Chulalongkorn University
Chula Digital Collections

Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)

2018

การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

นฤมล สือกิตินันท์
คณะแพทยศาสตร์

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd

Part of the Medical Sciences Commons

Recommended Citation

สือกิตินันท์, นฤมล, "การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด" (2018). *Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD)*. 3631.
https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/3631

This Thesis is brought to you for free and open access by Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn University Theses and Dissertations (Chula ETD) by an authorized administrator of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

น.ส.นฤมล ลือกิตินันท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gene expression test for diagnosis in tuberculous pleuritis.

Miss Narumol Luekitinun

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด
โดย	น.ส.นฤมล ลือกิตินันท์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์กมล แก้วกิติณรงค์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ขจร ตีรณธนากุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์กมล แก้วกิติณรงค์)

.... กรรมการ

(อาจารย์ แพทย์หญิงศิริพร อธิสกุล)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ แพทย์หญิงเปี่ยมลาภ แสงสายัณห์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

นฤมล ลือกิตินันท์ : การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด. (Gene expression test for diagnosis in tuberculous pleuritis.) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. นพ.กมล แก้วกิติณรงค์

ที่มา: วัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นสาเหตุของ น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นที่สามารถรักษาให้หายได้ที่พบบ่อยที่สุด การวินิจฉัยแยกโรคจากมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอดยังเป็นปัญหาสำคัญ มีการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคในเลือดเพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคปอด แต่ยังไม่มีข้อมูลในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคจากน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดของผู้ป่วยที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น

วิธีการศึกษา: ผู้ป่วยที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นแต่ละคน จะได้รับการเก็บน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดอย่างละ 3 ซีซี เพื่อส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค โดยวิธีการ quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) ยีนดังกล่าวได้แก่ *FCGR1B1, FCGR1B2, FCGR1A, MAFB, GBP5, APOL1, KCNJ15, STAT1, KAZN* และ *CD53* ค่าที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและกลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด

ผลการศึกษา: ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 16 คนและมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด 18 คน เข้าร่วมการศึกษาช่วงปี พ.ศ. 2561 – 2562 ระดับยีน *GBP5* และ *STAT1* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดมีการแสดงออกสูงในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีค่าสูงกว่ากลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*GBP5* 8.0 เทียบกับ 0.8, $p<0.001$ และ *STAT1* 11.1 เทียบกับ 3.1, $p<0.001$) ระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* และ *STAT1* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดสอดคล้องไปกับการแสดงออกของยีนในเลือด (*GBP5* $r=0.384$, $p=0.025$ และ *STAT1* $r=0.436$, $p=0.010$) ระดับยีน *GBP5* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดมีค่า area under receiving operating curve (AUROC) สูงที่สุดร้อยละ 97.9% (95%CI 93.5-100%) โดยเมื่อใช้ระดับ 3.0 ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแล้ว จะมีความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์เชิงบวก และค่าพยากรณ์เชิงลบ เป็นร้อยละ 93.8, 100, 100 และ 94.7 ตามลำดับ

สรุปผล: ยีน *GBP5* และ *STAT1* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดมีความสัมพันธ์กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด โดยเฉพาะระดับยีน *GBP5* อาจนำมาใช้วินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	
ปีการศึกษา	2561	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	

6074017630 : MAJOR MEDICINE

KEYWORD: Pleural tuberculosis, TB pleura, Malignant pleural effusion, MPE, Gene expression

Narumol Luekitinun : Gene expression test for diagnosis in tuberculous pleuritis.. Advisor: Asst. Prof. KAMOL KAWKITINARONG, M.D.

Background: Pleural tuberculosis (TB pleura) is the most common treatable cause of lymphocytic exudative pleural effusion. Differentiation of TB pleura from malignant pleural effusion (MPE) is often problematic in clinical practice. The blood TB-specific genes expression and its diagnostic implication in active pulmonary tuberculosis has been observed, but data in TB pleura is lacking.

Objective: This study was aimed to investigate the TB-specific genes expression in pleural fluid and blood samples in settings of lymphocytic exudative pleural effusion.

Methods: Each patient with lymphocytic exudative pleural effusion was asked to provide 3 ml of pleural fluid and 3 ml of blood samples. The quantitative real-time PCR was used to measure the expression levels of 10 TB-specific genes from the pleural fluid and blood samples. The genes include *FCGR1B1, FCGR1B2, FCGR1A, MAFB, GBP5, APOL1, KCNJ15, STAT1, KAZN* and *CD53.* The levels of each genes between TB pleura and MPE groups was compared.

Results: Total 16 TB pleura and 18 MPE patients were prospective enrolled during 2018-2019. The pleural *GBP5* (8.0 vs. 0.8, $p<0.001$) and pleural *STAT1* (11.1 vs. 3.1, $p<0.001$) were significantly higher expressed in TB pleura comparing to MPE group and also correlated with the blood *GBP5* ($r=0.384$, $p=0.025$) and blood *STAT1* ($r=0.436$, $p=0.010$). The pleural *GBP5* had highest AUROC 97.9% (95%CI 93.5-100%) and its cut point at 3.0 had sensitivity 93.8%, specificity 100%, PPV 100% and NPV 94.7%.

Conclusion: *GBP5* and *STAT1* in both pleural fluid and blood samples were associated with TB pleura. Especially *GBP5* can be used in TB pleura diagnosis.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study:	Medicine	Student's Signature	
Academic Year:	2018	Advisor's Signature	

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าได้รับความเมตตากรุณา คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีจาก ผศ.นพ.กมล แก้วกิติณรงค์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สาขาวิชาโรคระบบการหายใจและภาวะวิกฤติ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยิ่งไปกว่านั้นยังมีผู้ร่วมวิจัยจากศูนย์พันธุศาสตร์ทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่ ดร.นพ.สุรัคเมธ มหาสิริมงคล, ดร.นุสรา สัตย์เพริศพราย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์พันธุศาสตร์ทางการแพทย์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการตรวจตัวอย่าง เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่หน่วยโรคระบบการหายใจฯ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดของผู้ป่วย และผู้ป่วยทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการวิจัยฯ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย มา ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ ดร.นพ.ไพโรจน์ เสาน่วม และ ดช.พุฒิพัฒน์ ลือกิตินันท์ สามีและลูกชายสุดที่รักสำหรับกำลังใจในทุกเรื่อง

นฤมล ลือกิตินันท์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	1
สารบัญแผนภูมิ	2
สารบัญรูปภาพ	3
บทที่ 1 บทนำ	4
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	4
1.2 คำถามของการวิจัย	6
1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย	6
1.4 สมมติฐาน	6
1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น	7
1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	8
1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย	8
1.8 รูปแบบการวิจัย	9
1.9 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ	9
1.10 ปัญหาทางจริยธรรม	10
1.11 ข้อจำกัดในการวิจัย	11
1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	11
1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการที่ใช้แก้ไข	11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง....13
2.1 ระบาดวิทยา (Epidemiology)....13
2.2 พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)....13
2.3 ลักษณะทางคลินิก (Clinical manifestation)....15
2.4 การตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (Diagnostic tests for pleural tuberculosis)....16
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย....23
3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย....23
3.2 ขนาดตัวอย่าง และ การคำนวณ....34
3.3 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย....36
3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล....38
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล....41
4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา สถิติที่ใช้ และข้อมูลพื้นฐาน (baseline characteristics)....41
4.2 ผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ (study outcomes)....46
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ....59
5.1 อภิปรายผล และเปรียบเทียบกับการศึกษาที่คล้ายคลึงกัน....59
5.2 จุดแข็งของงานวิจัย....64
5.3 ข้อจำกัดของงานวิจัย....65
5.4 ข้อเสนอแนะ....66
5.5 สรุปผล....67
บรรณานุกรม....68
ภาคผนวก....72
ภาคผนวก ก แบบเก็บข้อมูลงานวิจัย....72
ประวัติผู้เขียน....76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย 42

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลระดับการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 44

ตารางที่ 3 แสดงผลการส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 44

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย...45

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดของผู้ป่วย 47

ตารางที่ 6 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ ROC (AUC) ของยีน PF_GBP5, BL_GBP5, PF_STAT1, BL_STAT1 และ pleural ADA...56

ตารางที่ 7 แสดงค่าดัชนีการวินิจฉัยแยกโรคด้วยระดับยีน GBP5 จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดตัดค่าที่ระดับ 3.0 normalized expression 57

ตารางที่ 8 แสดงค่าดัชนีการวินิจฉัยแยกโรคด้วยระดับยีน *GBP5* ในเลือด ตัดค่าที่ระดับ 8.0 normalized expression...58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย 8

แผนภูมิที่ 2 แสดงกลไกแสดงการเกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 14

แผนภูมิที่ 3 แสดงขั้นตอนสรุปกระบวนการสกัด RNA โดยใช้ชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ตาม Protocol flowchart ของบริษัท Applied Biosystems..32

แผนภูมิที่ 4 แสดงขั้นตอนการคัดเลือกอาสาสมัครในงานวิจัย 36

แผนภูมิที่ 5 แสดงกระบวนการส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน..38

แผนภูมิที่ 6 Boxplots แสดงค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (PF) (แผนภูมิย่อยที่ a-j) และในเลือด (BL) (แผนภูมิย่อยที่ k-t) 49

แผนภูมิที่ 7 Boxplots แสดงค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีน GBP5 and STAT1 จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (PF) (แผนภูมิย่อย a-b) และในเลือด (BL) (แผนภูมิย่อย c-d)................................53

แผนภูมิที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกของระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดกับในเลือด ของยีน GBP5 แผนภูมิย่อย (a) และ STAT1 แผนภูมิย่อย (b) 54

แผนภูมิที่ 9 แสดง receiver operating curve (ROC) ของยีน PF_GBP5, BL_GBP5, PF_STAT1, BL_STAT1 และ pleural ADA..55

แผนภูมิที่ 10 Scatter plot แสดงจุดตัดของระดับยีน GBP5 จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ที่ 3.0 normalized expression..56

แผนภูมิที่ 11 Scatter plot แสดงจุดตัดของระดับยีน GBP5 ในเลือดที่ 8.0 normalized expression..58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 แสดงหลอด RNA collection tube มีชื่อการค้าว่า TempusTM Blood RNA tube ของบริษัท Applied Biosystems (บันทึกภาพเอง) 26

รูปภาพที่ 2 แสดงชุดอุปกรณ์สกัด RNA ออกจาก whole blood มีชื่อการค้าว่า Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ของบริษัท Applied Biosystems (บันทึกภาพเอง)........ 27

รูปภาพที่ 3 แสดงเครื่อง QX200™ Droplet Generator (ภาพซ้าย) และ PCR plate sealer (ภาพขวา) 27

รูปภาพที่ 4 แสดงเครื่อง QX200™ Droplet Reader ของบริษัท Bio-Rad Laboratories (บันทึกภาพเอง) 28

รูปภาพที่ 5 แสดงการจับหลอด Tempus™ Blood RNA tube เขย่าในแนวขึ้นลงหลังใส่สิ่งส่งตรวจลงไปในหลอดแล้วอย่างน้อย 10 ครั้ง (บันทึกภาพเอง)........ 29

รูปภาพที่ 6 แสดงการเทสิ่งส่งตรวจจากหลอด RNA collection tubes ลงในหลอดขนาด 50 ซีซี เพื่อเตรียมการสกัด RNA (บันทึกภาพเอง)........ 30

รูปภาพที่ 7 แสดงการใส่สาร PBS 1 หยดจากชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ลงในหลอดขนาด 50 ซีซี ที่มีสิ่งส่งตรวจแล้ว เพื่อเตรียมการสกัด RNA (บันทึกภาพเอง)........ 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญและยังเป็นสาเหตุของการป่วยและการเสียชีวิตในหลายๆ ประเทศทั่วโลก องค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้วัณโรคอยู่ในภาวะฉุกเฉินสากลและต้องการการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ประเทศไทยถูกจัดอยู่ในลำดับที่ 26 ของทั้งหมด 30 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรคสูงที่สุดทั่วโลก ซึ่งจากรายงานขององค์การอนามัยโรคปี พ.ศ. 2561 ได้คาดประมาณอัตราอุบัติการณ์วัณโรคของประเทศไทยอยู่ที่ 156 รายต่อแสนประชากรและมีผลสำเร็จของการรักษาผู้ป่วยวัณโรคทุกประเภทร้อยละ 82.9 [1, 2] โดยที่วัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นวัณโรคนอกปอดชนิดที่พบบ่อยเป็นลำดับที่สองรองจากวัณโรคต่อมน้ำเหลือง คิดเป็นร้อยละ 27.4 ของวัณโรคนอกปอดทั้งหมด [3]

กลไกการเกิดโรคของวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเกิดจาก subpleural caseous focus แตกเข้าสู่ช่องเยื่อหุ้มปอด ทำให้ antigen ของเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* ไปจับกับ antigen presenting cells หลั่งสารกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T-lymphocytes นำไปสู่ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity reaction ทำให้เกิดการหลั่ง inflammatory cytokines หลายชนิด ไปกระตุ้นการกำจัดเชื้อวัณโรคโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ทำให้เพิ่มความสามารถของน้ำในการซึมผ่านผนังเยื่อบุหลอดเลือดฝอย (capillary permeability) และลดการดูดซึมกลับของน้ำเหลือง ทำให้เกิดน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดตามมา [4]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นทำได้ไม่ง่ายนัก แม้ว่าวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจะเป็นโรคติดเชื้อ แต่ปริมาณเชื้อวัณโรคที่มีจำนวนน้อย (paucibacillary) ทำให้การตรวจหาเชื้อก่อโรคโดยวิธีต่างๆ มีความไวต่ำ ได้แก่การตรวจย้อมสีทนกรด (acid fast bacilli) การตรวจเพาะเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture) แม้จะเพิ่มความไวมากขึ้น แต่อาจใช้เวลานานถึง 2 เดือนและมักจะไม่พบเชื้อ [4] สำหรับการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค (genetic molecular techniques) ก็มีความไวต่ำเช่นกัน

การตรวจอื่นๆ ได้แก่ การตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดตรวจทางพยาธิวิทยา การพบ granuloma สามารถใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้ แต่เป็นหัตถการที่ invasive ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะและพบภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญคือ ลมรั่วในช่องเยื่อหุ้มปอดซึ่งอาจเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ ส่วนการทำหัตถการส่องกล้องเยื่อหุ้มปอดเพื่อตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัย

จากร้อยละ 70-80 เป็นร้อยละ 95 ได้ แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะโดยผู้ที่มีความชำนาญและต้องนอนโรงพยาบาลเพื่อทำหัตถการ [5, 6] การตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเพื่อหาค่า adenosine deaminase (ADA) ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 40 จะช่วยในการวินิจฉัยได้ดี ในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูง แต่ก็มีโอกาสให้ผลบวกลวงได้ในภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่มีสาเหตุมาจากโรคอื่น ได้แก่ adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, lupus และ parapneumonic effusion [7, 8]

เนื่องจากลักษณะทางคลินิกและลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด มีความคล้ายคลึงกัน ทำให้การวินิจฉัยแยกโรคระหว่างสองโรคนี้ทำได้ยาก แต่มีความจำเป็นต้องวินิจฉัยให้ได้แน่ชัด เนื่องจากแต่ละโรคมีแนวทางการรักษาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ในบางสถานพยาบาลที่ไม่สามารถทำการตรวจวินิจฉัยด้วยหัตถการดังกล่าวได้ อาจมีการลองให้ยารักษาวัณโรคแล้วติดตามดูอาการหลังทานยาแทน ถ้าตอบสนองต่อการรักษาแบบวัณโรค ก็จัดว่าเป็นการวินิจฉัยโดยการทดลองรักษา (therapeutic diagnosis) แต่วิธีดังกล่าวนี้ ก็มีความเสี่ยงต่ออาการไม่พึงประสงค์จากยารักษาวัณโรคโดยไม่จำเป็นได้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทดลองหาเทคนิคการตรวจใหม่เพื่อช่วยในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพง และมีความเสี่ยงจากการตรวจวินิจฉัยน้อยที่สุด

จากหลักการปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity reaction ซึ่งเป็นกลไกหลักในการเกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น มี interferon gamma (IFN-γ) และ tumor necrosis factor alpha (TNF-α) เป็น inflammatory cytokines ที่น่าสนใจ [4] และนำไปสู่การค้นหา genetic biomarkers ที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคชนิด active tuberculosis ในระบบของ IFN-γ พบว่ามี 13 ยีนที่มีระดับการแสดงออกของยีนในเลือด ตามหลังการติดเชื้อวัณโรคสูงกว่ายีนอื่น ได้แก่ ***SORT1, EPB41L3, KCNJ15, MAFB, PSTPIP2, GBP5, FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, KAZN, APOL1, STAT1, WARS*** ซึ่งทั้ง 13 ยีนนี้ลดระดับการแสดงออกลงหลังจากรักษาวัณโรคไปแล้ว 2 อาทิตย์ [9, 10] ในเวลาต่อมา การศึกษาในประเทศไทยสนับสนุนว่ายีน 7 ยีนต่อไปนี้ได้แก่ ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, MAFB, APOL1, STAT1 และ KAZN*** มีระดับการแสดงออกในเลือดสูงในผู้ป่วยวัณโรค และการส่งตรวจดูระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้สามารถนำมาคำนวณ “TB sick score” เพื่อใช้วินิจฉัยวัณโรคปอดได้ โดยให้ค่าความไวร้อยละ 82.5 และความจำเพาะร้อยละ 100 [11] แต่จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีข้อมูลการนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกวัณโรคเยื่อหุ้มปอดออกจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในเวชปฏิบัติปัจจุบัน และเนื่องจากการรักษาทั้งสองกลุ่มโรคแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก

ระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดแตกต่างกันหรือไม่

Is gene expression level of pleural fluid in patients with tuberculous pleuritis different from pleural fluid in malignant pleural effusion?

คำถามรอง

ดัชนีในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด เช่น ความไว ความจำเพาะ ของการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นอย่างไรเมื่อเทียบกับการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีปกติ

How is the diagnostic yield in diagnosis of tuberculous pleuritis, such as sensitivity and specificity, by gene expression levels of pleural fluid compared with conventional methods?

1.3 วัตถุประสงค์งานวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด

To compare the gene expression level of pleural fluid in patients with tuberculous pleuritis with malignant pleural effusion.

วัตถุประสงค์รอง

เพื่อคำนวณดัชนีในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด เช่น sensitivity, specificity, negative predictive value และ positive predictive value เป็นต้น ของการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเมื่อเทียบกับการตรวจวินิจฉัยโดยวิธีปกติ

To calculate the diagnostic indexes in diagnosis of tuberculous pleuritis, including sensitivity, specificity, negative predictive value and positive predictive value by gene expression level of pleural fluid compared with conventional methods.

1.4 สมมติฐาน

Null hypothesis (H_0)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ไม่แตกต่าง จากผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด

Alternative hypothesis (H_1)

ระดับการแสดงออกของยีนในสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด แตกต่าง จากผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด

1.5 ข้อตกลงเบื้องต้น

งานวิจัยเริ่มต้นจากผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและมีลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocyte exudative pleural effusion) ซึ่งสาเหตุหลักได้แก่วัณโรคเยื่อหุ้มปอดและ โรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือด เจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดเพื่อการวินิจฉัยโรคและมีการเก็บข้อมูลพื้นฐานส่วนบุคคลและลักษณะทางคลินิก มีการติดตามผู้ป่วยแต่ละรายจนได้การวินิจฉัยสุดท้าย โดยไม่ได้มีส่วนควบคุมการตัดสินใจของแพทย์ผู้รักษา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย

1.7 คำนิยามเชิงปฏิบัติการที่ใช้ในการวิจัย

วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (Pleural tuberculosis หรือ Tuberculous pleuritis หรือ TB pleura) แบ่งการวินิจฉัยเป็นสามระดับดังต่อไปนี้ ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 12 (12, 13)

1) Definite diagnosis ได้แก่

(1) ผลตรวจเพาะเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture) จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด หรือจากเสมหะพบเชื้อวัณโรค

หรือ

(2) ผลตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อวัณโรค (PCR) จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด หรือจากเสมหะพบเชื้อวัณโรค

2) Probable diagnosis ได้แก่

(1) ผลตรวจทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด พบ granuloma ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

หรือ

(2) ผลตรวจย้อมสีพบการติดสีทนกรด (acid fast bacilli) จากเสมหะ หรือ น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

และ

(3) ต้องไม่เข้าเกณฑ์ของ definite diagnosis

3) Possible diagnosis ได้แก่

(1) ผลวิเคราะห์น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเป็นชนิด lymphocytic exudate profile ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

และ

(2) ต้องไม่เข้าเกณฑ์ของ definite diagnosis และ probable diagnosis

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด (Malignant pleural effusion หรือ MPE)

วินิจฉัยจากการตรวจพบเซลล์มะเร็งในน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดอย่างใดอย่างหนึ่ง

1.8 รูปแบบการวิจัย

Prospective nested case-control study

1.9 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1) แพทย์ผู้วิจัยประสานงานหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เตรียมร่างโครงการวิจัยฯ เพื่อขอทุนสนับสนุนงานวิจัย และขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

2) แพทย์ผู้วิจัยโฆษณาประชาสัมพันธ์ทั้งโดยการบอกกล่าวด้วยวาจาและติดป้ายประกาศโครงการวิจัยฯ เพื่อขอความร่วมมือแพทย์ใน รพ.จุฬาฯ ซึ่งดูแลผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ยังไม่ทราบการวินิจฉัยโรคใน รพ.จุฬาฯ ได้แนะนำผู้ป่วยให้รู้จักแพทย์ผู้วิจัย และทำนัดคนไข้มาตรวจกับแพทย์ผู้วิจัยเพื่อรับการตรวจวินิจฉัยโรคตามเวชปฏิบัติปกติ

3) กำหนดรูปแบบการวิจัยเป็น prospective nested case-control study คือเริ่มต้นด้วยการทำ cohort study โดยแพทย์ผู้วิจัยติดตามผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดง ตรวจร่างกายและภาพถ่ายรังสีทรวงอกพบน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ผลการตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด พบว่ามีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่นมากกว่า 50% หรือเรียกว่าเป็น lymphocyte-predominate exudate profile จากนั้นแพทย์ผู้วิจัยขอความยินยอมอาสาสมัคร เพื่อขออนุญาติในการเก็บเลือดและน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด ขอความยินยอมผู้ป่วยในการเจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด การเจาะเลือดตามข้อบ่งชี้ซึ่งเป็นมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคตามเวชปฏิบัติปกติ

4) เมื่อได้ผลการตรวจวินิจฉัยแยกโรคที่แน่นอนแล้วค่อยทำ case-control study จากคนที่อยู่ใน cohort study นั้น โดยแพทย์ผู้วิจัยจะดำเนินการคัดเลือกตาม inclusion และ exclusion criteria จากนั้นจำแนกผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็น case group และกลุ่มที่เป็นโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเป็น control group ส่วนผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด neutrophil exudate profile หรือผู้ป่วยที่ไม่ทราบการวินิจฉัยแน่ชัดว่าสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีสาเหตุจากอะไรนั้นถูกคัดออกจากการศึกษา และผู้ป่วยได้รับการตรวจรักษาตามมาตรฐานทางการแพทย์

