG, inhA และ rpoB ในเชื้อวัณโรคมัคโคแบคทีเรีย ด้วยวิธี High Resolution Melting พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไอโซไนอาซิด ยีน inhA 17.24% และยีน katG 82.76% และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huyen และคณะ ปี 2556⁽⁹⁾ ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อยาไอโซไนอาซิดและผลกระทบต่อผลการรักษาวัณโรค จำนวนตัวอย่าง 227 จาก 251 พบการดื้อยาไอโซไนอาซิด (90.40%) มีการกลายพันธุ์ของยีน katG codon 315 (katG315) 75.30% และกลายพันธุ์ inhA promoter region 28.20% จากการศึกษาของ Kigozi และคณะ ปี 2561⁽¹¹⁾ ศึกษาความชุกและรูปแบบการใช้ยาไรแฟมพิซินและการดื้อยาไอโซไนอาซิด ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ใน Mycobacterium tuberculosis ประเทศยูกันดา พบว่ามีการกลายพันธุ์ของยีน katG 80% และกลายพันธุ์ของยีน inhA 6.00% การศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อยาไอโซไนอาซิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tadesse และคณะ ปี 2559⁽¹⁰⁾ ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ Mycobacterium tuberculosis จากปอด ในผู้ป่วยวัณโรคภาคตะวันตกเฉียงใต้ของเอธิโอเปีย พบว่ารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน katG ในกลุ่มดื้อยาไอโซไนอาซิด คือ katG WT/katG MUT1 (30/41) (ร้อยละ 73.20) KatG WT/Not Detected (1/41) (ร้อยละ 2.40) katG MUT1 (6/41) (ร้อยละ 14.60) และรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน inhA คือ inhA WT1/inhA MUT1 (4/41) (ร้อยละ 9.80) แต่รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB ในกลุ่มดื้อยาไรแฟมพิซินไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tadesse และคณะ ปี 2559⁽¹⁰⁾ ซึ่งพบรูปแบบการกลายพันธุ์ คือ rpoB WT8/rpoB MUT3 (27/34) (ร้อยละ 79.40) rpoB WT8/Not Detected (4/34) (ร้อยละ 11.80) rpoB WT7/rpoB MUT2B (1/34) (ร้อยละ 2.90) rpoB WT7/Not Detected (1/34) (ร้อยละ 2.90) และ rpoB MUT3 (1/34) (ร้อยละ 2.90) การศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่ดื้อ

ต่อยาไอโซไนอาซิดร่วมกับไรแฟมพิซิน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sinha และคณะ ปี 2563⁽¹¹⁾ ที่ได้ศึกษาการกลายพันธุ์ในยีน rpoB ของเชื้อวัณโรคที่เรื้อรัง ที่ดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน ด้วยลำดับดีเอ็นเอจากตัวอย่างทางคลินิก พบว่าตัวอย่าง MDR-TB จำนวน 47 ตัวอย่าง มีการหายไปของ WT8 (14; 29.80%) และการหายไปของ WT3&WT4 (16; 34.00%)

ดังนั้น การใช้วิธี Line probe assay (LPA) ทำให้สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ทำให้ดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดและไรแฟมพิซินของเชื้อวัณโรคได้ การดื้อต่อยาไรแฟมพิซิน พบการกลายพันธุ์ของยีน rpoB การดื้อต่อยาไอโซไนอาซิดส่วนใหญ่ พบการกลายพันธุ์ของยีน katG และ inhA โดยที่ katG เป็นตำแหน่งที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ catalase peroxidase เพื่อเปลี่ยนไอโซไนอาซิดจาก pro-drug ให้เป็น active form การกลายพันธุ์ของ katG สัมพันธ์กับ high level resistance ส่วน inhA เป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ mycolic acid ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไอโซไนอาซิดมาออกฤทธิ์ ถ้ามีการกลายพันธุ์ของ inhA สัมพันธ์กับ low level resistance นอกจากนี้ยังพบว่าการพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง inhA สัมพันธ์กับการดื้อยาข้ามกลุ่มกับ ethionamide และ prothionamide เนื่องจากยาออกฤทธิ์ในตำแหน่งเดียวกัน⁽¹²⁾

ข้อเสนอแนะ

รูปแบบการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาไอโซไนอาซิด ได้แก่ katG การกลายพันธุ์ของ katG สัมพันธ์กับ high level resistance ส่วน inhA สัมพันธ์กับ low level resistance ดังนั้น รูปแบบการกลายพันธุ์เกิดประโยชน์ต่อการรักษาผู้ป่วยโดยในกลุ่ม low level resistance สามารถพิจารณาใช้ยาไอโซไนอาซิดในขนาดที่สูงขึ้นในการรักษาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ด้านควบคุมโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 7 จังหวัดขอนแก่นทุกท่าน ในความช่วยเหลือต่าง ๆ หากผลการศึกษารั้งนี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับไว้เพื่อปรับปรุงแก้ไขในการศึกษารั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. Geneva, Switzerland: WHO; 2021.
2. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการบริหารจัดการผู้ป่วยวัณโรคดื้อยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2558.
3. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2564. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิกแอนด์ดีไซน์; 2564.
4. กลุ่มระบาดวิทยาและตอบโต้ภาวะฉุกเฉิน กองวัณโรค. รายงานสถานการณ์และการเฝ้าระวังวัณโรคประเทศไทย [อินเทอร์เน็ต]. 2564 [เข้าถึงเมื่อ 19 ก.พ. 2566]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.tbthailand.org/statustb.html>
5. กองวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการสอบสวนและควบคุมวัณโรค (ฉบับปรับปรุง

- พ.ศ. 2566). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟิคแอนด์ดีไซน์; 2566.
6. อรุณรัตน์ อร่ามทิพย์, อนุกุล บุญคง, ปฐมพงศ์ แยมั่น, วุฒิชัย ปัญญาสิทธิ์, วีรลักษณ์ สายต่างใจ. การกระจายตัวของยีนดื้อยา Rifampicin และ Isoniazid ในผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยงวัณโรคดื้อยาโดยวิธี Line probe assay. วารสารโรคและภัยสุขภาพ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ 2561;12(3):11-6.
7. Charan AS. et al. Pattern of *InhA* and *KatG* mutations in isoniazid monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Lung India. 2020;37(3):227-31.
8. Tavakkoli Z, Nazemi A. Genotyping of related mutations to drug resistance in isoniazid and rifampin by screening of *katG inhA* and *rpoB* genes in *Mycobacterium tuberculosis* by high resolution melting method. J Mycobact Dis. 2018;8:265-70.
9. Huyen MN. et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:3620-7.
10. Tadesse M. et al. Drug resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* from pulmonary tuberculosis patients in Southwest Ethiopia. Int J Mycobacteriology. 2016;5:185-91.
11. Sinha P, Srivastava GN, Tripathi R, Mishra M, Anupurba S. Detection of mutations in the *rpoB* gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. BMC Microbiology. 2020;20:284.
12. วรวัฒน์ จำปาเงิน, วิภา รัชชพิชิตกุล. วัณโรคดื้อยาไอโซไนอาซิด แนวทางปฏิบัติจากองค์การอนามัยโลก ปี 2018. วารสารอายุรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2561;4(2):4-9.