5) แพทย์ผู้วิจัยขอความยินยอมอาสาสมัครทั้ง case group และ control group เข้าร่วมโครงการวิจัยฯ แบบไปข้างหน้า (prospective study) จนกว่าจะได้อาสาสมัครใน case และ control group ครบกลุ่มละ 16 คน เพื่อขออนุญาติในการส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งในเลือดและในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด และเก็บข้อมูลทางคลินิกบันทึกลงแบบบันทึกข้อมูลของโครงการวิจัยฯ โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวตนผู้ป่วยได้

6) เก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกและผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน ตามแบบบันทึกข้อมูล เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานการวิจัย และเผยแพร่ผลงานการวิจัยในวารสารทางการแพทย์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.10 ปัญหาทางจริยธรรม

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการนำสิ่งส่งตรวจซึ่งจะต้องมีการเก็บตามมาตรฐานปกติในการวินิจฉัยโรค เพียงแต่เก็บมากขึ้นเพื่อส่งตรวจระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งใช้เลือดและน้ำในช่อง

เยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยอย่างละ 3 มิลลิลิตรมิลลิลิตร เท่านั้น ความเสี่ยงจากการส่งตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคการตรวจใหม่นี้น้อยมาก เป็นเพียงความเสี่ยงที่มีโอกาสเกิดขึ้นจากการทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดตามเวชปฏิบัติปกติ

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยเป็นไปด้วยความสมัครใจ และให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (inform consent) ก่อนเข้าร่วมการศึกษาวิจัย และผู้เข้าร่วมการวิจัยสามารถออกจากการวิจัยได้ตลอด โดยที่ไม่มีผลต่อการรักษาแบบมาตรฐานในอนาคต

ข้อมูลทั้งหมดจากการวิจัยจะถูกเก็บเป็นความลับ การนำเสนองานวิจัยจะไม่มีการระบุเป็นรายบุคคล และนำเสนอในลักษณะข้อมูลรวมของผู้ป่วย

การวิจัยนี้จะต้องได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนทำการศึกษา

1.11 ข้อจำกัดในการวิจัย

1) การศึกษานี้จัดทำและดำเนินการวิจัยภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพียงแห่งเดียว และข้อมูลการศึกษามาจากการวินิจฉัยแยกโรคระหว่างผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเท่านั้น ดังนั้นการนำข้อมูลไปใช้เพื่อแปลผลในประชากรอื่น ต้องทำด้วยความระมัดระวัง

2) ยังไม่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนตัวเดียวกันในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกและลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocytic exudate จากสาเหตุอื่นเช่น กลุ่มโรคภูมิแพ้ตัวเอง (autoimmune diseases) จึงยังไม่สามารถบอกผลบวกลวง (false positive) หรือผลลบลวง (false negative) ของการตรวจระดับการแสดงออกของยีนได้

3) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ยังไม่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนก่อนและหลังการรักษาวัณโรค ไม่สามารถนำมาใช้ติดตามการรักษาได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.12 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทำให้ได้เทคนิคการตรวจใหม่ในการวินิจฉัยแยกโรคระหว่างวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด สามารถประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคการตรวจใหม่ ที่อาจทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความแม่นยำในการวินิจฉัยโรคได้ดีกว่าวิธีดั้งเดิม

1.13 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นและมาตรการที่ใช้แก้ไข

1) ความเสี่ยงจากหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดเพื่อส่งตรวจวินิจฉัยแยกโรค

การทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด มีเพียงความเสี่ยงที่มีโอกาสเกิดขึ้นตามเวชปฏิบัติปกติ ได้แก่ ความรู้สึกเจ็บปวดและอาจมีเลือดออกเฉพาะที่ในบริเวณที่ทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ซึ่งไม่ใช่ความเสี่ยงที่รุนแรง สามารถแก้ไขได้โดยฉีดยาชาก่อนทำหัตถการ ทานยาหรือฉีดยาแก้ปวดบรรเทาอาการ และตรวจสอบแก้ไขภาวะที่ทำให้เลือดออกง่ายก่อนทำหัตถการ เฝ้าระวังหลังทำหัตถการ

นอกจากนี้อาจมีความเสี่ยงจากการที่ปลายเข็มเจาะอาจไปโดนอวัยวะข้างเคียงเช่น เนื้อปอด ตับ ม้าม หรือไต ได้รับบาดเจ็บ มีเลือดออกในช่องท้อง หรือมีลมรั่วในช่องเยื่อหุ้มปอดตามมาได้ แต่โอกาสเกิดขึ้นน้อยมาก สามารถป้องกันได้โดยการใช้เครื่องอัลตร้าซาวน์ (ultrasound) ตรวจสอบตำแหน่งที่เหมาะสมก่อนทำหัตถการ และถ่ายภาพรังสีทรวงอกประเมินภาวะลมรั่วในช่องเยื่อหุ้มปอดหลังทำหัตถการ (iatrogenic pneumothorax) หากพบว่า มีภาวะลมรั่วในช่องเยื่อหุ้มปอดเกิดขึ้น ก็สามารถแก้ไขได้ด้วยการใส่สายระบายลมจากช่องเยื่อหุ้มปอด

2) จำนวนอาสาสมัครในงานวิจัยได้ไม่ครบตามที่คำนวณไว้

เนื่องจากโรงพยาบาลจุฬาฯ มีผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเป็นสัดส่วนมากกว่าผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จึงอาจทำให้ไม่ได้จำนวนอาสาสมัครในงานวิจัยครบตามที่คำนวณไว้ได้ แก้ไขโดยการขยายระยะเวลาเก็บข้อมูลให้นานขึ้นจาก 1 ปี เป็น 2 ปี หรือเพิ่มจำนวนสถาบันวิจัย เช่น สถาบันโรคทรวงอก ซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นจำนวนมาก

3) งบวิจัยไม่เพียงพอต่อการส่งตรวจระดับการแสดงออกของยีน

เนื่องจากค่าหลอดที่ใช้รักษาสภาพสารพันธุกรรมในเลือดหรือน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด ราคา 400 บาทต่อหลอด เก็บสิ่งส่งตรวจสองหลอดต่อหนึ่งคน และค่าตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนราคา 3,000 บาท ต่อหนึ่งสิ่งส่งตรวจ นอกจากนี้ยังมีค่าตอบแทนเจ้าหน้าที่ช่วยงานวิจัย ค่าจ้างวิเคราะห์ข้อมูล และค่าวัสดุเอกสารสำนักงาน ซึ่งรวมเป็นค่าใช้จ่ายทั้งหมดแล้ว อาจมากกว่าจำนวนเงิน 150,000 บาท ที่ได้รับการสนับสนุนจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ แก้ไขโดยขอทุนสนับสนุนงานวิจัยจากแหล่งอื่นเพิ่มเติม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบาดวิทยา (Epidemiology)

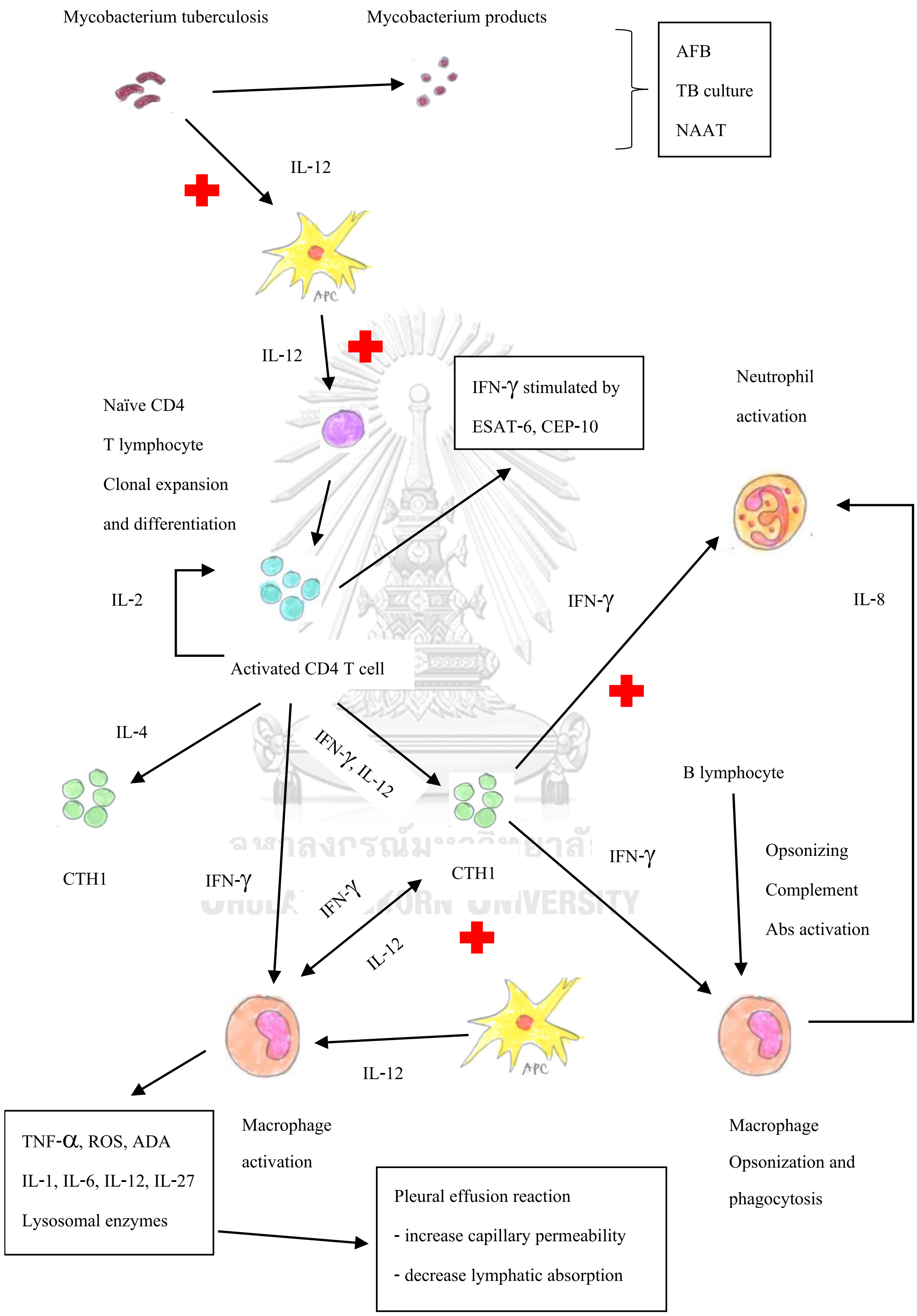
วัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นวัณโรคนอกปอดชนิดที่พบบ่อยมากที่สุดเป็นลำดับที่สองรองลงมาจากวัณโรคต่อมน้ำเหลือง โดยในประเทศที่พัฒนาแล้วอย่างสหรัฐอเมริกาพบร้อยละ 3.9 [14] ของวัณโรคทุกประเภท แต่ในประเทศกำลังพัฒนาอย่างแอฟริกาใต้พบร้อยละ 20 [15] ในแถบเอเชียเช่นประเทศเกาหลีใต้พบร้อยละ 7.3 [16] ส่วนในประเทศไทย มีการเก็บข้อมูลวัณโรคนอกปอดของโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา พบวัณโรคเยื่อหุ้มปอดสูงถึงร้อยละ 27.4 [3] โดยผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดส่วนใหญ่ พบในกลุ่มอายุ 21-30 ปี ร้อยละ 81 และพบรองลงมาในกลุ่มอายุ 11-20 ปี ร้อยละ 65 [4]

2.2 พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

วัณโรคเยื่อหุ้มปอดเกิดจากการติดเชื้อ Mycobacterium tuberculosis โดยเชื้อโรคจะไปอาศัยอยู่ในบริเวณ subpleural area ก่อให้เกิด subpleural caseous focus แตกเข้าสู่ช่องเยื่อหุ้มปอด ทำให้ antigen ของเชื้อวัณโรค Mycobacterium tuberculosis ไปจับกับ antigen presenting cells (APC) หลั่งสาร interleukin-12 (IL-12) ไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด naive CD4+ T-lymphocytes ทำให้เกิด activated CD4+ T-cell, clonal expansion และ differentiation นำไปสู่ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity reaction ทำให้เกิดการหลั่ง inflammatory cytokines หลายชนิด อาทิเช่น IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-27, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interferon gamma (IFN-γ) และ adenosine deaminase (ADA) เป็นต้น ไปกระตุ้นการกำจัดเชื้อวัณโรคโดยในช่วงแรกจะเกิด rapid influx of polymorphonuclear leukocytes ก่อน โดยเฉพาะเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils จะเป็นเซลล์เด่นภายใน 24 ชั่วโมงแรกนี้ หลังจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ค่อยตามมาภายใน 96 ชั่วโมง แล้วค่อยเปลี่ยนเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes ผลจากการกระตุ้นการหลั่ง inflammatory cytokines จำนวนมากนี้ส่งผลให้เพิ่มความสามารถของน้ำในการซึมผ่านผนังเยื่อบุหลอดเลือดฝอย (capillary permeability) และลดการดูดซึมกลับของน้ำเหลือง เกิดน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดตามมาดังแสดงในแผนภูมิที่ 2 ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 4 [4]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนภูมิที่ 2 แสดงกลไกแสดงการเกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอด



หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Tuberculosis, TB; Acid fast bacilli, AFB; Nucleic acid amplification test, NAAT; Culture filtrate protein, CFP; Antigen-presenting cell, APC; T-lymphocyte responsible for cell-mediated or delayed immunity, CTH1; T-lymphocyte responsible for humoral immunity, CTH2; Early secreted antigenic target, ESAT; Reactive oxygen species, ROS; Interleukin, IL; Interferon gamma, IFN-γ; Tumor necrosis factor alpha, TNF-α; Adenosine deaminase, ADA.

2.3 ลักษณะทางคลินิก (Clinical manifestation)

ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดส่วนหนึ่ง มีอาการคล้ายคลึงกับผู้ป่วยวัณโรคที่อวัยวะอื่นเช่น ไข้ เหงื่อออกกลางคืน เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย น้ำหนักลด ซึ่งเป็นอาการที่ไม่จำเพาะเจาะจง ส่วนอาการที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้แก่ อาการเจ็บชายโครงข้างที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเวลาหายใจเข้า (pleuritis chest pain) ร้อยละ 94 และอาการไอแบบไม่มีเสมหะ (nonproductive cough) ร้อยละ 78 ส่วนใหญ่ประมาณสองในสามของผู้ป่วยมีอาการแสดงของโรคเป็นเร็วคล้ายการติดเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ซึ่งร้อยละ 35 มีอาการเป็นเร็วภายใน 1 สัปดาห์ [17, 18]

ลักษณะสารน้ำ พบน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดข้างขวาอย่างเดียวร้อยละ 55.9 ด้านซ้ายอย่างเดียวร้อยละ 42.5 และพบทั้งสองด้านพร้อมกันได้ประมาณร้อยละ 1.6 ส่วนระดับน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดพบว่าส่วนใหญ่ ร้อยละ 47.2 มีปริมาณน้ำระหว่างหนึ่งในสามถึงสองในสามของปอดข้างเดียวกัน ร้อยละ 34.2 มีปริมาณน้ำน้อยกว่าหนึ่งในสามของปอดข้างเดียวกัน และร้อยละ 18.5 มีปริมาณน้ำมากกว่าสองในสามของปอดข้างเดียวกัน [19]

ในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสเอชไอวีสามารถตรวจพบวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้บ่อยกว่าผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคติดเชื้อไวรัสเอชไอวี โดยไม่จำเป็นต้องมีระดับเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ lymphocyte ต่ำกว่า 200 cells/µL ผู้ป่วยมักมาด้วยอาการหลักได้แก่ ไข้สูงมากกว่า 38 องศาเซลเซียส พบได้ร้อยละ 83 อาการที่พบบ่อยในลำดับถัดมาคือ น้ำหนักลดลงมากกว่า 2.25 กิโลกรัม พบได้ร้อยละ 77 และอาการไอ พบร้อยละ 77 [20] การดำเนินโรคของวัณโรคเยื่อหุ้มปอด สามารถหายได้เองแม้ไม่ต้องได้รับการรักษา แต่ร้อยละ 65 จะมีวัณโรคกำเริบได้ถึงร้อยละ 65 ภายใน 5 ปี [21, 22]

2.4 การตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (Diagnostic tests for pleural tuberculosis)

1) ลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion profile)

หัตถการที่สำคัญในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดคือ การเจาะดูดน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดไปตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดตรวจทางพยาธิวิทยา ลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น ส่วนใหญ่มีสีเหลืองใส สีฟางข้าว รองลงมาคืออาจพบสีส้มแดงได้ แต่จะไม่ออกมาเป็นสีเลือดสด ปริมาณเม็ดเลือดขาว (white blood cell: WBC) เฉลี่ย 3947 ± 6694 เซลล์/มิลลิลิตร มีสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เฉลี่ยร้อยละ 79 ± 14 หรือมากกว่าร้อยละ 50 หรือใช้สัดส่วนเซลล์ลิมโฟซัยท์ต่อนิวโตรฟิลล์ (lymphocyte : neutrophil ratio) มากกว่า 0.75 แต่ภายใน 2 สัปดาห์แรกอาจพบสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลล์ เด่นได้ในบางราย ลักษณะน้ำเป็นแบบ exudative effusion ตาม Light’s criteria โดยมีค่าระดับ lactate dehydrogenase (LDH) สูงเฉลี่ย 731 ± 938 U/ลิตร สัดส่วนโปรตีนในน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดต่อในเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 0.72 + 0.12 ระดับน้ำตาลในน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเฉลี่ยเท่ากับ 70 ± 12 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าถ้าพิจารณาเฉพาะการมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่น อาจมีความคล้ายคลึงกับโรคมะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอดได้ แต่ระดับค่าเฉลี่ย pleural ADA จะพบว่าสูงในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเมื่อเทียบกับสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด [7]

2) Pleural adenosine deaminase (pleural ADA)

Adenosine deaminase คือ purine-degrading enzyme เป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเม็ดเลือดขาวชนิด T-lymphocyte เมื่อมีการติดเชื้อวัณโรคในร่างกาย มี 2 isoforms ได้แก่ ADA1 พบในทุกเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะใน lymphocytes และ monocytes ส่วน ADA2 พบเฉพาะใน monocytes ซึ่ง ADA2 เป็น isoform ที่พบได้มากในวัณโรคเยื่อหุ้มปอด [12] ค่า cut-off ของ ADA จากการศึกษาต่างๆ มีค่าแตกต่างกันไป โดยมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่แตกต่างกัน การใช้ค่า cut-off level ที่ ≥ 40 IU/ml ให้ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดต่างกันไปในแต่ละการศึกษา ตั้งแต่ร้อยละ 68 ถึง 91 [8] นอกจากนี้ ค่า pleural ADA สามารถให้ผลบวกลวง (false positive) ได้จากภาวะ rheumatoid pleural effusion, bacterial pleural effusion, mesothelioma, lung cancer และ hematologic malignancy โดยเฉพาะ lymphoma ส่วนผลลบลวงอาจพบได้ในผู้สูงอายุ หรือคนที่ยังไม่เลิกสูบบุหรี่ [23]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3) Pleural interferon gamma (pleural IFN-γ)

Interferon gamma คือ cytokine ชนิดหนึ่งที่หลั่งออกมาจาก activated CD4+ T lymphocyte ที่ตอบสนองต่อ mycobacterial specific antigen สองตัวคือ early secretory antigen-6 (ESA- 6) และ culture filtrate protein-10 (CFP-10) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อวัณโรค IFN-γ หลั่งออกมาเพื่อกระตุ้น macrophage ให้กำจัดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ดังนั้นค่า IFN-γ ไม่ขึ้นในคนที่ฉีดวัคซีน BCG มาแล้ว จึงเหมาะที่จะใช้ตรวจการติดเชื้อวัณโรคแฝงในผู้ป่วยที่เคยฉีดวัคซีน BCG มาก่อน ถ้าใช้ค่า cut-off ของระดับ IFN-γ ใน pleural fluid ที่ 240 pg/mL จะให้ความไวร้อยละ 95 และความจำเพาะร้อยละ 96 [(24)] แต่เนื่องจากการตรวจ IFN-γ ใน pleural fluid มีค่าใช้จ่ายสูง ร่วมกับความยุ่งยากในการทำ ELISA test ต้องมีจำนวนสิ่งส่งตรวจที่มากพอในการตรวจพร้อม ๆกัน 1 ครั้ง และขาดการ standardized assay จึงไม่เป็นที่นิยม [(12)]

4) Pleural nucleic acid amplification test (NAAT) เช่น pleural PCR-TB

Nucleic acid amplification test คือการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจต่างๆเช่น จากเสมหะหรือจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย ได้แก่การตรวจ polymerase chain reaction (PCR), Xpert MTB/RIF (Cepheid) แม้ว่าจะมีความไวมากกว่าการย้อมสีทนกรด และการเพาะเชื้อวัณโรคจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด แต่ก็ยังมีความไวต่ำคือความไวในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเพียงร้อยละ 25 แต่ให้ความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 [(25)]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5) Pleural fluid smear microscopy (pleural AFB)

Acid fast bacilli (AFB) คือการย้อมสีทนกรดจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด โดยพบเชื้อติดสีทนกรด น้อยกว่าร้อยละ 0-5 แต่เพิ่มความไวเป็นร้อยละ 15 ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเอชไอวีด้วย ยกเว้นกลุ่มที่เป็น TB empyema ที่พบเชื้อติดสีทนกรดได้ร้อยละ 20 [(8)]

6) Pleural fluid mycobacterium tuberculosis culture

Mycobacterial culture คือการเพาะเชื้อวัณโรคจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ให้ความไวประมาณร้อยละ 30 แต่ให้ความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 100 โดยที่ liquid media ใช้เวลาในการพบเชื้อได้เร็วสุด 2 สัปดาห์ ซึ่งไวกว่า solid media ที่ใช้เวลาได้เร็วสุด 6 สัปดาห์ การเพิ่มปริมาณน้ำ pleural fluid ในการเพาะเชื้อก็ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแต่อย่างใด [(8)]

7) Pleural tissue biopsy

คือการตรวจทางพยาธิวิทยาของชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดพบลักษณะ caseating granulomas โดยให้ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยสูงถึงร้อยละ 60-95 และ 95 ตามลำดับ [25] ซึ่งขึ้นกับว่าได้ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดมาโดยวิธีใด เช่น จากการทำ closed pleural biopsy, medical thoracoscopy, video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) หรือ open surgical biopsy ซึ่งย่อมจะให้ความไวที่แตกต่างกัน วิธีการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ขึ้นอยู่กับศักยภาพของแต่ละโรงพยาบาลด้วย มีข้อมูลจากการศึกษาหนึ่ง พบว่าการทำ ultrasound guided closed pleural biopsy เมื่อเทียบกับ closed pleural biopsy ตามปกติ จะเพิ่ม diagnostic yield จากร้อยละ 77.8 เป็น 88.9 [5] ส่วนการทำ thoracoscopic biopsy จะเพิ่มความไวสูงถึงร้อยละ 95-100 [6] นอกจากนี้ในบางการศึกษาพบว่า การใช้ผลตรวจหลายวิธีรวมกัน ได้แก่ ADA > 50 IU/L, lymphocyte to neutrophil ratio > 0.75 และ closed pleural biopsy จะให้ความไวและความจำเพาะในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดสูงถึงร้อยละ 93 และ 100 ตามลำดับ [26]

8) การตรวจระดับการแสดงออกของยีน (Gene expression level)

คือวิธีการตรวจใหม่ ที่ตรวจวัดระดับการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เป็น genetic biomarker ซึ่งมีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเลือดตามหลังการติดเชื้อวัณโรค และลดระดับการแสดงออกลงหลังจากผู้ป่วยได้รับการรักษาวัณโรคไปแล้ว

โดยเริ่มต้นมาจากการศึกษาของ Berry MP และคณะ [9] ที่ต้องการค้นหา biomarker สำหรับบ่งชี้สภาวะการติดเชื้อวัณโรคในมนุษย์ โดยศึกษาการแสดงออกของยีน (blood transcript) ทั้งหมดที่สกัดได้จากเลือดหรือเรียกว่า blood transcriptome ของอาสาสมัครชาวอังกฤษในงานวิจัยทั้งหมด 54 คน ในจำนวนนี้แบ่งเป็น ผู้ติดเชื้อวัณโรคแบบเฉียบพลัน (active tuberculosis; ATB) 21 คน เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อวัณโรคแบบแอบแฝง (latent tuberculosis infection; LTBI) 21 คน และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการติดเชื้อ (control) 12 คน พบว่ามี 393 ยีนในเลือดที่มีระดับการแสดงออกมากขึ้นกว่าปกติ (overexpression) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อวัณโรคแบบ active tuberculosis แต่กลับมีระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้เป็นปกติในกลุ่มวัณโรคแอบแฝงและกลุ่มควบคุม

จากนั้น Berry MP และคณะ [9] จึงนำยีน 393 สำเนาชุดนี้ ไปทดสอบซ้ำในผู้ป่วยชาวแอฟริกาทั้งหมด 51 คน ในจำนวนนี้แบ่งเป็นกลุ่มวัณโรคแบบเฉียบพลัน 20 คน และกลุ่มวัณโรคแอบแฝง 31 คน พบว่ายีนทั้ง 393 สำเนานี้ ยกตัวอย่างยีนเช่น ***OAS1, IFI6, IFI44, IFI44L, OAS3, IRF7, IFIH1, IFI16, IFIT3, IFIT2, OAS2, IFITM3, IFITM1, GBP1, GBP2, GBP5, TAP1,***

STAT1, STAT2, IFI35, TAP2, CD274, SOCS1, CXCL10, IFIT5, EPB41L3, MAFB, APOL1, FCGR1A, FCGR1B, SORT1, WARS เป็นต้น ซึ่งอยู่ในระบบของ interferon signaling pathway ชนิด type II interferon (IFN-γ) และ type I interferon (IFN-α/IFN-β) มีการแสดงออกในเลือดของผู้ป่วยกลุ่มวัณโรคเฉียบพลันมากกว่าปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มวัณโรคแอบแฝงเช่นเดียวกันกับที่พบในผู้ป่วยชาวอังกฤษ นอกจากนี้ในจำนวนยีน 393 สำเนานี้ มี 86 ยีนที่มีระดับการแสดงออกที่จำเพาะกับผู้ป่วยวัณโรคปอด เปรียบเทียบกับการไม่พบการแสดงออกมากกว่าปกติเลยในอีก 4 ภาวะได้แก่ การติดเชื้อแบคทีเรียชนิด Staphylococcus infection, โรคทางภูมิคุ้มกันชนิด Still's syndrome, โรคเอสแอลอี (SLE; systemic lupus erythematosus) และคนปกติ (healthy control) ยิ่งไปกว่านั้นระดับการแสดงออกของยีน 393 ยีนเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงกลับสู่ระดับปกติภายใน 2 เดือนแรกของการรักษาวัณโรคปอด และกลับเข้าสู่ระดับการแสดงออกปกติเมื่อติดตามไปจนถึง 12 เดือนหลังเริ่มรักษาวัณโรคปอด

ต่อมา Bloom CI และคณะ [10] ศึกษาเพิ่มเติมจาก Berry MP และคณะ [9] โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหายีนที่จำเพาะเจาะจงต่อการเป็นวัณโรคปอดซึ่งจะสามารถนำมาใช้ติดตามการรักษาวัณโรคได้เร็วขึ้นที่ 2 สัปดาห์หลังเริ่มการรักษา โดยมีการนำเอาตัวอย่างของคนไข้ชาวแอฟริกาที่เป็นกลุ่มวัณโรคเฉียบพลันที่ยังไม่ได้รักษาและกลุ่มวัณโรคแอบแฝงจากการศึกษาของ Berry MP และคณะ [9] มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนอีกครั้ง พบว่า 664 ยีนมีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ระดับยีนของคนไข้กลุ่มเดิมที่เป็นวัณโรคเฉียบพลันหลังได้รับการรักษาไปแล้วที่ 2 สัปดาห์ 2 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน พบว่าในจำนวน 664 ยีน มีอยู่ 320 ยีนที่มีความจำเพาะเจาะจง โดยยกตัวอย่างยีนที่พบสอดคล้องไปกับการศึกษาของ Berry MP และคณะ [9] เช่น ***KCNJ15, GBP5, FCGR1A, FCGR1B, STAT1*** เป็นต้น มีการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผู้ป่วยวัณโรคได้รับยาต้านวัณโรคไปเพียงแค่ 2 อาทิตย์ และยังคงลดระดับการแสดงออกของยีนที่ 6 เดือนหลังรักษา เมื่อเทียบกับก่อนการรักษา เป็นการสนับสนุนว่า ยีนที่จำเพาะเจาะจงต่อวัณโรคปอดเหล่านี้ อาจนำมาใช้เป็น biomarker ในการติดตามผลการรักษาและเห็นการเปลี่ยนแปลงลดระดับการแสดงออกลงเร็วที่สุดที่ 2 สัปดาห์หลังเริ่มการรักษา

จากนั้น Anderson ST และคณะ [27] ได้คัดเลือกรหัสพันธุกรรมจำนวน 51 สำเนาที่สามารถใช้แยกวัณโรคจากโรคอื่นในเด็กชาวแอฟริกา มาคำนวณทางสถิติเป็นคะแนนความเสี่ยงของการเป็นวัณโรค เรียกว่า “risk score” จากนั้นก็นำคะแนนความเสี่ยงนี้มาคำนวณ พบว่ามีความไวร้อยละ 82.9 และความจำเพาะร้อยละ 83.6 ในกลุ่มที่มีผลเพาะเชื้อยืนยันการวินิจฉัยวัณโรค ส่วนในกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่พบเชื้อวัณโรคแต่มีอาการเข้าได้และตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาวัณโรค จะให้ค่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ความไวประมาณร้อยละ 35-80 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค real time PCR ของเครื่อง Xpert MTB/RIF ซึ่งเป็นวิธีการตรวจมาตรฐานที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลกปัจจุบัน พบว่า Xpert MTB/RIF มีความไวเพียงร้อยละ 54.3 ในกลุ่มที่มีผลเพาะเชื้อยืนยันการวินิจฉัยวัณโรค ส่วนในกลุ่มที่เพาะเชื้อไม่พบเชื้อวัณโรคแต่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาวัณโรคให้ค่าความไวต่ำประมาณร้อยละ 0-35 แต่ให้ค่าความจำเพาะร้อยละ 100 ดังนั้นการตรวจการแสดงออกของยีนในเลือด จึงช่วยในการวินิจฉัยวัณโรคในเด็กชาวแอฟริกาได้ดีกว่าการตรวจ Xpert

จากการศึกษาผู้ป่วยวัณโรคในประเทศแอฟริกาใต้และประเทศเยอรมัน พบว่า ***CD64*** *(Cluster of Differentiation 64)* ซึ่งกำเนิดจากยีน ***FCGR1A*** และ ***FCGR1B*** มีการแสดงออกมากและอาจมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อวัณโรคของร่างกายด้วยเช่นกัน [28, 29] ส่วนยีน ***MAFB*** และ ***KAZN*** มีรายงานว่าสัมพันธ์กับ active tuberculosis และมีการศึกษาใน genome-wide association study (GWAS) พบว่ามีบทบาทใน host susceptibility/resistance ต่อการเกิดวัณโรค [30, 31] นอกจากนี้จากการทำ GWAS ในผู้ป่วยวัณโรคไทยที่เป็น active tuberculosis 686 ราย เทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี 771 ราย พบว่ายีน ***CD53*** (cluster of Differentiation 53) ซึ่ง encode ให้ leukocyte surface glycoprotein นั้นมีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับของ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ซึ่งสัมพันธ์กับ active tuberculosis อีกด้วย [32]

ในประเทศไทย Satproedprai N และคณะ [11] ได้ใช้โปรแกรม Minimum Redundancy Maximum Relevance (mRMR) package yielded top genes ในการคัดเลือกยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคซึ่งลดระดับการแสดงออกลงหลังได้รับยารักษาวัณโรค จากงานของจากทั้งสองการศึกษาของ Berry MP และคณะ [9] และ Bloom CI และคณะ [10] พบว่ามียีน 13 สำเนาที่สำคัญดังต่อไปนี้คือ ***SORT1*** *(Sortilin1)*, ***EPB41L3*** *(Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1 Like 3)*, ***KCNJ15*** *(Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 15)*, ***MAFB*** *(Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog B)*, ***PSTPIP2*** *(Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 2)*, ***GBP5*** *(Guanylate Binding Protein 5)*, ***FCGR1A*** *(Fc Fragment of IgG Receptor IA)*, ***FCGR1B variant 1*** *(Fc Fragment of IgG Receptor IB variant 1)*, ***FCGR1 B variant 2*** *(Fc Fragment of IgG Receptor IB variant 2)*, ***KAZN*** *(Kazrin)*, ***APOL1*** *(Apolipoprotein L-I)*, ***STAT1*** *(Signal Transducer and Activator of Transcription 1)* และ ***WARS*** (*gene encode Tryptophanyl-TRNA Synthetase*) ที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรค และสามารถใช้ดูการตอบสนองต่อการรักษาวัณโรคได้อีกด้วย

Satproedprai N และคณะ [11] จึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ 13 ยีนนี้ได้แก่ ***SORT1 , EPB4 1 L3 , KCNJ1 5 , MAFB, PSTPIP2 , GBP5 , FCGR1 A, FCGR1 B variant 1 , FCGR1B variant 2, KAZN, APOL1, STAT1, WARS*** และยีนควบคุม (internal control gene) คือ ***HPRT1*** *(Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1)* ในอาสาสมัครที่กำลังเป็นวัณโรค (active tuberculosis, ATB) จำนวน 40 ราย อาสาสมัครที่เคยเป็นวัณโรคในอดีตซึ่งรักษาหายแล้ว (previous TB) จำนวน 18 ราย และอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่เคยป่วยเป็นวัณโรคมาก่อน (healthy control, HC) จำนวน 38 ราย ที่โรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ ประเทศไทย พบว่าเหลือยีน 10 สำเนาที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูงในกลุ่มที่กำลังเป็นวัณโรค เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เคยเป็นวัณโรคในอดีตและกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี ได้แก่ ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, APOL1, GBP5, PSTPIP2, STAT1, KCNJ15, MAFB*** และ ***KAZN*** แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ logistic regression analysis สร้างเป็นโมเดล “TB sick score” โดยใช้ยีน 7 สำเนาที่มีระดับการแสดงออกรวมกันแล้วใช้แยกวัณโรคได้ดีที่สุดได้แก่ ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, MAFB, APOL1, STAT1*** *และ* ***KAZN*** มาคำนวณเป็นคะแนนแล้วตัดค่าที่ 1.0 จะให้ค่าความไวร้อยละ 82.5 และความจำเพาะร้อยละ 100 ในการวินิจฉัยแยกกลุ่มที่กำลังเป็นวัณโรค ออกจากกลุ่มที่เคยเป็นวัณโรคและกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

นอกจากนี้เมื่อทำ Receiver Operating Characteristic (ROC) curve พบว่าค่า area under curve (AUC) สูงถึงร้อยละ 96.6 ซึ่งบ่งบอกว่าการตรวจวิธีใหม่นี้ ช่วยในการวินิจฉัยวัณโรคได้ดีเมื่อเทียบกับวิธีตรวจเพาะเชื้อวัณโรคตามมาตรฐาน แต่ผลการศึกษาที่ออกมาดี น่าจะเกิดจากการเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีผลตรวจยืนยันมาแล้วว่าเป็นวัณโรคปอดเสมหะพบเชื้อทั้งจากการย้อมสีทนกรด (AFB positive) และพบเชื้อจากการเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการ ส่วนกลุ่มเปรียบเทียบก็เป็นกลุ่มที่หายจากวัณโรคแล้วและรวมกับคนปกติที่ไม่เป็นโรคอะไรเลย ดังนั้นการนำไปใช้ก็ยังมีข้อจำกัดเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยเสมหะพบเชื้อเท่านั้น Satproedprai N, et al. จึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในเลือดอาสาสมัครที่มีอาการร่วมกับผลตรวจภาพถ่ายรังสีทรวงอกเข้าได้กับวัณโรคปอด แต่มีผลการย้อมสีทนกรดในเสมหะเป็นลบ (AFB negative) จำนวน 60 คน (suspected tuberculosis) ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ลงวารสาร พบว่าในจำนวน 60 คนนี้เป็นวัณโรคปอด 14 คน เป็นมะเร็ง 7 คน และไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้ 39 คน โดยที่ระดับการแสดงออกของยีนในเลือดของกลุ่มที่เป็นวัณโรคปอดแตกต่างจากกลุ่มที่เป็นมะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อย่างไรก็ตาม การตรวจระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวเป็นการตรวจจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด ไม่ต้องคำนึงถึงคุณภาพของตัวอย่างเสมหะ จึงน่าจะเหมาะสำหรับการช่วยยืนยันการวินิจฉัยวัณโรคในกรณีที่ผู้ป่วยที่มีเสมหะปริมาณน้อย ไม่สามารถขับเสมหะออกมาตรวจได้ หรือ

วัณโรคนอกปอดเนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีเชื้อปริมาณน้อย สำหรับในวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่เสมหะและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมักตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธีทดสอบมาตรฐานตามปกตินั้น ยังไม่เคยมีการศึกษาที่นำเทคนิคการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในเลือดมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมาก่อน ดังนั้นการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในงานวิจัยนี้ จึงถือว่าเป็นการศึกษาต้นแบบเกี่ยวกับเทคนิคการตรวจใหม่เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีการวิจัย

1) ประชากรเป้าหมาย (target population)

ผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocytic exudative profile) และมาตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่าง เมษายน 2561 ถึง มิถุนายน 2562 ทั้งหมด

2) ประชากรกลุ่มที่ต้องการศึกษา (case population)

ผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocytic exudative profile) และมาตรวจติดตามในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่าง เมษายน 2561 ถึง มิถุนายน 2562 และได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

3) ประชากรกลุ่มควบคุม (control population)

ผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocytic exudative profile และมาตรวจติดตามในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่าง เมษายน 2561 ถึง มิถุนายน 2562 และได้รับการตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคมะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4) วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร (approach to participant)

(1) แพทย์ผู้วิจัยจะโฆษณาประชาสัมพันธ์ทั้งโดยการบอกกล่าวด้วยวาจาและติดป้ายประกาศโครงการวิจัยฯ เพื่อขอความร่วมมือแพทย์ใน รพ.จุฬาฯ ซึ่งดูแลผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ยังไม่ทราบการวินิจฉัยโรคใน รพ.จุฬาฯ ได้แนะนำผู้ป่วยให้รู้จักแพทย์ผู้วิจัย และทำนัดคนไข้มาตรวจกับแพทย์ผู้วิจัยเพื่อรับการตรวจวินิจฉัยโรคตามเวชปฏิบัติปกติ

(2) แพทย์ผู้วิจัยซักประวัติอาการและอาการแสดงของโรค ตรวจร่างกาย ส่งถ่ายภาพรังสีทรวงอก ส่งเสมหะและเลือดของผู้ป่วยตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยแยกโรคในเบื้องต้นและบันทึกข้อมูลทางคลินิกลงเวชระเบียนตามเวชปฏิบัติปกติ

(3) แพทย์ผู้วิจัยขอความยินยอมในการเจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด เพื่อตรวจว่าน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocytic exudative profile) หรือไม่ ก่อนเข้าสู่

การศึกษา และการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดตรวจนั้นเป็นมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ไม่ทราบสาเหตุตามเวชปฏิบัติปกติ

(4) เมื่อทราบผลน้ำและผลชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ประกอบกับข้อมูลทางคลินิกก่อนหน้านี้ แพทย์ผู้วิจัยทำการวินิจฉัยโรคตามข้อบ่งชี้ จนทราบการวินิจฉัยสุดท้าย จำแนกผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดลงในกลุ่มประชากรเป้าหมาย (target or case population) ผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดลงในกลุ่มประชากรควบคุม (control population) ส่วนผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด neutrophil exudate profile หรือผู้ป่วยที่ไม่ทราบการวินิจฉัยแน่ชัดว่าน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีสาเหตุจากอะไรนั้น จะถูกคัดออกจากโครงการวิจัย แต่ถึงแม้ว่าจะไม่ใช่ประชากรที่ต้องการศึกษา ผู้ป่วยก็ยังคงได้รับการตรวจรักษาตามเวชปฏิบัติปกติ

(5) แพทย์ผู้วิจัยขอความยินยอมประชากรกลุ่มเป้าหมายและประชากรกลุ่มควบคุม เป็นอาสาสมัครในโครงการวิจัยฯ เพื่อขออนุญาติในการส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งในเลือดและในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บไว้ล่วงหน้าแล้ว และเก็บข้อมูลทางคลินิกบันทึกลงแบบบันทึกข้อมูลของโครงการวิจัยฯเพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวตนผู้ป่วยได้

5) เกณฑ์การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างเข้าร่วมโครงการวิจัย (inclusion criteria)

ต้องมีทุกข้อดังต่อไปนี้

(1) เป็นคนไทยอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี

(2) มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocytic exudative profile)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(3) สามารถเข้ารับการตรวจเลือด เจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด และตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มป

(4) ได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย และลงชื่อรับทราบก่อนเข้าร่วมการศึกษา

6) เกณฑ์ในการวินิจฉัย

วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (pleural tuberculosis หรือ tuberculous pleuritis หรือ TB pleura) แบ่งการวินิจฉัยเป็นสามระดับดังต่อไปนี้ ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงที่ 12-13 [12, 13]

(1) Definite diagnosis ได้แก่

1. ผลตรวจเพาะเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture) จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด หรือจากเสมหะพบเชื้อวัณโรค

หรือ 2. ผลตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อวัณโรค (PCR) จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้น เนื้อเยื่อหุ้มปอด หรือจากเสมหะพบเชื้อวัณโรค

(2) Probable diagnosis ได้แก่

1. ผลตรวจทางพยาธิวิทยาจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด พบ granuloma ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

หรือ 2. ผลตรวจย้อมสีพบการติดสีทนกรด (acid fast bacilli) จากเสมหะ หรือ น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดหรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

และ 3. ต้องไม่เข้าเกณฑ์ของ definite diagnosis

(3) Possible diagnosis ได้แก่

1. ผลวิเคราะห์น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเป็นชนิด lymphocytic exudate profile ร่วมกับมีอาการและอาการแสดงทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรค

และ 2. ต้องไม่เข้าเกณฑ์ของ definite diagnosis และ probable diagnosis

โรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (malignant pleural effusion หรือ MPE)

วินิจฉัยจากการตรวจพบเซลล์มะเร็งในน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด หรือจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดอย่างใดอย่างหนึ่ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

7) เกณฑ์การคัดกลุ่มตัวอย่างออกจากโครงการวิจัย (exclusion criteria) ข้อใดข้อหนึ่ง

(1) ผู้ป่วยที่มีข้อห้ามในการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อเยื่อหุ้มปอด หรือไม่สามารถทนการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดได้ เช่น มีภาวะเลือดออกมากกว่าปกติที่ไม่สามารถแก้ไขได้ หรือปริมาณน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีน้อยมากเกินไปจนไม่สามารถทำการตัดชิ้นเนื้อได้ และอาจเสี่ยงต่อการเกิดลมรั่วในช่องเยื่อหุ้มปอดตามมา เป็นต้น

(2) ผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด neutrophil exudate profile

(3) ผู้ป่วยที่ไม่ทราบการวินิจฉัยแน่ชัดว่าสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีสาเหตุจากอะไร

8) กระบวนการขอความยินยอม (informed consent process)

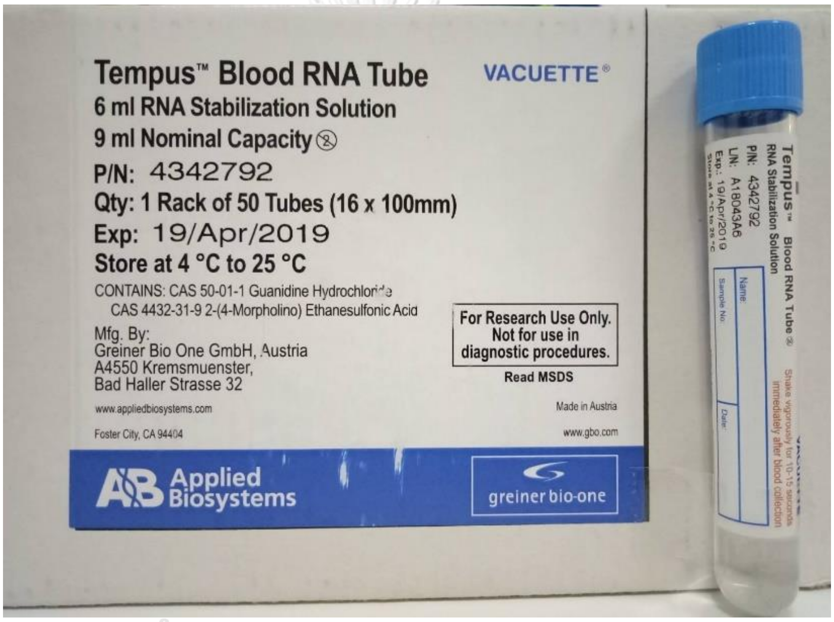
แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัคร แจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้อาสาสมัครได้พิจารณาก่อนตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัยฯ เพื่อขออนุญาติในการส่งตรวจวัด

ระดับการแสดงออกของยีนทั้งในเลือดและในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด และเก็บข้อมูลทางคลินิกบันทึกลงแบบบันทึกข้อมูลของโครงการวิจัยฯเพื่อใช้วิเคราะห์ข้อมูลต่อไป โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวตนผู้ป่วยได้

9) การตรวจระดับการแสดงออกของยีน

9.1) อุปกรณ์และเครื่องมือ

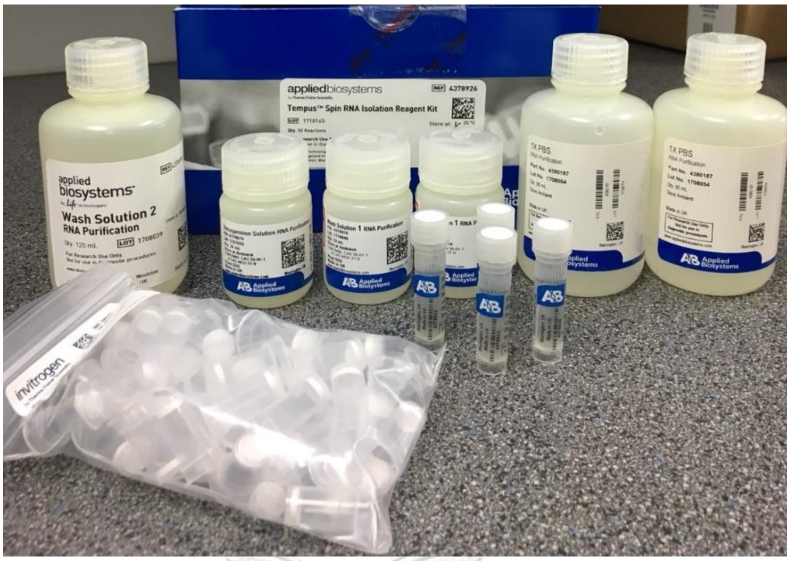
(1) อุปกรณ์เก็บตัวอย่างตรวจจากคนไข้ ใช้หลอด RNA collection tube มีชื่อการค้าว่า Tempus™ Blood RNA tube เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Applied Biosystems ตาม**รูปภาพที่ 1**



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปภาพที่ 1 แสดงหลอด RNA collection tube มีชื่อการค้าว่า TempusTM Blood RNA tube ของบริษัท Applied Biosystems (บันทึกภาพเอง)

(2) ชุดอุปกรณ์สกัด RNA ออกจาก whole blood ใช้ชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Reagent Kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Applied Biosystems ตาม**รูปภาพที่ 2**



รูปภาพที่ 2 แสดงชุดอุปกรณ์สกัด RNA ออกจาก whole blood มีชื่อการค้าว่า Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ของบริษัท Applied Biosystems (บันทึกภาพเอง)

(3) เครื่องมือตรวจระดับการแสดงออกของยีน โดยวิธี Droplet Digital PCR ใช้เครื่องรุ่น QX200™ Droplet Generator และ QX200™ Droplet Reader ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad Laboratories ตาม**รูปภาพที่ 3** และ**รูปภาพที่ 4**

รูปภาพที่ 3 แสดงเครื่อง QX200™ Droplet Generator (ภาพซ้าย) และ PCR plate sealer (ภาพขวา) ของบริษัท Bio-Rad Laboratories (บันทึกภาพเอง)

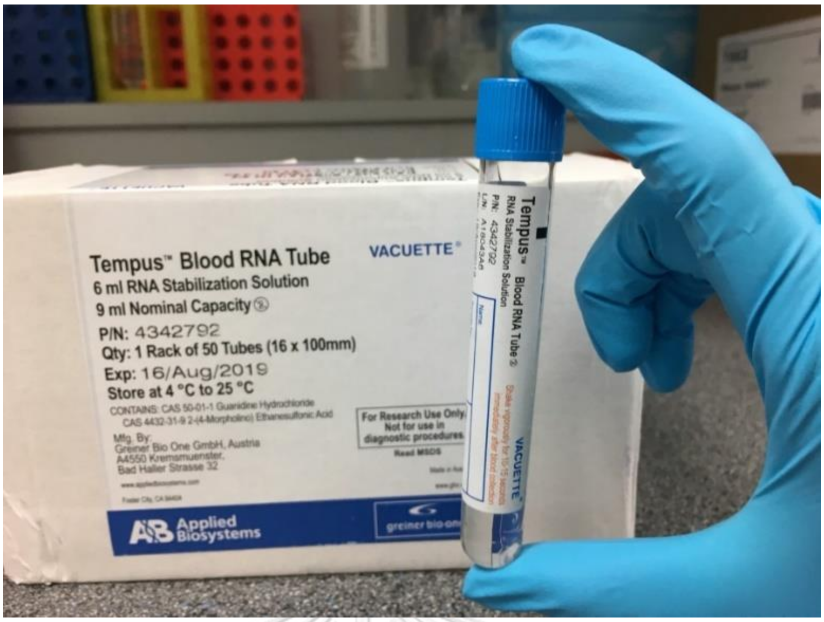
รูปภาพที่ 4 แสดงเครื่อง QX200^{TM} Droplet Reader ของบริษัท Bio-Rad Laboratories (บันทึกภาพเอง)

9.2) ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจระดับการแสดงออกของยีน ทำที่ รพ.จุฬาฯ

(1) ผู้วิจัยหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายในงานวิจัย

จะเป็นคนเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย อย่างละ 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บเฉพาะสำหรับสกัดสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid, RNA) หรือ RNA collection tube อย่างละ 1 หลอด ดังนั้นผู้ป่วย 1 คนจะใช้ 2 หลอด คือใช้เก็บเลือด whole blood 3 มิลลิลิตร 1 หลอด และเก็บน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด 3 มิลลิลิตร 1 หลอด ซึ่งจะเก็บเพียงแค่ครั้งเดียวตอนที่ทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดตามแนวทางการตรวจวินิจฉัยตามเวชปฏิบัติปกติ โดยในหลอด RNA collection tube นี้จะมีสารละลายที่มีคุณสมบัติในการรักษาอาร์เอ็นเอให้คงทนอยู่ได้นาน ซึ่งเม็ดเลือดแดง หรือเม็ดเลือดขาวจะถูกทำให้แตกเมื่อผสมกับสารละลายในหลอด โดยการเขย่าหลอด 10 ครั้ง ตาม**รูปภาพที่ 5** เมื่อเม็ดเลือดแตก สารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ รวมถึงโปรตีนต่าง ๆ ในเซลล์จะถูกปล่อยออกรวมอยู่ในสารละลาย ซึ่งสารละลายดังกล่าวมีคุณสมบัติในการทำให้โปรตีนเสียสภาพ จึงเป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จะย่อยสารพันธุกรรม และช่วยให้อาร์เอ็นเอคงสภาพได้นาน หลังจากนั้นหลอดเก็บเลือดและน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดจะถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นอย่างน้อย จนกว่าจะทำการสกัดอาร์เอ็นเอในขั้นตอนถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปภาพที่ 5 แสดงการจับหลอด Tempus™ Blood RNA tube เขย่าในแนวขึ้นลงหลังใส่สิ่งส่งตรวจลงไปในหลอดแล้วอย่างน้อย 10 ครั้ง (บันทึกภาพเอง)

(2) การเก็บรักษาตัวอย่างและการรักษาอุณหภูมิขณะส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจได้แก่ เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำที่ท้องแขน และน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย จะถูกเก็บใส่ในหลอด RNA collection tubes ที่สามารถรักษาสภาพสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอได้ดี โดยผู้ผลิตรับประกันความคงตัวของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอในเลือดที่เก็บในหลอดดังกล่าวดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

(2.1) เก็บที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 °C ได้นาน 3 วัน

(2.2) เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือในตู้เย็นธรรมดาประมาณ 4 °C ได้นาน 7 วัน

(2.3) เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หรือต่ำกว่านี้ ได้นาน 5 ปี

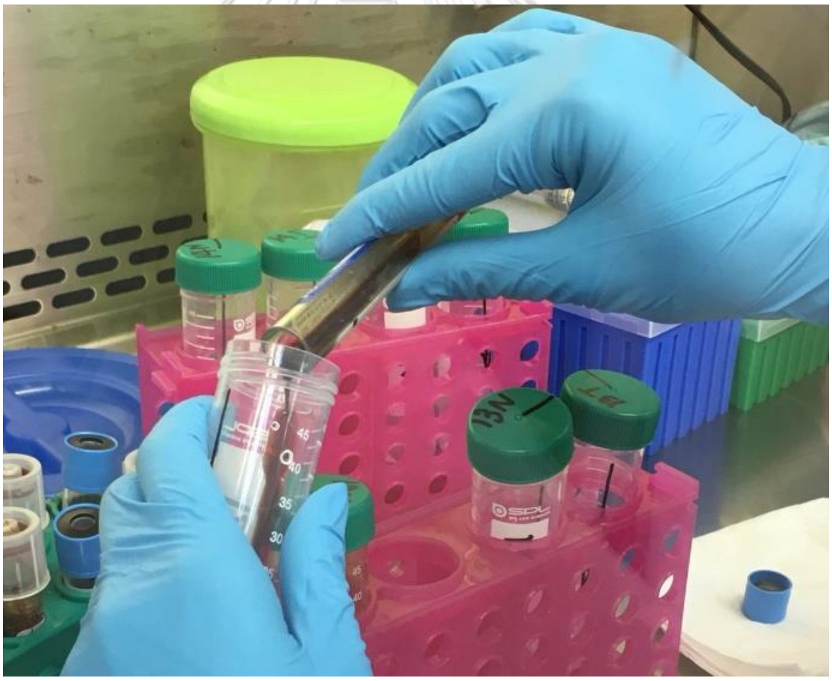
โดยในโครงการวิจัยนี้ จะเก็บรักษาตัวอย่างของผู้ป่วยในหลอด RNA collection tubes ในตู้เย็นที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ -80 °C ของหน่วยโรคระบบการหายใจฯ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จนกว่าจะมีการทำการทดสอบต่อไป โดยจะรวบรวมตัวอย่างทั้งหมด นำใส่กล่องบรรจุน้ำแข็งแห้ง เพื่อรักษาอุณหภูมิไม่ให้ต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส แล้วจ้างพาหนะขนส่งของเอกชน ไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ณ ห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อทำการตรวจต่อไป

9.3) ขั้นตอนการตรวจและแปลผลระดับการแสดงออกของยีน

ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

(1) การเก็บรักษาตัวอย่าง โดยเจ้าหน้าที่ของกรมวิทยาศาสตร์ฯ จะนำหลอด RNA collection tubes ไปเก็บแช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C หรือต่ำกว่านี้ไว้ก่อน เพื่อเตรียมเข้าเครื่องวิเคราะห์ในลำดับถัดไป

(2) กระบวนการสกัด RNA โดยนำสิ่งส่งตรวจที่อยู่ในหลอด RNA collection tubes มาเข้ากระบวนการสกัด RNA ออกจาก whole blood โดยใช้ชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Applied Biosystems ตาม**รูปภาพที่ 6, รูปภาพที่ 7 และแผนภูมิที่ 3** ซึ่งแสดงขั้นตอนของการใช้ชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit จนได้ตัวอย่างที่เตรียมพร้อมเข้าสู่กระบวนการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในลำดับถัดไป



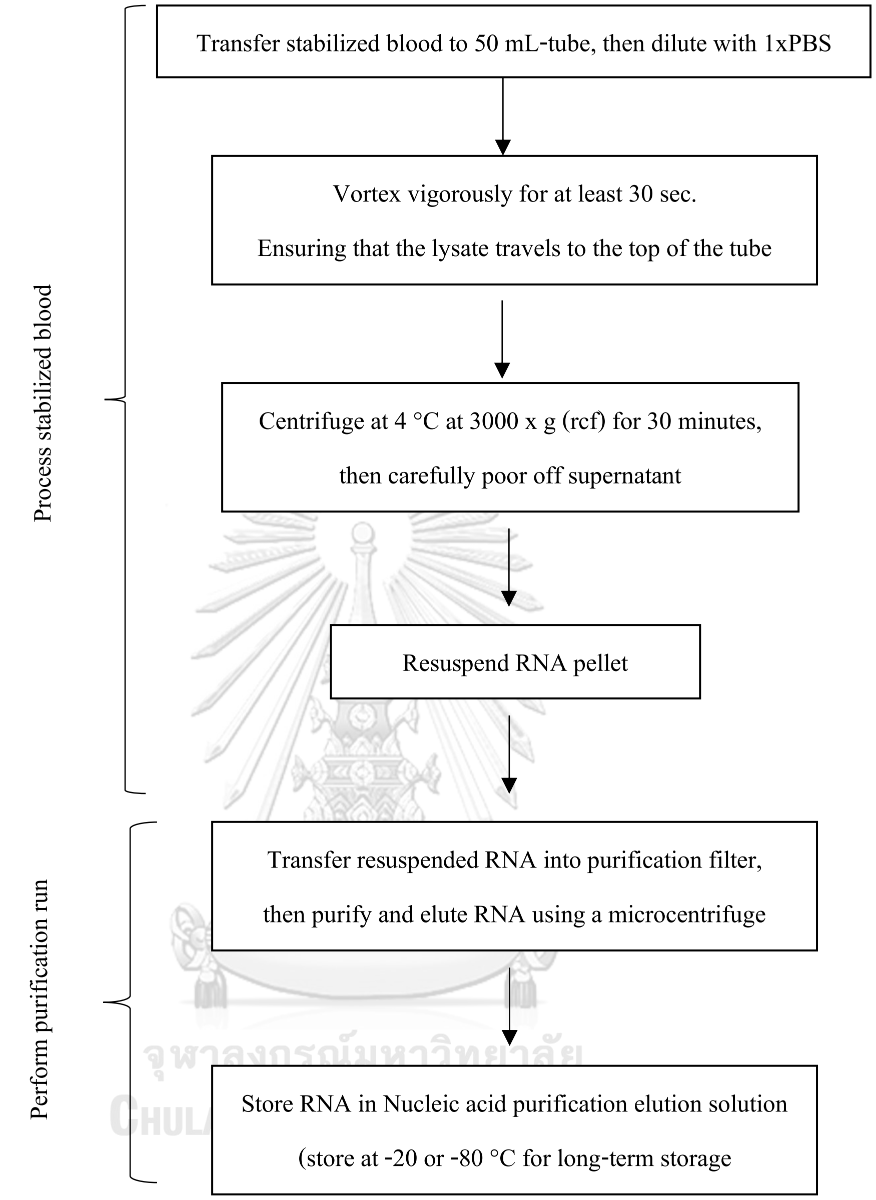
รูปภาพที่ 6 แสดงการเทสิ่งส่งตรวจจากหลอด RNA collection tubes ลงในหลอดขนาด 50 ซีซี เพื่อเตรียมการสกัด RNA (บันทึกภาพเอง)

รูปภาพที่ 7 แสดงการใส่สาร PBS 1 หยดจากชุดตรวจ Tempus^{TM} Spin RNA Isolation Kit ลงในหลอดขนาด 50 ซีซี ที่มีสิ่งส่งตรวจแล้ว เพื่อเตรียมการสกัด RNA (บันทึกภาพเอง)

หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Phosphate-Buffered Saline (without Calcium and Magnesium), PBS; Ribonucleic acid, RNA.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



แผนภูมิที่ 3 แสดงขั้นตอนสรุปกระบวนการสกัด RNA โดยใช้ชุดตรวจ Tempus™ Spin RNA Isolation Kit ตาม Protocol flowchart ของบริษัท Applied Biosystems

หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Phosphate-Buffered Saline (without Calcium and Magnesium), PBS; Ribonucleic acid, RNA.

(3) การตรวจระดับการแสดงออกของยีน โดยใช้เครื่อง QX200™ Droplet Generator เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad Laboratories ในการตรวจระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี **Droplet Digital PCR หรือการสร้างละอองฝอยของสารพันธุกรรม** ซึ่งรายละเอียดขั้นตอน

กระบวนการทำโดยละเอียดนั้นเป็นไปตามคู่มือการใช้งานเครื่อง QX200™ Droplet Generator instruction manual

โดยตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งสิ้น 10 ยีน ได้แก่ *FCGR1B1, FCGR1B2, FCGR1A, MAFB, GBP5, APOL1, KCNJ15, STAT1, KAZN*, *CD53* และตรวจ housekeeping gene หรือ internal control gene อีก 1 ยีนคือ *HPRT1* ซึ่งเป็นการตรวจ absolute quantitative PCR โดยใช้เทคนิคการสร้างละอองฝอยของสารพันธุกรรมนี้ (droplet digital PCR) มีข้อจำกัดคือ สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนเฉพาะยีนที่สนใจเท่านั้น ต้องจำกัดจำนวนยีนที่ต้องการวัดระดับการแสดงออกของยีน ไม่สามารถดูระดับการแสดงออกของยีนทุกยีนในจีโนม หรือ global gene expression ได้ ต่างจากการตรวจ RNA sequencing หรือ microarray แต่มีข้อดีของวิธี droplet digital PCR คือ ต้นทุนในการวิเคราะห์ มีราคาถูกกว่าวิธี RNA-sequencing หรือ microarray

(4) การตรวจระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการสร้างละอองฝอยของสารพันธุกรรมนี้ (droplet digital PCR) ประกอบไปด้วยขั้นตอนย่อยโดยย่อ ได้แก่

(4.1) การเตรียม PCR-ready samples โดยการนำเอา RNA ที่สกัดได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมาผสมกับ primers ของยีนที่เราต้องการตรวจ, fluorescent probes และน้ำยาของบริษัท มาผสมกันเป็น PCR-ready samples แล้วเข้าเครื่อง PCR plate sealer ก่อนนำเข้าเครื่อง QX200™ Droplet Generator

(4.2) การสร้างละอองฝอยขนาดเล็ก (droplet generation) โดยนำเอา PCR-ready samples ที่ได้จาก (1) นั้น มาเข้าเครื่อง QX200™ Droplet Generator เพื่อทำให้ 1 PCR-ready sample เกิดละอองฝอยขนาดเล็กจำนวนมากถึง 20,000 อนุภาค (20,000 nanoliter-sized droplets) โดยในแต่ละอนุภาคนั้นจะมีสารสกัด RNA ของผู้ป่วย, primers ของยีนที่เราต้องการตรวจ และ fluorescent probes

(4.3) การขยายสัญญาณ (PCR amplification) โดยการนำเอา PCR-ready samples ที่มีมากกว่า 20,000 อนุภาคนี้เข้ากระบวนการขยายสัญญาณของสารพันธุกรรม (PCR amplification) ในเครื่อง thermal cycler ยี่ห้อใดก็ได้

(4.4) การอ่านผล โดยการนำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการ PCR amplification แล้ว มาเข้าเครื่อง QX200™ droplet reader เพื่ออ่านการแสดงออกของยีน โดยใช้วิธี two-color detection system จะนับว่าละอองฝอยใดที่มียีนที่เราต้องการตรวจก็จะเรืองสี fluorescence ถือว่าเป็นบวก (PCR-positive droplets) และละอองฝอยใดไม่มียีนที่เราต้องการตรวจก็ถือเป็นลบ (PCR-negative droplets)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

(4.5) การวิเคราะห์และสรุปผล โดยใช้โปรแกรม QuantaSoft™ software ในเครื่อง QX200^{TM} Droplet Reader จะนับจำนวนละอองฝอยที่มียีนเรืองสี fluorescence นี้เป็นหน่วย copies/µl แล้วรายงานเป็นจำนวนเท่าของระดับการแสดงออกของยีนที่ศึกษาเทียบกับ housekeeping gene หรือ internal control gene คือ *HPRT1* เป็นหน่วยที่เรียกว่า normalized expression ซึ่งทางศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะส่งรายงานผลค่าระดับการแสดงออกของยีนแบบ normalized expression นี้กลับมาที่ผู้วิจัย

10) การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือ

ตัวอย่างเสมหะ เลือด และน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด neutrophilic exudative profile หรือผู้ป่วยที่ไม่ทราบการวินิจฉัยแน่ชัดว่าสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีสาเหตุจากอะไรนั้น จะถูกคัดออกไปจากโครงการวิจัยฯ ดังนั้นตัวอย่างเลือดและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่เก็บไว้ก่อนอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยฯ จะถูกทำลายทิ้งตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการของ รพ.จุฬาฯ

ส่วนตัวอย่างเลือดปริมาณ 3 มิลลิลิตร และน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด 3 มิลลิลิตร ของผู้ป่วยที่ทราบผลการวินิจฉัยแล้วว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดหรือโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดแล้ว ก็จะถูกส่งไปตรวจวัดระดับการแสดงของยีนที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และจะถูกเก็บไว้สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเป็นเวลา 5 ปี แล้วค่อยถูกทำลายทิ้งโดยการเผา ตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ซึ่งการใช้ตัวอย่างเพื่อการวิจัยในอนาคต ผู้วิจัยจะยื่นโครงการวิจัยให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยพิจารณาให้การรับรองทุกครั้ง โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่านในการเชื่อมโยงถึงข้อมูลทางคลินิก ซึ่งผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ผู้ตรวจสอบการวิจัย และหน่วยงานควบคุมระเบียบกฎหมายเท่านั้นที่มีสิทธิเข้าถึงข้อมูลของท่าน โดยเก็บตัวอย่างไว้ที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุศาสตร์ทางการแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นระยะเวลาไม่เกิน 5 ปี

3.2 ขนาดตัวอย่าง และ การคำนวณ

เนื่องจากไม่มีข้อมูลการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดใน รพ.จุฬาฯ มาก่อน จึงใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยวัณโรคปอดที่คณะผู้วิจัยจากศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ดำเนินการศึกษา

ระดับการแสดงออกของยีนในเลือดผู้ป่วยวัณโรคปอดที่เสมหะไม่พบเชื้อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็ง โดยข้อมูลดังกล่าวเป็น preliminary data ซึ่งยังไม่ได้ตีพิมพ์ลงในวารสาร และจากกลไกการเกิดโรคของวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่แตกต่างจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด จึงอนุมานได้ว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นโรคมะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอดน่าจะมีระดับการแสดงออกของยีนที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่มควบคุมในการศึกษาดังกล่าว

Preliminary data

ผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดงเข้าได้กับวัณโรคแต่ผลย้อมสีเสมหะไม่พบเชื้อวัณโรคจำนวนทั้งหมด 60 คน ในจำนวนนี้มีผลตรวจยืนยันการวินิจฉัยสุดท้ายพบว่าเป็นวัณโรคปอด 14 คน เป็นโรคมะเร็ง 7 คน และยังไม่ทราบว่าเป็นโรคอะไร 39 คน โดยคณะผู้วิจัยฯได้นำระดับการแสดงออกของยีนทั้งหมดไปเข้าสมการคำนวนทางสถิติออกมาเป็นคะแนนการทำนายโรค พบว่ากลุ่มผู้ป่วยวัณโรคปอดมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 0.4096 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.8092 ส่วนกลุ่มโรคมะเร็งมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 5.5271 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 7.0272 เมื่อคำนวนค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในประชากร โดยอนุมานว่าทั้งสองกลุ่มมาจากแหล่งเดียวกันจะได้ σ = 4.6207

จำนวนตัวอย่างคำนวณโดยกำหนดค่า type I error คือ α error = 0.05, type II error คือ β error = 20% และอำนาจการทดสอบ (Power of test) = 1 - β = 80% และคิดการสูญหายของข้อมูลอีก 20%

เมื่อนำมาคำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้สูตร [33]

$$n_1 = (Z\alpha + Z\beta)^2 \sigma^2 (r+1) / (\mu_1 - \mu_0)^2 \times r$$

โดยที่

n_1 = จำนวน case

n_0 = จำนวน control

r = สัดส่วนของ control ต่อ case ในงานวิจัยนี้ r = 1

$Z\alpha$ = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับ type I error ที่ α = 1.96

$Z\beta$ = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับ type II error ที่ β = 0.84

σ = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในประชากร (assume ว่าทั้งสองกลุ่มมาจากแหล่งเดียวกัน)

μ_1 = ค่าเฉลี่ยของกลุ่ม case

μ_0 = ค่าเฉลี่ยของกลุ่ม control

ดังนั้นจำนวน case และ control เท่ากับ 16 คนต่อกลุ่ม

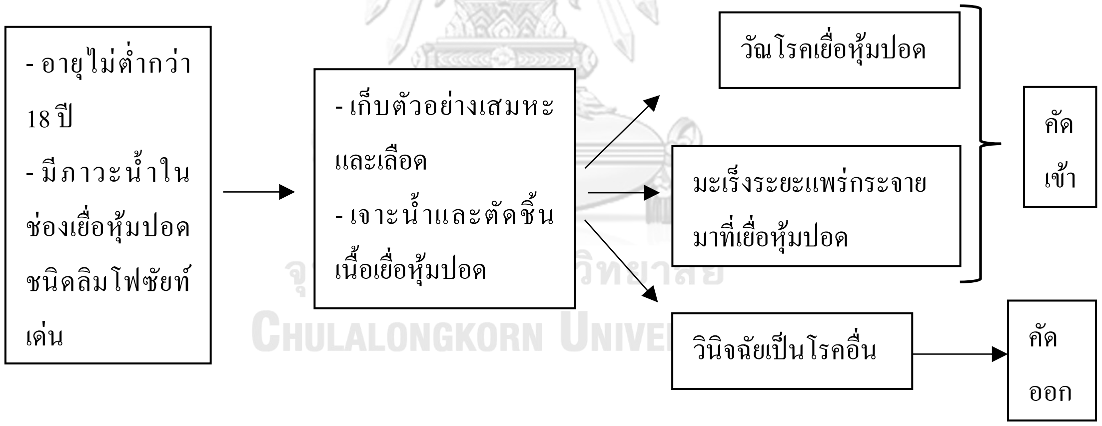
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 ขั้นตอนในการดำเนินการวิจัย

1) แพทย์ผู้วิจัยประสานงานหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เตรียมร่างโครงการวิจัยฯ เพื่อขอทุนสนับสนุนงานวิจัย และขอรับการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

2) แพทย์ผู้วิจัยโฆษณาประชาสัมพันธ์ทั้งโดยการบอกกล่าวด้วยวาจาและติดป้ายประกาศโครงการวิจัยฯ เพื่อขอความร่วมมือแพทย์ใน รพ.จุฬาฯ ซึ่งดูแลผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดที่ยังไม่ทราบการวินิจฉัยโรคใน รพ.จุฬาฯ ได้แนะนำผู้ป่วยให้รู้จักแพทย์ผู้วิจัย และทำนัดคนไข้มาตรวจกับแพทย์ผู้วิจัยเพื่อรับการตรวจวินิจฉัยโรคตามเวชปฏิบัติปกติ

3) กำหนดรูปแบบการวิจัยเป็น nested case-control study คือเริ่มต้นด้วยการทำ cohort study โดยแพทย์ผู้วิจัยติดตามผู้ป่วยที่มีอาการและอาการแสดง ตรวจร่างกายและภาพถ่ายรังสีทรวงอกว่าน่าจะเข้าได้กับภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocytic exudative profile จากนั้นส่งเสมหะและเลือดของผู้ป่วยตรวจทางห้องปฏิบัติการเบื้องต้น ขอความยินยอมผู้ป่วยในการเจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดซึ่งเป็นมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคตามเวชปฏิบัติปกติ



แผนภูมิที่ 4 แสดงขั้นตอนการคัดเลือกอาสาสมัครในงานวิจัย

4) เมื่อได้ผลการตรวจวินิจฉัยแยกโรคที่แน่นอนแล้วค่อยทำ case-control study จากคนที่อยู่ใน cohort study นั้น โดยแพทย์ผู้วิจัยจะดำเนินการคัดเลือกตาม inclusion และ exclusion criteria จากนั้นจำแนกผู้ป่วยออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็น case group และกลุ่มที่เป็นโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเป็น control group ส่วนผู้ป่วยที่มีภาวะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด neutrophilic exudative profile หรือผู้ป่วยที่ไม่ทราบการวินิจฉัยแน่ชัดว่า

สารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมีสาเหตุจากอะไรนั้น แม้ไม่ใช่ประชากรที่ต้องการศึกษาแต่ผู้ป่วยก็ยังคงได้รับการตรวจรักษาตามเวชปฏิบัติปกติ

5) แพทย์ผู้วิจัยขอความยินยอมอาสาสมัครทั้ง case group และ control group เข้าร่วมโครงการวิจัยฯ แบบไปข้างหน้า (prospective study) จนกว่าจะได้อาสาสมัครใน case และ control group ครบกลุ่มละ 16 คน เพื่อขออนุญาติในการส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนทั้งในเลือดและในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด และเก็บข้อมูลทางคลินิกบันทึกลงแบบบันทึกข้อมูลของโครงการวิจัยฯ โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวตนผู้ป่วยได้

6) สิ่งส่งตรวจที่เก็บจากผู้ป่วยมีทั้ง sputum, pleural fluid, pleural biopsy และ blood โดยแต่ละสิ่งส่งตรวจ ถูกส่งไปตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้ โดยการส่งตรวจ (1) – (3) เป็นการส่งตรวจวินิจฉัยตามแนวทางเวชปฏิบัติปกติ ส่วนการส่งตรวจ (4) เป็นไปตามแนวทางของโครงการวิจัยฯ

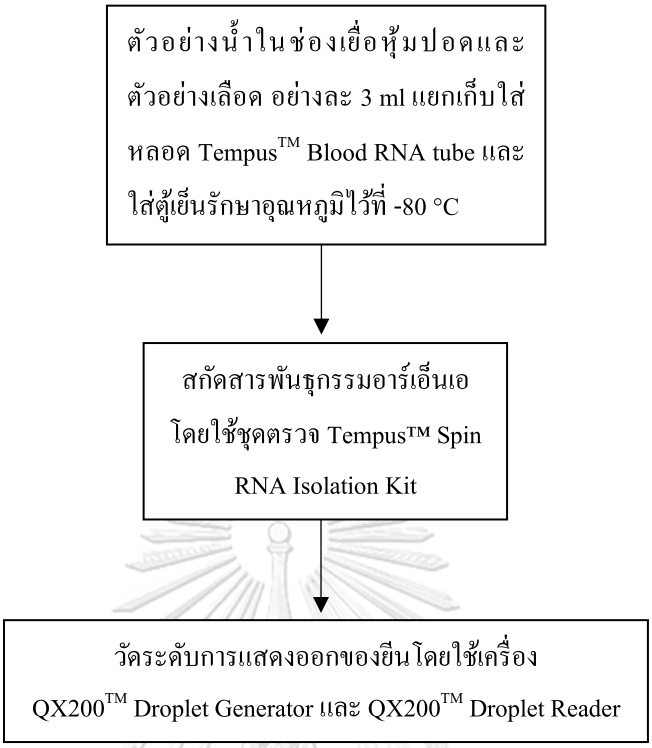
(1) Sputum (SP) ส่งตรวจ AFB, PCR-TB, TB culture

(2) Pleural fluid (PF) ส่งตรวจ cell count, cell differentiation, total protein (TP), lactate dehydrogenase (LDH), ADA, AFB, PCR-TB, TB culture

(3) Pleural biopsy (PB) ส่งตรวจ histopathology

(4) Blood (BL) และ pleural fluid (PF) ส่งตรวจ gene expression level โดยจะมีการเก็บน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดจากอาสาสมัครเพิ่มจากการส่งตรวจทางเวชปฏิบัติปกติ อย่างละ 3 ml แยกเก็บใส่หลอด RNA collection tubes และใส่ตู้เย็นรักษาอุณหภูมิไว้ที่ -80 °C เฉพาะเลือดและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของอาสาสมัครที่เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเท่านั้นที่จะถูกส่งไปตรวจ TB-specific genes 10 สำเนาต่อไป ได้แก่ *GBP5, STAT1, FCGR1B1, FCGR1B2, FCGR1A, MAFB, APOL1, KCNJ15, KAZN* และ *CD53*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



แผนภูมิที่ 5 แสดงกระบวนการส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน

7) เก็บรวบรวมข้อมูลทางคลินิกและผลการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน ตามแบบบันทึกข้อมูล เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานการวิจัย และเผยแพร่ผลงานการวิจัยในวารสารทางการแพทย์ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1) เก็บข้อมูลจากทั้งผู้ป่วยที่นอนพักรักษาตัวใน รพ.จุฬาฯ และผู้ป่วยที่มาตรวจที่คลินิกของ รพ.จุฬาฯ

2) ข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลทางคลินิกนั้นได้จากอาสาสมัครโดยตรง ทั้งจากการสอบถามประวัติ อาการและอาการแสดง การตรวจร่างกาย ภาพถ่ายรังสี ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และจากบันทึกในเวชระเบียน

3) อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยฯ ทุกคนจะได้รับข้อมูลโครงการวิจัยฯ และลงชื่อยินยอมก่อนเข้าร่วมโครงการวิจัยฯ

4) ข้อมูลที่เกี่ยวข้องในโครงการวิจัยฯ จะถูกบันทึกลงในแบบบันทึกข้อมูลของโครงการวิจัยฯ โดยจะไม่มีข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวตนผู้ป่วยได้ ซึ่งผู้เก็บข้อมูลและผู้บันทึกข้อมูล คือ แพทย์ผู้วิจัยหรือผู้ที่ได้รับมอบหมายให้ทำหน้าที่แทน

โดยผู้วิจัยจะดำเนินการเก็บข้อมูลหลังได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมวิจัยในคน

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (data analysis and statistics)

1) ข้อมูลพื้นฐาน

(1) ข้อมูลเชิงคุณภาพแสดงเป็นความถี่และร้อยละ

(2) ข้อมูลเชิงปริมาณแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2) เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม

(1) ข้อมูลเชิงปริมาณที่เป็นเชิงกลุ่ม นำมาวิเคราะห์โดย Fisher’s exact test นำเสนอข้อมูลในรูปแบบของ proportion (%) และหาขนาดความสัมพันธ์โดยใช้ค่า odds ratio

(2) ข้อมูลเชิงปริมาณที่เป็นค่าต่อเนื่อง นำมาวิเคราะห์โดย independent t test แต่ถ้าข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติใช้การทดสอบ Mann-Whitney U test และใช้ค่ากลาง median ± IQR เป็นตัวแทนของข้อมูล

(3) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรข้อมูลโดยวิธี Regression analysis

3) คำนวณค่าดัชนีการวินิจฉัยโรค

โดยเปรียบเทียบวิธีการตรวจระดับการแสดงออกของยีนในเลือดหรือในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดระหว่างผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด

วิเคราะห์ค่า sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) และ area under receiver operating curve (ROC)

การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 22.0

4) การนำเสนอข้อมูล

นำเสนอในรูปแบบตารางและกราฟตามความเหมาะสม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หมายเหตุ: งานวิจัยชิ้นนี้

- ได้รับการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ **IRB No. 209/61**
- ได้ขึ้นทะเบียนกับ Thai Clinical Trials Registry (TCTR) เลขที่ **TCTR20190204003**
- ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ **RA61/107**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ประชากรที่นำมาศึกษา สถิติที่ใช้ และข้อมูลพื้นฐาน (baseline characteristics)

ผู้ป่วยสัญชาติไทย อายุไม่ต่ำกว่า 18 ปี ที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น (lymphocytic exudative pleural effusion) ที่ได้รับการตรวจที่ รพ.จุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ในระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 จนถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2562 ได้รับคำแนะนำและชวนเข้าร่วมการศึกษา การตรวจวินิจฉัย รวมไปถึงการเจาะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด และให้การรักษา ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานในการดูแลรักษาผู้ป่วยตามปกติ โดยอาสาสมัครในโครงการวิจัยฯทุกราย ได้แสดงความยินยอมให้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดอย่างละ 3 มิลลิลิตร เพื่อส่งตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรค มีจำนวนทั้งหมด 34 คน แบ่งเป็นกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดซึ่งเป็นกลุ่มที่ต้องการศึกษาจำนวน 16 คน และกลุ่มโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 18 คน

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจริง ไม่ได้มีการกระจายแบบปกติ ผู้วิจัยจึงขอนำเสนอค่ากลางของข้อมูลเชิงปริมาณที่เป็นค่าต่อเนื่องในรูปแบบของค่ามัธยฐาน (median) $\pm$ ช่วงระหว่างควอไทล์ (interquartile range, IQR) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test ส่วนข้อมูลเชิงปริมาณที่เป็นเชิงกลุ่มนำเสนอในรูปแบบของจำนวน สัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ตามปกติ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Fisher's exact test ส่วนค่าดัชนีในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแยกจากโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด คำนวณเป็นพื้นที่ใต้กราฟ receiver operating curve (AUC), ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ค่าพยากรณ์เชิงบวก (positive predictive value, PPV) และค่าพยากรณ์เชิงลบ (negative predictive value, NPV) โดยทั้งหมดคำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 ลิขสิทธิ์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (กลุ่มวัณโรค) เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด (กลุ่มมะเร็ง) ตามที่แสดงใน**ตารางที่ 1** จะเห็นได้ว่า ค่ามัธยฐานอายุของกลุ่มวัณโรค 55.50 $\pm$ 43 ปี ต่ำกว่ากลุ่มมะเร็ง 60 $\pm$ 14 ปี, ค่ามัธยฐานดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) กลุ่มวัณโรค 20.55 $\pm$ 3.28 kg/m^2 ใกล้เคียงกันกับกลุ่มมะเร็ง 20.18 $\pm$ 5.36 kg/m^2, กลุ่มวัณโรคส่วนใหญ่เป็นเพศชายร้อยละ 68.8 ส่วนกลุ่มมะเร็งเป็นเพศชายและเพศหญิงเท่ากัน โดยทั้งอายุ ดัชนีมวลกาย และเพศไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย	กลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (MPE) (N = 18)	กลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (TB pleura) (N = 16)	P-value*
อายุ (ปี)	60 ± 14	55.50 ± 43	0.528
ดัชนีมวลกาย (BMI) (kg/m^2)	20.18 ± 5.36	20.55 ± 3.28	0.721
เพศ (gender)			0.315
- ชาย	9 (50)	11 (68.8)	
- หญิง	9 (50)	5 (31.3)	
ประวัติสัมผัสผู้ป่วยวัณโรค (contact TB)	0 (0)	4 (25)	0.039*
ประวัติการเป็นวัณโรคในอดีต (previous TB)	1 (5.6)	0 (0)	1.000
ประวัติการเป็นโรคมะเร็งในอดีต (previous CA)	9 (50)	2 (12.5)	0.030*
ประวัติการสูบบุหรี่ (smoking)	9 (50)	6 (37.5)	0.510
ประวัติการดื่มเหล้า (alcohol)	8 (44.4)	6 (37.5)	0.738
ประวัติการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drug)	2 (11.1)	5 (31.3)	0.214
โรคติดเชื้อเอชไอวี (HIV)	0 (0)	1 (6.3)	0.471
โรคเบาหวาน (DM)	0 (0)	3 (18.8)	0.094
โรคไตวายเรื้อรัง (CKD)	0 (0)	3 (18.8)	0.094
โรคปอดเรื้อรัง (chronic lung diseases)	1 (5.6)	0 (0)	1.000
โรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune disease)	0 (0)	3 (18.8)	0.094

หมายเหตุ:

- ข้อมูลเชิงกลุ่มจะแสดงเป็นจำนวน (ร้อยละ, %) ส่วนข้อมูลเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่ามัธยฐาน ± ช่วงระหว่างควอไทล์ (median ± IQR)

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Tuberculosis, TB; Cancer, CA; Malignant pleural effusion, MPE; Body mass index, BMI; Human immunodeficiency syndrome, HIV; Diabetes mellitus, DM; Chronic kidney disease, CKD.

*ข้อมูลที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติสัมผัสผู้ป่วยวัณโรค (contact TB) พบเป็นสัดส่วนร้อยละ 25 ในกลุ่มวัณโรค แตกต่างจากกลุ่มมะเร็งที่ไม่มีประวัติเลยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.039$), ส่วนประวัติการเป็นวัณโรคในอดีต (previous TB) พบเป็นสัดส่วนร้อยละ 5.6 ในกลุ่มมะเร็งซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มวัณโรคที่ไม่มีประวัติเลย ในขณะที่ประวัติการเป็นมะเร็งในอดีต (previous CA) พบเป็นสัดส่วนร้อยละ 50 สูงกว่ากลุ่มโรควัณโรคที่มีสัดส่วนร้อยละ 12.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.030$), ส่วนประวัติการสูบบุหรี่ (smoking) และดื่มแอลกอฮอล์ (alcohol) พบในกลุ่มมะเร็งร้อยละ 50 และ 44.4 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มวัณโรคที่มีสัดส่วนร้อยละ 37.5 ทั้งการสูบบุหรี่และดื่มแอลกอฮอล์ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ประวัติการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drug) ในกลุ่มวัณโรคกลับพบเป็นสัดส่วนร้อยละ 31.3 สูงกว่ากลุ่มมะเร็งที่มีสัดส่วนร้อยละ 11.1 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับประวัติโรคร่วม (co-morbid diseases) ได้แก่ โรคติดเชื้อเอชไอวี (human immunodeficiency virus, HIV) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus, DM) โรคไตวายเรื้อรัง (chronic kidney disease, CKD) และโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง (autoimmune disease) ในกลุ่มวัณโรค พบเป็นสัดส่วนร้อยละ 6.3, 18.8, 18.8 และ 18.8 ตามลำดับโดยไม่พบโรคปอดเรื้อรัง (chronic lung disease) ชนิดใดเลย ในขณะที่กลุ่มโรคมะเร็งพบเพียงโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) เพียง 1 คน คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 5.6 โดยไม่มีโรคร่วมอื่นเลย ซึ่งประวัติโรคร่วมทั้งสองกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผู้ป่วยกลุ่มโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดทั้งหมด 18 คน ได้รับการวินิจฉัยยืนยันชนิดของมะเร็งจากผลตรวจพยาธิวิทยา (cytology or histopathology) ร่วมกับวิธีอิมมูโนวิทยาเคมี (immunohistochemistry, IHC) ที่ได้จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดหรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด พบว่าเป็นมะเร็งเต้านม (breast cancer) 8 คน, มะเร็งปอด (lung cancer) 6 คน มะเร็งรังไข่ (ovarian cancer) 1 คน มะเร็งไต (renal cell carcinoma, RCC) 1 คน มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) 1 คน และโรคมะเร็งเม็ดโลหิตขาวชนิดมัยอีโลมา (multiple myeloma, MM) 1 คน, ส่วนผู้ป่วยกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทั้งหมด 16 คน ได้รับการวินิจฉัยแบ่งเป็นสามระดับ โดยส่วนใหญ่ร้อยละ 56.25 เข้าเกณฑ์วินิจฉัยระดับน่าจะเป็นโรค (probable diagnosis) รองลงมาร้อยละ 31.25 เข้าเกณฑ์วินิจฉัยระดับเป็นโรคแน่นอน (definite diagnosis) และสุดท้ายร้อยละ 12.5 เข้าเกณฑ์วินิจฉัยระดับอาจจะเป็นโรค (possible diagnosis) ตามที่แสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลระดับการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

ระดับการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด	**จำนวน (N = 16)**	**ร้อยละ (%)**
ระดับเป็นโรคแน่นอน (definite diagnosis)	5	31.25
ระดับน่าจะเป็นโรค (probable diagnosis)	9	56.25
ระดับอาจจะเป็นโรค (possible diagnosis)	2	12.5

การส่งตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทางห้องปฏิบัติการตามแนวทางเวชปฏิบัติปกติในโครงการวิจัยฯนี้ ได้แก่การส่งตัวอย่างเสมหะ (sputum, SP), น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid, PF) หรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด (pleural tissue biopsy, PB) ไปตรวจย้อมสีทนกรด (acid-fast bacilli, AFB), ตรวจอณูชีววิทยาวัดสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค (TB polymerase chain reaction, PCR-TB) หรือเพาะเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture) โดยชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดถูกส่งตรวจทางพยาธิวิทยาดูลักษณะที่บ่งบอกการติดเชื้อวัณโรครูปแบบ granulomatous inflammation ตาม**ตารางที่ 3** แสดงวิธีการตรวจเชื้อวัณโรคในคอลัมน์แรก จำนวนตัวอย่างในแต่ละวิธีที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคในคอลัมน์ที่สอง และสัดส่วนเป็นร้อยละของตัวอย่างที่พบเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 3 แสดงผลการส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

วิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด	**จำนวนตัวอย่าง**	**ร้อยละของผู้ป่วยวัณโรคจำนวน 16 คน (%)**
เสมหะส่งย้อมสีทนกรดพบเชื้อติดสีทนกรด	0	0
เสมหะส่งตรวจอณูชีววิทยาพบสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค	1	6.25
เสมหะส่งเพาะเชื้อวัณโรค พบเชื้อวัณโรค	2	12.5
น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดส่งย้อมสีทนกรดพบเชื้อติดสีทนกรด	0	0
น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดส่งตรวจอณูชีววิทยาพบสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค	2	12.5
น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดส่งเพาะเชื้อวัณโรค พบเชื้อวัณโรค	0	0
ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดส่งย้อมสีทนกรดพบเชื้อติดสีทนกรด	0	0
ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดส่งตรวจอณูชีววิทยาพบสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค	0	0
ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดส่งเพาะเชื้อวัณโรค พบเชื้อวัณโรค	1	6.25
ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดส่งตรวจทางพยาธิวิทยาพบ granulomatous inflammation	13	81.25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จาก**ตารางที่ 3** แสดงให้เห็นว่า ในจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทั้งหมด 16 คน ส่วนใหญ่ได้ผลจากการตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดที่พบลักษณะ granulomatous inflammation จำนวน 13 ตัวอย่าง คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 81.25 รองลงมาคือน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดพบสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค และเสมหะเพาะเชื้อขึ้นวัณโรคคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 12.5 เท่ากัน พบน้อยที่สุดคือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดเพาะเชื้อขึ้นวัณโรค และเสมหะพบสารพันธุกรรมเชื้อวัณโรคคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 6.25 เท่ากัน ในขณะที่ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรคเลยจากการตรวจย้อมสีทนกรดทั้งจากเสมหะ น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบสารพันธุกรรมวัณโรคจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด และไม่พบเชื้อวัณโรคจากการเพาะเชื้อน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดอีกด้วย

ลักษณะพื้นฐานของน้ำในช่องเยื่อหุ้มเยื่อหุ้มปอดเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัณโรคและกลุ่มมะเร็ง ตาม**ตารางที่ 4** จะเห็นได้ว่า กลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานของ adenosine deaminase (ADA) ของน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเท่ากับ 38.50 ± 39 U/L และมีสัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (% lymphocyte/total white cell) 95.05 ± 16.72% ซึ่งสูงกว่ากลุ่มมะเร็งที่มีค่ามัธยฐาน ADA 13 ± 10 U/L ($p < 0.001$) และมี % lymphocyte/total white cell 84.75 ± 18.37% ($p = 0.046$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย

รายการตรวจวิเคราะห์น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดทางห้องปฏิบัติการ	**มะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (MPE) (N = 18)**	**วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (TB pleura) (N = 16)**	**P-value***
ระดับเอนไซม์ Adenosine deaminase (U/L)	13 ± 10	38.50 ± 39	0.001*
ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (cells/mm^3)	569 ± 1942	2036 ± 2311	0.126
ร้อยละของเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์ต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (%Lymphocyte/WBC)	84.75 ± 18.37	95.05 ± 16.72	0.046*
ระดับ lactate dehydrogenase (IU/L)	351.50 ± 282	388.50 ± 330	0.932
สัดส่วน LDH ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดต่อในเลือด	1.49 ± 0.66	1.87 ± 1.96	0.403
ระดับโปรตีน (g/dL)	4.53 ± 1.40	5.06 ± 1.32	0.055
สัดส่วนโปรตีนในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดต่อในเลือด	0.63 ± 0.12	0.71 ± 0.12	0.175
ระดับกลูโคส (mg/dL)	107.50 ± 11	107 ± 41	0.266

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หมายเหตุ:

- ข้อมูลเชิงกลุ่มจะแสดงเป็นจำนวน (ร้อยละ, %) ส่วนข้อมูลเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่ามัธยฐาน ± ช่วงระหว่างควอไทล์ (median ± IQR)
- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ LDH, lactate dehydrogenase; ADA, adenosine deaminase.

*ข้อมูลที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ กลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานของ pleural total white cell count 2036 ± 2311 cell/mm^3, pleural lactate dehydrogenase (LDH) 388.50 ± 330 IU/L, pleural to serum LDH ratio 1.87 ± 1.96, pleural total protein (TP) 5.06 ± 1.32 และ pleural to serum TB ratio 0.71 ± 0.12 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มมะเร็งที่มีค่ามัธยฐานของ pleural total white cell count 569 ± 1942 cell/mm^3, pleural lactate dehydrogenase (LDH) 351.50 ± 282 IU/L, pleural to serum LDH ratio 1.49 ± 0.66, pleural total protein (TP) 4.53 ± 1.40 และ pleural to serum TB ratio 0.63 ± 0.12, ส่วนค่ามัธยฐานของ pleural glucose ในกลุ่มวัณโรค 107 ± 41 mg/dL มีค่าใกล้เคียงกันกับกลุ่มมะเร็ง 107.50 ± 11 mg/dL โดยลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดทั้งหมดเปรียบเทียบระหว่างสองกลุ่มแล้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น pleural fluid ADA และ %lymphocyte/total white cell

4.2 ผลการศึกษาตามวัตถุประสงค์ (study outcomes)

เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยมีการกระจายตัวไม่ปกติ จึงนำเสนอเป็นค่ามัธยฐาน (median ± IQR) ของระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคทั้งหมด 10 ยีน เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และกลุ่มโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด โดยใช้สถิติ Mann Whitney U-test ระดับการแสดงออกของยีนมีหน่วยเป็น normalized expression หรือจำนวนเท่าของปริมาณสารพันธุกรรม ribonucleic acid (RNA) ของยีนที่สนใจศึกษา หารด้วยปริมาณสารพันธุกรรม RNA ของยีนควบคุม คือ *HPRT1* ซึ่งตรวจด้วยเทคนิค absolute quantitative real-time PCR โดยใช้เครื่อง QX200™ droplet generator และ QX200™ droplet reader แล้วรายงานผลเป็นค่า normalized expression ตาม**ตารางที่ 5**

สิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid, PF) ของกลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* เท่ากับ 7.90 ± 7.18 และ *STAT1* เท่ากับ 10.77 ± 8.27 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มมะเร็งที่มีค่ามัธยฐานของยีน *GBP5* เท่ากับ 0.49 ± 1.34 และ *STAT1* เท่ากับ 2.66 ± 2.09 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$), ในขณะที่ยีน *KAZN* ของกลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 0.002 ± 0.008 ซึ่งต่ำกว่าค่ามัธยฐาน 0.056 ± 0.101ของกลุ่มมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$),

ส่วนยีนอีก 7 ยีนได้แก่ *FCGR1A, FCGR1B1, FCGR1B2, MAFB, APOL1, KCNJ15* และ *CD53* มีค่ามัธยฐานระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มวัณโรคอยู่ที่ 4.48 ± 3.99, 5.74 ± 5.64, 0.22 ± 0.20, 3.44 ± 4.06, 0.34 ± 0.42, 0.12 ± 0.11 และ 10.77 ± 2.43 ตามลำดับ และในกลุ่มมะเร็งอยู่ที่ 3.21 ± 4.27, 3.11 ± 3.92, 0.17 ± 0.18, 3.97 ± 5.41, 0.20 ± 0.24, 0.07 ± 0.25 และ 9.94 ± 4.79 ตามลำดับ โดยที่ค่ามัธยฐานระดับการแสดงออกของ 7 ยีนนี้ในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามที่แสดงใน**ตารางที่ 5** และ**แผนภูมิที่ 6** แสดง boxplots ของค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีนแต่ละยีน ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid samples: PF) (แผนภูมิย่อยที่ a-j) จำแนกตามกลุ่มวัณโรค (TB pleura) และกลุ่มมะเร็ง (MPE)

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดของผู้ป่วย

ชื่อยีนที่ตรวจ (หน่วยเป็น normalized expression)	**กลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (MPE) (N = 18)**	**กลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (TB pleura) (N = 16)**	**P-value***
PF_*FCGR1A*	3.21 ± 4.27	4.48 ± 3.99	0.297
PF_*FCGR1B1*	3.11 ± 3.92	5.74 ± 5.64	0.088
PF_*FCGR1B2*	0.17 ± 0.18	0.22 ± 0.20	0.164
PF_*MAFB*	3.97 ± 5.41	3.44 ± 4.06	0.695
PF_*GBP5*	0.49 ± 1.34	7.90 ± 7.18	<0.001*
PF_*APOL1*	0.20 ± 0.24	0.34 ± 0.42	0.297
PF_*KCNJ15*	0.07 + 0.25	0.12 ± 0.11	0.281
PF_*STAT1*	2.66 ± 2.09	10.77 ± 8.27	<0.001*
PF_*KAZN*	0.056 ± 0.101	0.002 ± 0.008	<0.001*
PF_*CD53*	9.94 ± 4.79	10.77 ± 2.43	0.075
BL_*FCGR1A*	3.15 ± 4.68	7.95 ± 5.08	<0.001*
BL_*FCGR1B1*	4.26 ± 6.23	8.85 ± 5.84	0.001*
BL_*FCGR1B2*	0.32 ± 0.37	0.51 ± 0.39	0.003*
BL_*MAFB*	1.88 ± 1.71	2.20 ± 0.97	0.384
BL_*GBP5*	3.85 ± 2.24	19.56 ± 14.27	<0.001*
BL_*APOL1*	0.18 ± 0.08	0.32 ± 0.15	0.003*
BL_*KCNJ15*	4.69 ± 6.83	4.61 ± 4.35	0.851
BL_*STAT1*	6.50 ± 5.29	12.87 ± 4.03	<0.001*
BL_*KAZN*	0.095 ± 0.142	0.040 ± 0.074	0.126
BL_*CD53*	24.76 ± 17.62	26.66 ± 12.78	0.959

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

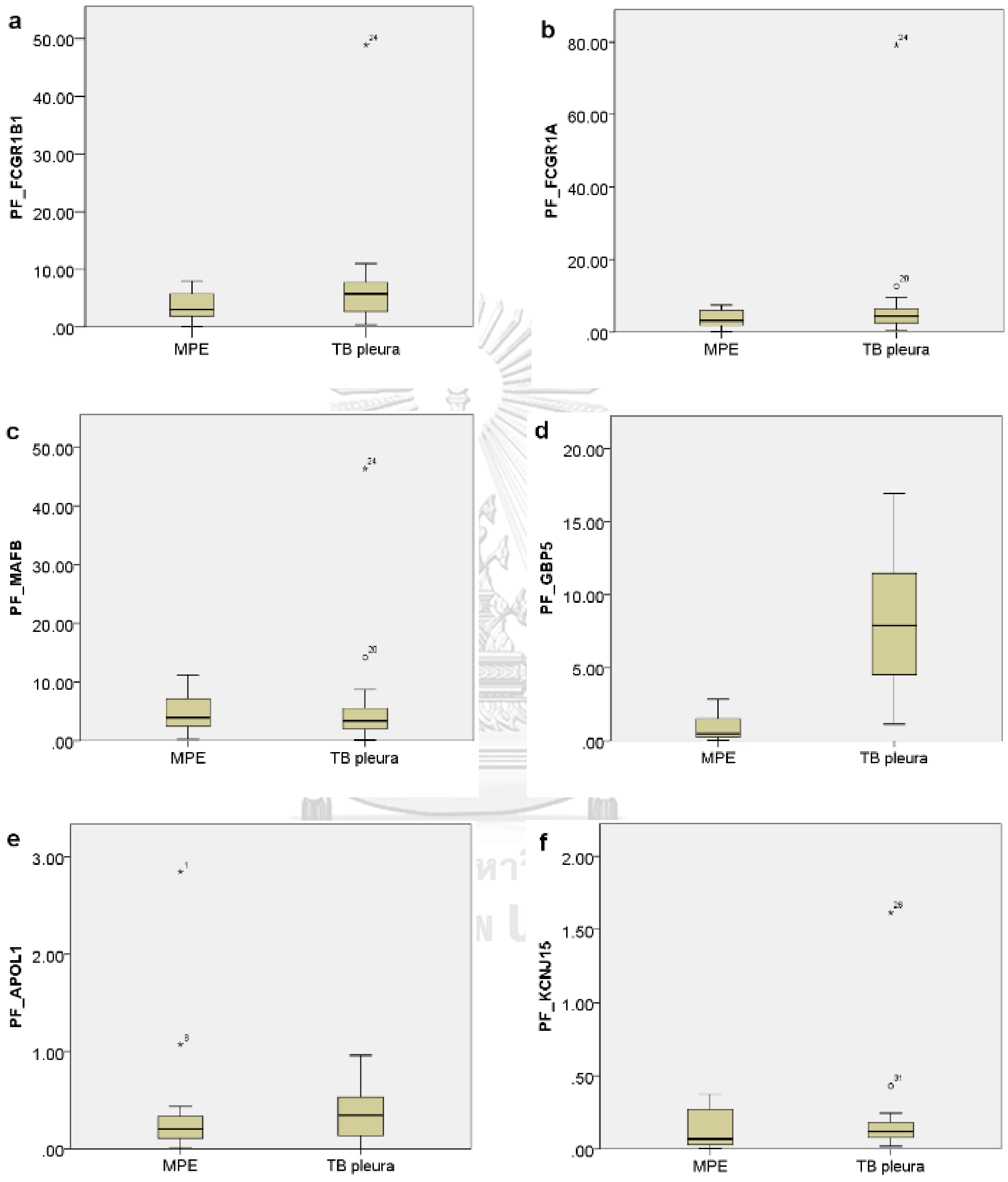
หมายเหตุ:

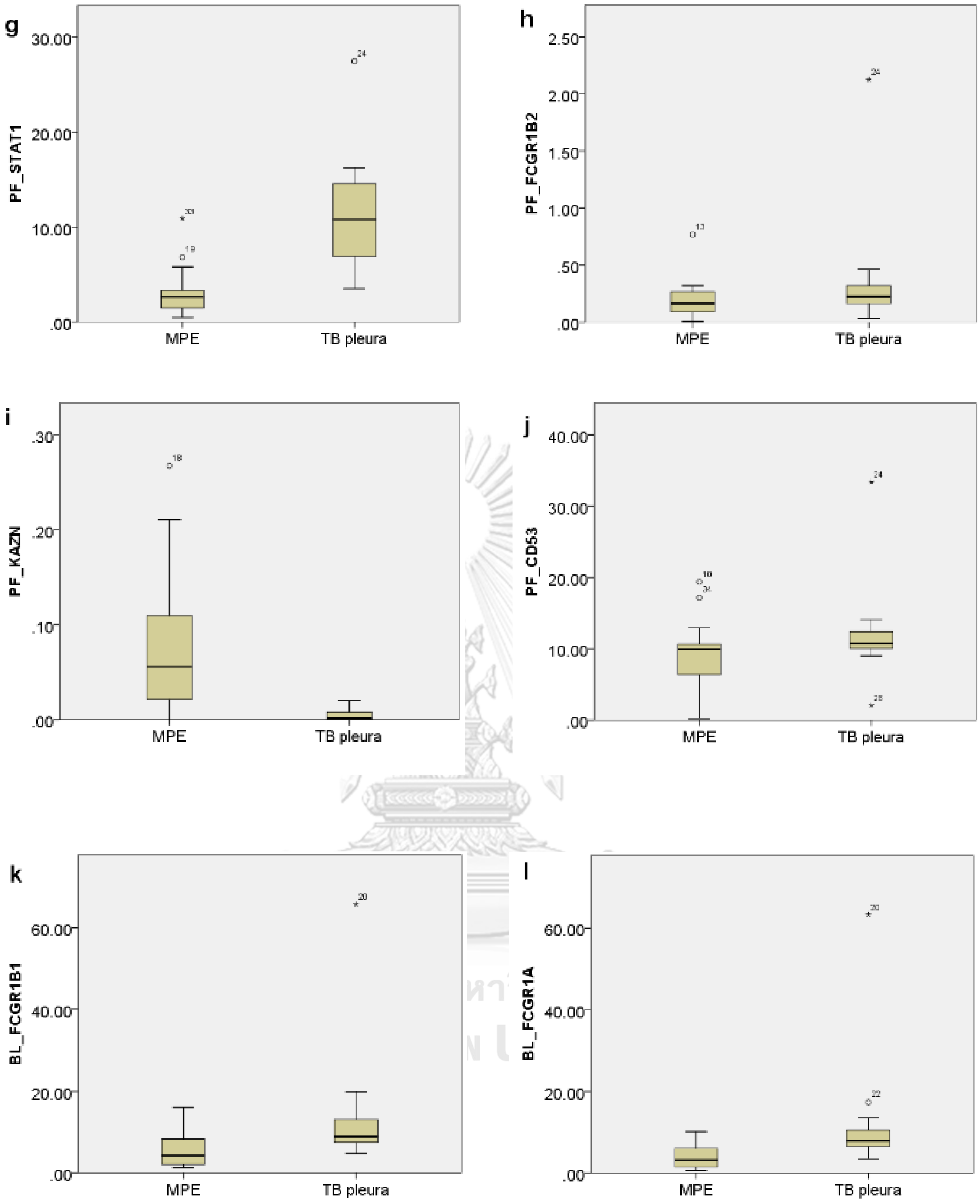
- ข้อมูลเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่ามัธยฐาน ± ช่วงระหว่างควอไทล์ (median ± IQR)
- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL.

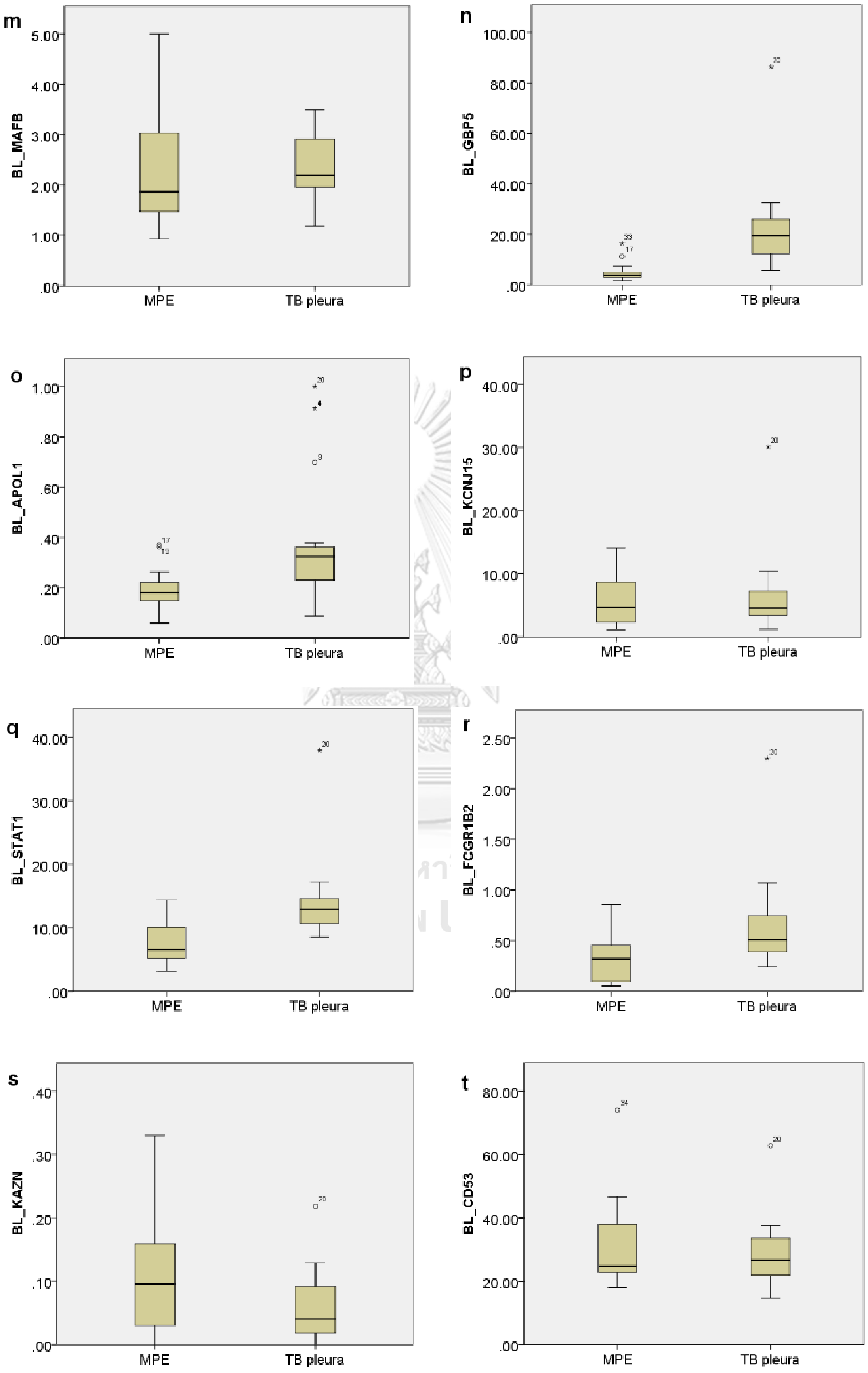
*ข้อมูลที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอย่างเลือด (blood, BL) ของกลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* เท่ากับ 19.56 ± 14.27 และ *STAT1* เท่ากับ 12.87 ± 4.03 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มมะเร็งที่มีค่ามัธยฐานของยีน *GBP5* เท่ากับ 3.85 ± 2.24 และ *STAT1* เท่ากับ 6.50 ± 5.29 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) สอดคล้องไปกับผลตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ในขณะที่ยีน *KAZN* ของกลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานเท่ากับ 0.040 ± 0.074 ต่ำกว่าค่ามัธยฐาน 0.095 ± 0.142 ของกลุ่มมะเร็ง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแตกต่างจากผลตรวจยีน *KAZN* ของน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด นอกจากนี้ตัวอย่างเลือดเพียงอย่างเดียวยังพบเพิ่มอีก 4 ยีน ได้แก่ *FCGR1A, FCGR1B1, FCGR1B2* และ *APOL1* ที่มีค่ามัธยฐานระดับการแสดงออกเท่ากับ 7.95 ± 5.08, 8.85 ± 5.84, 0.51 ± 0.39 และ 0.32 ± 0.15 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่ามัธยฐานของกลุ่มมะเร็งเท่ากับ 3.15 ± 4.68 ($p < 0.001$), 4.26 ± 6.23 ($p = 0.001$), 0.32 ± 0.37 ($p = 0.003$) และ 0.18 ± 0.08 ($p = 0.003$) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ส่วนอีก 3 ยีนที่เหลือได้แก่ *MAFB, KCNJ15* และ *CD53* ในกลุ่มวัณโรคมีค่ามัธยฐานการแสดงออกของยีนอยู่ที่ 2.20 ± 0.97, 4.61 ± 4.35 และ 26.66 ± 12.78 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มมะเร็งอยู่ที่ 1.88 ± 1.71, 4.69 ± 6.83 และ 24.76 ± 17.62 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามที่แสดงใน**ตารางที่ 5** และ**แผนภูมิที่ 6** แสดง boxplots ของค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีนแต่ละยีน ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด (blood samples: BL) (แผนภูมิย่อยที่ k-t) จำแนกตามกลุ่มวัณโรค (TB pleura) และกลุ่มมะเร็ง (MPE)

แผนภูมิที่ 6 Boxplots แสดงค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (PF) (แผนภูมิย่อยที่ a-j) และในเลือด (BL) (แผนภูมิย่อยที่ k-t)




g
PF_STAT1
30.00
20.00
10.00
.00
MPE
TB pleura
h
PF_FCGR1B2
2.50
2.00
1.50
1.00
.50
.00
MPE
TB pleura
i
PF_KAZN
.30
.20
.10
.00
MPE
TB pleura
j
PF_CD53
40.00
30.00
20.00
10.00
.00
MPE
TB pleura
k
BL_FCGR1B1
60.00
40.00
20.00
.00
MPE
TB pleura
l
BL_FCGR1A
60.00
40.00
20.00
.00
MPE
TB pleura


m
BL_MAFB
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
.00
MPE
TB pleura
n
BL_GBP5
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
.00
MPE
TB pleura
o
BL_APOL1
1.00
.80
.60
.40
.20
.00
MPE
TB pleura
p
BL_KCNJ15
40.00
30.00
20.00
10.00
.00
MPE
TB pleura
q
BL_STAT1
40.00
30.00
20.00
10.00
.00
MPE
TB pleura
r
BL_FCGR1B2
2.50
2.00
1.50
1.00
.50
.00
MPE
TB pleura
s
BL_KAZN
.40
.30
.20
.10
.00
MPE
TB pleura
t
BL_CD53
80.00
60.00
40.00
20.00
.00
MPE
TB pleura

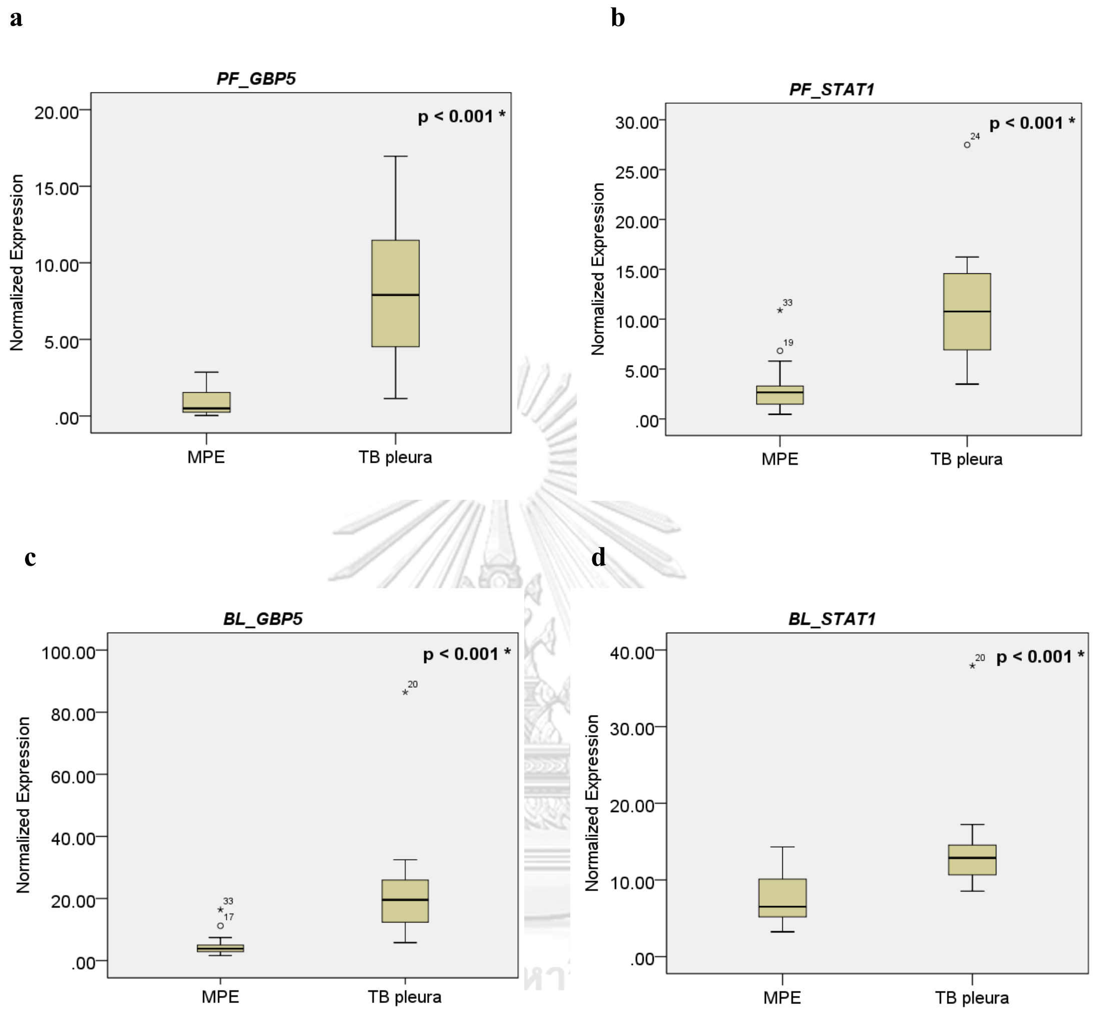
หมายเหตุ:

- ระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการเป็นวัณโรคทั้ง 10 ยีน ได้แก่ *FCGR1B1, FCGR1A, MAFB, GBP5, APOL1, KCNJ15, STAT1, FCGR1B2, KAZN* และ *CD53* มีหน่วยเป็น normalized expression เมื่อเทียบกับยีนควบคุมคือ *HPRT1*
- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ pleural fluid, PF; blood, BL; pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE.
- แผนภูมิย่อยแสดงระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย (a) PF_*FCGR1B1*, (b) PF_*FCGR1A*, (c) PF_*MAFB*, (d) PF_*GBP5*, (e) PF_*APOL1*, (f) PF_*KCNJ15*, (g) PF_*STAT1*, (h) PF_*FCGR1B2*, (i) PF_*KAZN* และ (j) PF_*CD53*
- แผนภูมิย่อยแสดงระดับการแสดงออกของยีนจากเลือดของผู้ป่วย (k) BL_*FCGR1B1*, (l) BL_*FCGR1A*, (m) BL_*MAFB*, (n) BL_*GBP5*, (o) BL_*APOL1*, (p) BL_*KCNJ15*, (q) BL_*STAT1*, (r) BL_*FCGR1B2*, (s) BL_*KAZN* และ (t) BL_*CD53*

ตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าในจำนวนทั้ง 10 ยีนที่ส่งตรวจไป มีเพียงแค่ 2 ยีนเท่านั้น คือ GBP5 และ STAT1 ที่มีระดับการแสดงออกในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมากกว่ากลุ่มมะเร็งแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน จะเห็นภาพชัดเจนขึ้นเมื่อนำเอาเฉพาะสองยีนนี้มาทำ Boxplots of the median level of gene expression of *GBP5* and *STAT1* ของตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (figure a-b) และเลือด (figure c-d) จำแนกตามกลุ่มวัณโรค (TB pleura) และกลุ่มมะเร็ง (MPE) ตาม**แผนภูมิที่ 7**

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แผนภูมิที่ 7 Boxplots แสดงค่ามัธยฐานของระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* and *STAT1* จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (PF) (แผนภูมิย่อย a-b) และในเลือด (BL) (แผนภูมิย่อย c-d)



หมายเหตุ:

- ระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* และ *STAT1* มีหน่วยเป็น normalized expression เมื่อเทียบกับยีนควบคุมคือ *HPRT1*

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE.

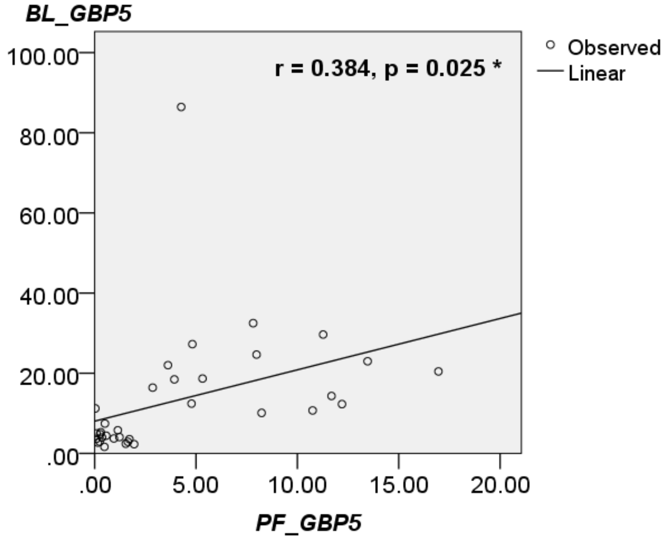
*ข้อมูลที่มีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อนำยีน *GBP5* และ *STAT1* มาทำการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression analysis) ตาม**แผนภูมิที่ 8** พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* ของน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดกับในเลือด (figure a) มีความสัมพันธ์เชิงบวก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,

r) คือ r = 0.384 และมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.025), ส่วนระดับการแสดงออกของยีน STAT1 ของน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดกับในเลือด (figure b) มีความสัมพันธ์เชิงบวกเช่นเดียวกัน โดยมีค่า r = 0.436 และมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.010)

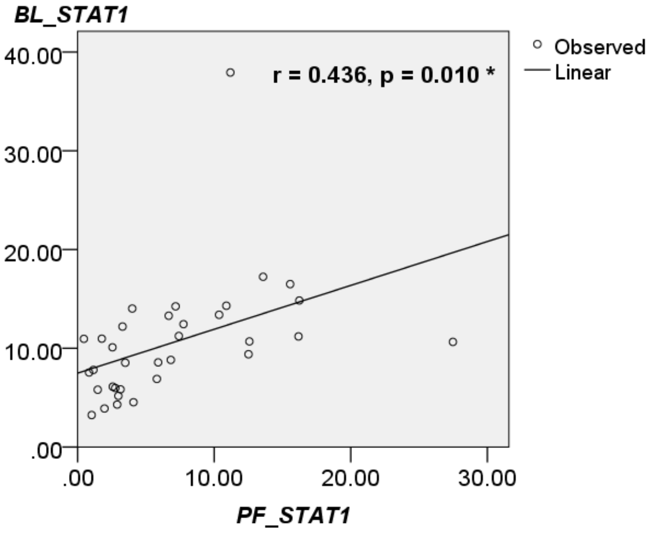
แผนภูมิที่ 8 แสดงความสัมพันธ์เชิงบวกของระดับการแสดงออกของยีนจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดกับในเลือดของยีน *GBP5* แผนภูมิย่อย (a) และ *STAT1* แผนภูมิย่อย (b)

a



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b



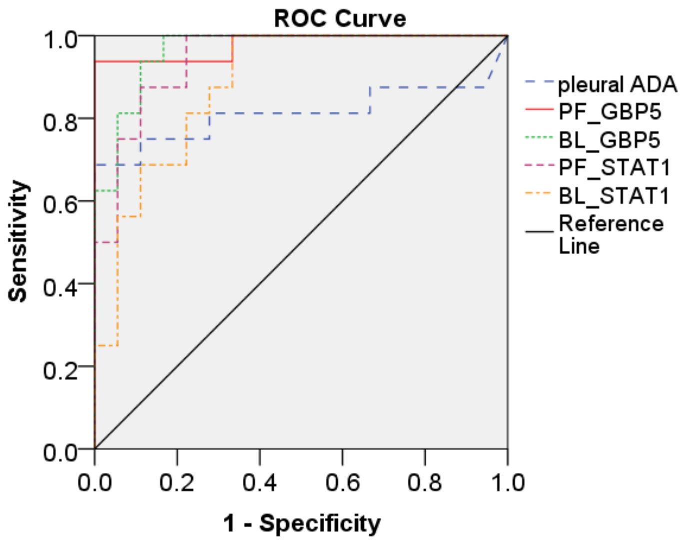
หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE; Correlation coefficient, r; Pleural fluid, PF; Blood, BL.

*ข้อมูลมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์โดยใช้ Linear regression analysis

เมื่อมาดูพื้นที่ใต้กราฟ receiver operating cure (ROC) เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) ของระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural *GBP5*), *GBP5* ในเลือด (blood *GBP5*), *STAT1* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural *STAT1*), *STAT1* ในเลือด (blood *STAT1*) และ pleural ADA ตาม**แผนภูมิที่ 9** และ**ตารางที่ 6** จะเห็นได้ว่า pleural *GBP5* ให้พื้นที่ใต้กราฟสูงที่สุด 97.9% (93.5-100%, $p < 0.001$), รองลงมาคือ blood *GBP5* 96.5% (93.5-100%, $p < 0.001$), pleural *STAT1* 94.4% (87.3-100%, $p < 0.001$), blood *STAT1* 88.2% (76.9 – 99.5%, $p < 0.001$) และ pleural ADA 81.3% (64.1-98.4%, $p = 0.002$) ตามลำดับ และมีนัยสำคัญ

แผนภูมิที่ 9 แสดง receiver operating curve (ROC) ของยีน PF_*GBP5*, BL_*GBP5*, PF_*STAT1*, BL_*STAT1* และ pleural ADA



หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE; Adenosine deaminase, ADA.

ตารางที่ 6 แสดงพื้นที่ใต้กราฟ ROC (AUC) ของยีน PF_*GBP5*, BL_*GBP5*, PF_*STAT1*, BL_*STAT1* และ pleural ADA

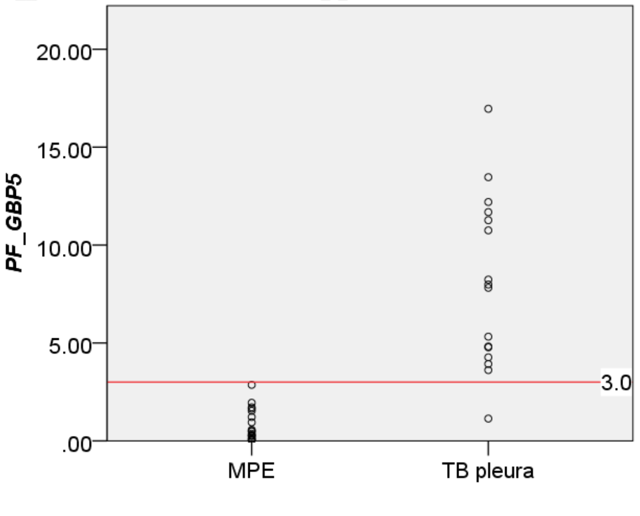
Gene	AUC	95% CI	P-value
Pleural *GBP5*	97.9%	93.5 - 100	<0.001*
Blood *GBP5*	96.5%	91.2 - 100	<0.001*
Pleural *STAT1*	94.4%	87.3 - 100	<0.001*
Blood *STAT1*	88.2%	76.9 – 99.5	<0.001*
Pleural ADA	81.3%	64.1 – 98.4	0.002*

หมายเหตุ:
- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE; Correlation coefficient, r; Adenosine deaminase, ADA; Area under ROC curve, AUC.

*มีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ เมื่อกำหนดค่าระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* ของน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural *GBP5*) ซึ่งให้พื้นที่ใต้กราฟสูงที่สุดจาก**ตารางที่ 6** ตัดค่าที่ 3.0 normalized expression แล้วคำนวณค่าดัชนีการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแยกจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด ได้เป็นค่าความไว (sensitivity) 93.8%, ความจำเพาะ (specificity) 100%, ค่าพยากรณ์เชิงบวก (PPV) 100% และค่าพยากรณ์เชิงลบ (NPV) 94.7% ตามที่แสดงใน**แผนภูมิที่ 10** และ**ตารางที่ 7**

แผนภูมิที่ 10 Scatter plot แสดงจุดตัดของระดับยีน *GBP5* จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ที่ 3.0 normalized expression



หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE.

ตารางที่ 7 แสดงค่าดัชนีการวินิจฉัยแยกโรคด้วยระดับยีน *GBP5* จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดตัดค่าที่ระดับ 3.0 normalized expression

ระดับยีน *GBP5* จากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (หน่วยเป็น Normalized expression)	มะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (N = 18)	วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (N = 16)	Total
Pleural *GBP5* level < 3	18	1	19
Pleural *GBP5* level ≥ 3	0	15	15
Total	18	16	34

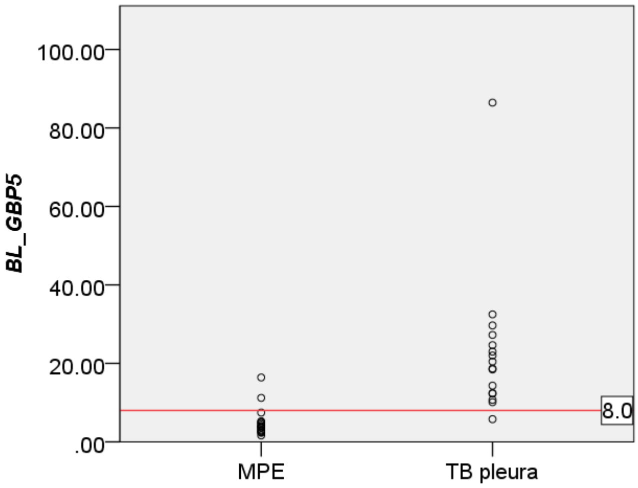
หมายเหตุ:

- คำนวณค่าความไว (sensitivity) ร้อยละ 93.8, ค่าความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์เชิงบวก (positive predictive value, PPV) ร้อยละ 100, ค่าพยากรณ์เชิงลบ (negative predictive value, NPV) ร้อยละ 94.7

- ข้อมูลมีนัยสำคัญทางสถิติ คำนวณได้ค่า P-value <0.001

ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อนำยีน *GBP5* ของเลือด (blood *GBP5*) ซึ่งให้พื้นที่ใต้กราฟสูงรองลงมาจาก**ตารางที่ 6** มากำหนดค่าระดับการแสดงออกของยีน โดยตัดค่าที่ 8.0 normalized expression แล้วคำนวณค่าดัชนีการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแยกจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด ได้เป็นค่าความไว (sensitivity) 93.8%, ความจำเพาะ (specificity) 88.9%, ค่าพยากรณ์เชิงบวก (PPV) 88.2% และค่าพยากรณ์เชิงลบ (NPV) 94.1% ตามที่แสดงใน**แผนภูมิที่ 11** และ**ตารางที่ 8**

แผนภูมิที่ 11 Scatter plot แสดงจุดตัดของระดับยีน *GBP5* ในเลือดที่ 8.0 normalized expression



หมายเหตุ:

- ตัวย่อภาษาอังกฤษได้แก่ Pleural fluid, PF; Blood, BL; Pleural tuberculosis, TB pleura; malignant pleural effusion, MPE.

ตารางที่ 8 แสดงค่าดัชนีการวินิจฉัยแยกโรคด้วยระดับยีน *GBP5* ในเลือด ตัดค่าที่ระดับ 8.0 normalized expression

ระดับยีน *GBP5* ในเลือด (หน่วยเป็น Normalized expression)	มะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด (N = 18)	วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (N = 16)	Total
Blood *GBP5* level < 8	16	1	17
Blood *GBP5* level ≥ 8	2	15	17
Total	18	16	34

หมายเหตุ:

- คำนวณค่าความไว (sensitivity) ร้อยละ 93.8, ค่าความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 88.9, ค่าพยากรณ์เชิงบวก (positive predictive value, PPV) ร้อยละ 88.2, ค่าพยากรณ์เชิงลบ (negative predictive value, NPV) ร้อยละ 94.1

- ข้อมูลมีนัยสำคัญทางสถิติ คำนวณได้ค่า P-value <0.001

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผล และเปรียบเทียบกับการศึกษาที่คล้ายคลึงกัน

วิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคให้รวดเร็วขึ้น นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการรักษาผู้ป่วยได้เร็วขึ้นแล้ว ยังเป็นการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคอีกด้วย (2) วัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นวัณโรคนอกปอดที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 2 รองจากวัณโรคต่อมน้ำเหลือง (3) ซึ่งการรักษาใช้สูตรยามาตรฐานเหมือนกันกับวัณโรคปอด แต่ความสำคัญคือการตรวจวินิจฉัยทำได้ยากกว่าวัณโรคปอด เนื่องจากผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีลักษณะทางคลินิกและลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดเป็นชนิด lymphocytic exudative pleural effusion คล้ายคลึงกันกับผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด (7, 17, 18) นอกจากนี้การส่งตัวอย่างเสมหะ น้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด หรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ไปตรวจดูเชื้อวัณโรคโดยตรง โดยวิธีการตรวจย้อมสีทนกรด (AFB staining) การตรวจสารพันธุกรรมเชื้อวัณโรค (PCR-TB) และการเพาะเชื้อวัณโรค (mycobacterial culture) มักไม่พบเชื้อ เนื่องจากธรรมชาติการเกิดโรคเป็นชนิดมีเชื้อจำนวนน้อย (pauci-bacillary) แต่ปริมาณเชื้อที่มีจำนวนน้อยนี้ไปกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว ก่อให้เกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity reaction ซึ่งเป็นกลไกเกิดโรคที่สำคัญ เกิดการหลั่ง inflammatory cytokines อาทิเช่น IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-27, TNF-alpha, IFN-gamma และ ADA เป็นต้น ส่งผลเพิ่มความสามารถของน้ำในการซึมผ่านผนังเยื่อบุหลอดเลือดฝอย (capillary permeability) และลดการดูดซึมกลับของน้ำเหลือง เกิดน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดตามมา (4)

ปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกันชนิด delayed hypersensitivity reaction ซึ่งเป็นกลไกหลักในการเกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น มี interferon gamma (IFN-γ) และ tumor necrosis factor alpha (TNF-α) เป็น inflammatory cytokines ที่น่าสนใจ และนำไปสู่การค้นหา genetic biomarkers ที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคชนิด active tuberculosis ในระบบของ IFN-γ พบว่ามี 13 ยีนที่มีระดับการแสดงออกของยีนในเลือด ตามหลังการติดเชื้อวัณโรคสูงกว่ายีนอื่น ได้แก่ *SORT1, EPB41L3,* ***KCNJ15, MAFB****, PSTPIP2,* ***GBP5, FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, KAZN, APOL1, STAT1****, WARS* ซึ่งทั้ง 13 ยีนนี้ลดระดับการแสดงออกลงหลังจากรักษาวัณโรคไปแล้ว 2 อาทิตย์ (9, 10) ในเวลาต่อมามีการศึกษาสนับสนุนอีกว่ายีน ***FCGR1A*** และ ***FCGR1B*** มีบทบาทสำคัญในต้านเชื้อวัณโรค (28, 29), ส่วนยีน ***MAFB*** และ ***KAZN*** สัมพันธ์กับ active tuberculosis และมีบทบาทใน

host susceptibility/resistance ต่อการเกิดวัณโรค [30, 31], นอกจากนี้ยังมียีน **CD53** (cluster of differentiation 53) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับของ tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) ซึ่งสัมพันธ์กับ active tuberculosis อีกด้วย [32] ยิ่งไปกว่านั้นมีการศึกษาในประเทศไทยเอง ช่วยสนับสนุนว่า 7 ยีนได้แก่ ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, MAFB, APOL1, STAT1 และ KAZN*** มีระดับการแสดงออกในเลือดสูง เมื่อนำมาเข้าสถิติ multiple logistic regression คำนวณเป็น TB sick score แล้วตัดค่าที่ 1.0 สามารถนำมาใช้วินิจฉัยวัณโรคปอดได้โดยให้ค่าความไวร้อยละ 82.5 และความจำเพาะร้อยละ 100 [11] แต่จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีข้อมูลการนำมาใช้วินิจฉัยแยกวัณโรคเยื่อหุ้มปอดออกจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในเวชปฏิบัติปัจจุบัน และเนื่องจากการรักษาทั้งสองกลุ่มโรคแตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเทคนิคการตรวจใหม่ที่ให้ค่าดัชนีการวินิจฉัยโรคสูง ตอบผลเร็ว และราคาไม่แพงมาก

จากผลการศึกษาข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วยในงานวิจัยนี้ตามตารางที่ 1 พบว่า กลุ่มวัณโรคมีประวัติสัมผัสผู้ป่วยวัณโรคร้อยละ 25 โดยที่กลุ่มมะเร็งไม่มีประวัติเลย แต่กลุ่มมะเร็งกลับมีประวัติการเป็นมะเร็งในอดีตร้อยละ 50 สูงกว่ากลุ่มวัณโรคที่มีประวัติการเป็นมะเร็งในอดีตเพียงร้อยละ 12.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งข้อมูลนี้ไม่น่าแปลกใจ เนื่องจากผู้วิจัยเก็บข้อมูลแบบ case-control ไปข้างหน้า ไม่ได้มีการบวนการสุ่มข้อมูลและควบคุมปัจจัยเสี่ยงซึ่งเป็นตัวแปรกวนแต่อย่างใด และองค์ความรู้ปัจจุบันชัดเจนอยู่แล้วว่า ประวัติสัมผัสผู้ป่วยวัณโรคเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการเกิดวัณโรคปอด [2] และเช่นเดียวกันกับประวัติการเป็นมะเร็งในอดีตมาก่อนย่อมเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดโดยเฉพาะเมื่อโรคมะเร็งที่ผู้ป่วยเป็นอยู่แล้วกลับเป็นซ้ำและมีการดำเนินโรคมากขึ้น [34]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดส่วนใหญ่ในการศึกษานี้ตามตารางที่ 2-3 เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยระดับน่าจะเป็นโรค (probable diagnosis) ร้อยละ 56.25 จากผลชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดพบลักษณะ granulomatous inflammation ในขณะที่การวินิจฉัยระดับเป็นโรคแน่นอน (definite diagnosis) ที่อาศัยการตรวจพบเชื้อวัณโรคจากสารพันธุกรรมหรือการเพาะเชื้อวัณโรค พบเพียงร้อยละ 31.25 และอีกร้อยละ 12.5 เป็นการวินิจฉัยระดับอาจจะเป็นโรค (possible diagnosis) ที่ใช้เพียงอาการทางคลินิกร่วมกับลักษณะน้ำเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ซึ่งสอดคล้องไปกับธรรมชาติการเกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่เป็นกลุ่มพบเชื้อน้อย การวินิจฉัยแยกโรคโดยส่วนใหญ่ในปัจจุบันจึงอาศัยการตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดเป็นหลัก [35, 36] การทำ ultrasound guided closed pleural biopsy เมื่อเทียบกับ closed pleural biopsy ตามปกติ จะเพิ่ม diagnostic yield เป็นร้อยละ 88.9 [5] ส่วนการทำ thoracoscopic biopsy จะเพิ่มความไวสูงถึงร้อยละ 95-100 [6] แต่การทำ thoracoscopic biopsy ต้อง

ทำในโรงพยาบาลที่มีศักยภาพของเครื่องมือและบุคลากรที่มีความพร้อมเช่นในโรงเรียนแพทย์ และผู้ป่วยต้องนอนโรงพยาบาลอย่างน้อย 3-5 วัน จึงเป็นข้อจำกัดที่สำคัญ

ลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากการศึกษานี้ตามตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่า กลุ่มวัณโรคพบระดับ pleural ADA และสัดส่วน %lymphocyte/total white cell สูงกว่ากลุ่มมะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ระดับ lactate dehydrogenase, total protein และ sugar ไม่ได้มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องไปด้วยกันกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าค่า ADA สูงที่ระดับ $\geq$ 40 IU/ml สามารถวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้ แต่ยังมีค่าความไวและความจำเพาะที่แตกต่างกันไปในแต่ละการศึกษา ตั้งแต่ร้อยละ 68 ถึง 91 [8] สำหรับในการศึกษาของเราพบว่าถ้าใช้ ADA ที่ระดับ > 30 IU/ml ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจะมีความไวร้อยละ 68.7 และความจำเพาะร้อยละ 100

จากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 10 ยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคตามตารางที่ 5 และแผนภูมิที่ 6-7 จากตัวอย่างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดและเลือดของกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด มีการแสดงออกของยีนที่น่าสนใจ 2 ยีน คือ *GBP5* และ *STAT1* ซึ่งพบว่ามีระดับการแสดงออกที่สูงโดดเด่นกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมี median normalized expression of pleural *GBP5* เท่ากับ 7.90 $\pm$ 7.18 ในกลุ่มวัณโรคเทียบกับกลุ่มมะเร็งเท่ากับ 0.49 $\pm$ 1.34 ($p < 0.001$) และ pleural *STAT1* เท่ากับ 10.77 $\pm$ 8.27 ในกลุ่มวัณโรคเทียบกับกลุ่มมะเร็งเท่ากับ 2.66 $\pm$ 2.09 ($p < 0.001$) สำหรับในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด พบว่า blood *GBP5* เท่ากับ 19.56 $\pm$ 14.27 ในกลุ่มวัณโรคเทียบกับกลุ่มมะเร็งเท่ากับ 3.85 $\pm$ 2.24 ($p < 0.001$) และ blood *STAT1* เท่ากับ 12.87 $\pm$ 4.03 ในกลุ่มวัณโรคเทียบกับกลุ่มมะเร็ง 6.50 $\pm$ 5.29 ($p < 0.001$) ในขณะที่ยีนตัวอื่นอีก 8 ตัวมีระดับการแสดงออกในทั้งสองตัวอย่างไม่ไปในแนวทางเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อนำยีน *GBP5* และ *STAT1* ไปทำ linear regression analysis ดูความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณของยีนในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดตาม**แผนภูมิที่ 8** พบความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ยีน *GBP5* มีค่า $r = 0.384$ ($p = 0.025$) ส่วนยีน *STAT1* มีค่า $r = 0.436$ ($p = 0.010$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า 7 ยีนได้แก่ ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2, MAFB, APOL1, STAT1* และ *KAZN*** ที่เคยถูกพบว่ามีระดับการแสดงออกในเลือดสูงในกลุ่มคนไข้ไทยที่เป็น active pulmonary tuberculosis (ATB) เทียบกับกลุ่ม healthy control และ previous TB [11] ในงานวิจัยของเรากลับพบว่ายีน ***FCGR1A, FCGR1B variant 1, FCGR1B variant 2* และ *APOL1*** มีระดับการแสดงออกในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด สูงแตกต่างจากกลุ่มมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด เฉพาะแต่ในเลือดเท่านั้น ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า คนไข้วัณโรคเยื่อหุ้มปอดน่าจะมี TB-specific target receptor(s) ในเยื่อหุ้มปอด ที่เมื่อเวลามี mycobacterium antigen มา

จับ TB-specific receptor นี้แล้วไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนบางประเภทมากขึ้น (overexpression) ซึ่งแตกต่างไปจากคนที่เป็นวัณโรคปอดปกติ ซึ่งความแตกต่างนี้ทำให้เกิดการสร้าง signaling protein ไปกระตุ้นเม็ดเลือดขาวหลั่งสารสื่อการอักเสบในเซลล์เยื่อหุ้มปอด (inflammatory cytokines) ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มปอด แล้วสร้างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดปริมาณมากขึ้นตามมา

สำหรับยีน ***MAFB*** ไม่มีความแตกต่างเลยทั้งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน *MAFB* ไม่ได้มีความจำเพาะต่อ TB-specific receptor ที่เยื่อหุ้มปอดเลย ในขณะที่ ***KAZN*** กลับพบตรงกันข้ามว่ามีระดับการแสดงออกเฉพาะในเลือดกลุ่มคนไข้วัณโรคเยื่อหุ้มปอดต่ำกว่ากลุ่มโรคมะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด จึงเป็นไปได้ว่าในบริบทของวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น ยีน ***KAZN*** อาจจะเป็นยีนที่ถูกกดการแสดงออกไว้ (suppression) ไม่เหมือนในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (overexpression) ในกลุ่มที่เป็น active pulmonary tuberculosis แต่สิ่งที่น่าสนใจก็คือว่า มีเพียงแค่ยีน ***GBP5*** และ ***STAT1*** ที่พบว่ามีระดับการแสดงออกที่สูงโดดเด่นในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด มากกว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด ทั้งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือด มีระดับการแสดงออกสอดคล้องไปด้วยกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สิ่งที่พบในการศึกษานี้เป็นการสนับสนุนว่ายีน ***GBP5*** และ ***STAT1*** มีความสัมพันธ์จำเพาะเจาะจงกับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจริง อธิบายได้จากกลไกทางระบบภูมิคุ้มกัน (immunologic delay hypersensitivity reaction) ที่เยื่อหุ้มปอด แล้วสร้างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดมากกว่าที่จะเป็นจากกลไกที่มีการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มปอดโดยตรง (direct pleural infection) แล้วค่อยกระตุ้นการสร้างน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ซึ่งถ้าเป็นจากกลไกการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มปอดโดยตรง ควรจะเห็น gene expression เฉพาะจากน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ดังนั้นยีน ***GBP5*** และ ***STAT1*** อาจใช้เป็นไบโอมาร์คเกอร์ (biomarker) สำหรับวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้

GBP5 เป็นยีนที่ encode โปรตีนที่ชื่อว่า guanylate binding protein 5 (GBP5) ซึ่ง guanylate binding proteins (GBPs) เป็นกลุ่มโปรตีน family ใหญ่ของ cytokine-induced GTPase มีทั้งหมด 7 sub-families คือ GBP1-7 และยีนที่ encode GBP ทุก sub-families อยู่รวมกันบนโครโมโซมคู่ที่ 1, *GBP* ทุกชนิดถูกกระตุ้นโดย inflammatory cytokines ได้แก่ IFN-γ, TNF-α และ IL-1-β เพื่อสร้างโปรตีน GBP ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ GTPase เกิดกระบวนการ guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis ได้ผลิตภัณฑ์เป็น one guanosine diphosphate (1GDP) และ one inorganic phosphate (1Pi) หรือ one guanosine monophosphate (1GMP) และ two inorganic phosphate (2Pi) ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ แต่ยีน *GBP5* เป็นตัวเดียวที่ encode GBP5 ไปกระตุ้นการทำงานของ GTPase ให้ผลิตเฉพาะ GDP + 1Pi ไม่ผลิต GMP + 2Pi เหมือน

sub-families ตัวอื่น และยีน *GBP5* ถูกกระตุ้นโดย cytokine ชนิดเดียวคือ IFN-γ ในขณะที่ *GBP*s ตัวอื่นอาจถูกกระตุ้นได้โดย cytokines อื่นนอกเหนือจาก IFN-γ ได้ อาทิเช่น TNF-α และ IL-1-β [37]

มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตรวจระดับยีน *GBP5* ในเลือดชนิด whole blood (WB) และ peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เพื่อช่วยวินิจฉัยแยกวัณโรคปอด (active TB) 419 คน ออกจากโรคปอดอื่น 499 คนซึ่งป่วยเป็น pneumonia ร้อยละ 58, pulmonary sarcoidosis ร้อยละ 31, และ lung cancer ร้อยละ 11 และอีกกลุ่มเป็นอาสาสมัครสุขภาพดี 499 คน พบว่ายีน *GBP5* และ *KLF2* (encode Krüppel-Like Factor 2) เมื่อส่งตรวจคู่กันในเลือดชนิด WB สามารถใช้วินิจฉัยแยก active TB ออกจาก คนปกติได้ โดยมีค่า AUC, sensitivity และ specificity เป็น 86%, 77.8% และ 87.1% ตามลำดับ แต่ถ้าใช้วินิจฉัยแยก active TB ออกจากโรคปอดอื่น จะมีค่า AUC, sensitivity และ specificity สูงกว่าคือ 89%, 96.1% and 85.2% ตามลำดับ แต่มีข้อสังเกตจากข้อมูลงานวิจัยนี้คือ การตรวจยีน *GBP5* เพียงยีนเดียวใน WB สามารถใช้วินิจฉัยแยก active TB ออกจากคนปกติได้ดี โดยมีค่า AUC, sensitivity และ specificity เป็น 85%, 80.6% และ 90.9% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการตรวจ combination gene *GBP5* and *KLF2* เสียอีก นอกจากนี้ถ้าใช้ GBP5 เพียงตัวเดียวใน WB สามารถวินิจฉัยแยก active TB ออกจากโรคปอดอื่นๆ โดยมี AUC, sensitivity และ specificity เป็น 86%, 88.2% และ 78.5% ตามลำดับ ซึ่งดูต่ำกว่า combination gene *GBP5* and *KLF2* เพียงเล็กน้อย เท่านั้น [38] ผลการศึกษาที่ได้นี้จึงสนับสนุนบทบาทสำคัญของ blood *GBP5* ในการวินิจฉัยวินิจฉัยแยกวัณโรคปอดจากคนปกติและผู้ป่วยโรคปอดอื่นที่มีโรคมะเร็งปอดรวมอยู่ด้วย แต่ปัจจุบันยังไม่มีที่ศึกษาระดับยีน *GBP5* ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด

STAT1 เป็นยีนที่ encode โปรตีนที่ชื่อว่า signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม STAT protein family มีทั้งหมด 6 sub-families คือ STAT1-6 ส่วนยีนที่ encode STAT อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ซึ่งถูกกระตุ้นโดย cytokines และ growth factors ได้แก่ interferon alpha (IFN-α), interferon gamma (IFN-γ), epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF) หรือ interleukin 6 (IL-6) [39] ส่วนยีน *STAT1* ถูกกระตุ้นโดย type I (IFN-α/IFN-β), type II (IFN-γ), หรือ type III interferon lambda (IFN-λ) กระตุ้นกลไกของ JAK/STAT pathway ให้เกิด signaling apoptosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ที่ติดเชื้อวัณโรค [40] แต่ปัจจุบันยังไม่มีที่ศึกษาระดับยีน STAT1 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดเช่นกัน

สำหรับในงานวิจัยนี้ พบว่าค่าดัชนีการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยการเปรียบเทียบ AUC ของ pleural *GBP5*, blood *GBP5*, pleural *STAT1*, blood *STAT1* และเทียบกับ biomarker ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันคือ pleural ADA ตามแผนภูมิที่ 9 และตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่า pleural *GBP5* ให้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

AUC สูงที่สุด 97.9% (93.5-100%, p < 0.001), รองลงมาคือ blood *GBP5* 96.5% (93.5-100%, p < 0.001), pleural *STAT1* 94.4% (87.3-100%, p < 0.001), blood *STAT1* 88.2% (76.9 – 99.5%, p < 0.001), ส่วน pleural ADA 81.3% (64.1-98.4%, p = 0.002) ต่ำที่สุด บ่งบอกว่าระดับยีน *GBP5* ทั้งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือดดูมีความสามารถในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเหนือกว่า pleural *STAT1,* blood *STAT1* และ pleural ADA

เมื่อนำเฉพาะ *GBP5* ในตัวอย่างน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural *GBP5*) มาคำนวณค่าดัชนีการวินิจฉัยโรคที่จุดตัดระดับการแสดงออกของยีนในน้ำเท่ากับ 3.0 normalized expression ตามตารางที่ 7 และแผนภูมิที่ 10 พบว่ามีค่าความไว 93.8%, ความจำเพาะ 100%, ค่าพยากรณ์เชิงบวก 100% และค่าพยากรณ์เชิงลบ 94.7% (p-value < 0.001) ส่วนระดับ *GBP5* ในตัวอย่างเลือด (blood *GBP5*) มีความน่าสนใจกว่าตัวอย่างน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดเสียอีก เนื่องจากคำนวณค่าดัชนีการวินิจฉัยโรคที่จุดตัดระดับการแสดงออกของยีนในเลือดเท่ากับ 8.0 normalized expression ตามตารางที่ 8 และแผนภูมิที่ 11 พบว่ามีค่าความไว 93.8%, ความจำเพาะ 88.9%, ค่าพยากรณ์เชิงบวก 88.2% และค่าพยากรณ์เชิงลบ 94.1% (p-value < 0.001) บ่งบอกว่าการตรวจเลือดดูระดับยีน *GBP5* มีความสามารถในการวินิจฉัยวัณโรคได้ใกล้เคียงกับการตรวจน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด ซึ่งการค้นพบนี้จะมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นการพลิกโฉมของการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเลยทีเดียว เนื่องจากโรคที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดจากสาเหตุใดๆก็มักจะต้องเจาะน้ำออกตรวจอยู่ทั้งสิ้น การเจาะเลือดตรวจย่อมทำได้ง่ายกว่า ปลอดภัยกว่า โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีข้อห้ามในการทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดได้ เป็นการหลีกเลี่ยงภาวะแทรกซ้อนที่จะเกิดขึ้นจากการทำหัตถการดังกล่าว ช่วยให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่รวดเร็วขึ้น และในอนาคตอาจนำไปใช้ติดตามการรักษาวัณโรคจากการเจาะเลือดดูการลดลงของระดับยีน *GBP5* ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5.2 จุดแข็งของงานวิจัย

1) งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาแรกในโลก ที่มีการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรค ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเทียบกับผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาช่องเยื่อหุ้มปอด

2) งานวิจัยมีวัตถุประสงค์ในการนำเทคนิคการตรวจใหม่นี้ มาใช้ในการวินิจฉัยแยกโรคที่มีลักษณะทางคลินิกและลักษณะน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocyte exudative pleural effusion ในสองภาวะที่มีความคล้ายคลึงกันคือวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้ม

ปอด แต่มีความแตกต่างในการรักษาโดยสิ้นเชิง ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้น ได้รับการรักษารวดเร็ว และเป็นการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อวัณโรค

3) ผลงานวิจัยนี้ พบข้อมูลที่น่าสนใจเพิ่มเติม คือการตรวจดูระดับการแสดงออกของยีน *GBP5* ในเลือด (blood *GBP5*) มีความสามารถใช้ในการวินิจฉัยแยกวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดได้ดีใกล้เคียงกับระดับ pleural *GBP5* และเหนือกว่า pleural ADA ที่เป็น biomarker ที่มีใช้อยู่ในปัจจุบัน จึงมีประโยชน์สำหรับผู้ป่วยที่มีข้อห้ามในการทำหัตถการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ยิ่งไปกว่านั้นยังอาจใช้ติดตามดูการตอบสนองต่อการรักษาวัณโรคได้อีกด้วยความเสี่ยงจากการทำหัตถการตรวจวินิจฉัยลดลง ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

5.3 ข้อจำกัดของงานวิจัย

1) การนำผลงานวิจัยไปใช้ในประชากรอื่น

การศึกษานี้จัดทำและดำเนินการวิจัยภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์เพียงแห่งเดียว และข้อมูลการศึกษามาจากการวินิจฉัยแยกโรคระหว่างผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดเท่านั้น ดังนั้นการนำข้อมูลไปใช้เพื่อแปลผลในประชากรอื่น จึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง และควรรอผลการศึกษาในประชากรกลุ่มอื่นเพิ่มเติมต่อไป

2) ผลบวกลวงและผลลบลวง

เนื่องจากยังไม่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนตัวเดียวกันในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกและลักษณะน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocytic exudative pleural effusion ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคอื่นเช่น กลุ่มโรคภูมิแพ้ตัวเอง (autoimmune diseases) อาทิเช่น เยื่อหุ้มปอดอักเสบจากโรคลูปัส (lupus pleuritis), เยื่อหุ้มปอดอักเสบจากโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid pleuritis) เป็นต้น จึงยังไม่สามารถบอกผลบวกลวง (false positive) หรือผลลบลวง (false negative) ของการตรวจระดับการแสดงออกของยีนได้ จึงควรทำการศึกษาต่อไป

3) การใช้ติดตามการรักษา

ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ยังไม่ได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนก่อนและหลังการรักษาวัณโรค จึงไม่สามารถบอกความจำเพาะของยีนที่ศึกษาได้ชัดเจนและยังไม่สามารถนำมาใช้ติดตามการรักษาได้ จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมหลังจากได้ยารักษาวัณโรคไปแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์ต่อไป

4) ค่าใช้จ่ายในการตรวจ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เทคนิคการตรวจระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี absolute quantitative real time PCR โดยใช้เครื่อง Droplet digital PCR มีค่าใช้จ่ายของหลอดเก็บตัวอย่าง (RNA collection tube) ราคา 400 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง และค่าตรวจระดับยีนราคา 3,000 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง เท่ากับราคารวม 3,400 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง จัดว่าเป็นค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าการส่ง pleural ADA ซึ่งมีราคา 400 - 700 บาทต่อหนึ่งตัวอย่างขึ้นอยู่กับสถาบันที่รับตรวจ สำหรับการตรวจ pleural IFN-gamma แม้จะมีความจำเพาะกับวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมากกว่า ADA แต่ยังไม่มีการตรวจทั่วไป

5) การเก็บรักษาตัวอย่างก่อนส่งตรวจ และการส่งตรวจแบบควบคุมอุณหภูมิ

เนื่องจากส่งตรวจได้ที่ศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แห่งเดียวเท่านั้น ดังนั้นเทคนิคการเก็บตัวอย่าง และวิธีการส่งตัวอย่างไปตรวจต่างสถาบัน โดยจะต้องเก็บตัวอย่างเก็บใส่ในหลอด RNA collection tubes ที่สามารถรักษาสภาพสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอทันที และเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง 25 °C ได้นาน 3 วัน, เก็บที่อุณหภูมิ 2-8 °C หรือในตู้เย็นธรรมดา 4 °C ได้นาน 7 วัน หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C หรือต่ำกว่านี้ได้นาน 5 ปี นอกจากนี้การส่งตัวอย่างไปตรวจที่ศูนย์พันธุศาสตร์การแพทย์ฯ ก็ต้องบรรจุในภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้งรักษาอุณหภูมิ -20 °C หรือต่ำกว่านี้อีกด้วย ถ้าไม่ทำเช่นนี้ RNA จะเสื่อมสภาพจนไม่สามารถสกัด RNA ไปตรวจต่อได้

5.4 ข้อเสนอแนะ

1) ควรทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรค ในสถาบันอื่นร่วมด้วย เพราะสถาบันอื่นอาจมีลักษณะพื้นฐานของประชากรที่แตกต่างกัน และอาจส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีนได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2) ควรทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนตัวเดียวกันในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางคลินิกและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอดชนิด lymphocytic exudative pleural effusion ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคอื่นโดยเฉพาะ กลุ่มโรคภูมิแพ้ตัวเอง (autoimmune diseases) อาทิเช่น lupus pleuritis, rheumatoid pleuritis เป็นต้น เพื่อศึกษาผลบวกลวงและผลลบลวงของการตรวจวิธีใหม่นี้

3) ควรทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในเลือดหลังจากได้ยารักษาวัณโรคไปแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์ต่อไป ว่าลดระดับลงหรือไม่ จะช่วยสนับสนุนความจำเพาะของยีนที่ใช้ตรวจนั้น และยังสามารถใช้ติดตามดูการตอบสนองต่อการรักษาวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้อีกด้วย

4) ค่าใช้จ่ายในการตรวจที่ค่อนข้างสูงก็จริงแต่มีคุณค่าที่จะทำการศึกษาต่อ ควรขอทุนสนับสนุนงานวิจัยต่อไป เมื่อได้ข้อมูลมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในเวชปฏิบัติทั่วไปแล้ว ค่อย

นำเสนอต่อผู้บริหารงานโปรแกรมวัณโรคระดับประเทศต่อไปในการต่อรองราคาให้ถูกลงเพื่อรองรับการใช้ตรวจในปริมาณมากต่อไปได้

5) การเก็บรักษาตัวอย่างก่อนส่งตรวจ และการส่งตรวจแบบควบคุมอุณหภูมิในภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้งรักษาอุณหภูมิ -20 °C หรือต่ำกว่านี้ เป็นหัวใจสำคัญของการตรวจระดับการแสดงออกของยีน ถ้าไม่ทำเช่นนี้ RNA จะเสื่อมสภาพจนไม่สามารถสกัด RNA ไปตรวจต่อได้

5.5 สรุปผล

การศึกษานี้ตอบคำถามหลักและคำถามรองของงานวิจัยได้ โดยมีผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ระดับการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อวัณโรคทั้ง 10 ยีน ในสารน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด มีความแตกต่างจากผู้ป่วยโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอด โดยเฉพาะยีน ***GBP5* และ *STAT1*** มีระดับการแสดงออกในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด สูงกว่ากลุ่มโรคมะเร็งฯ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการแสดงออกของยีน ***GBP5* และ *STAT1*** ทั้งในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดและในเลือด มีความสัมพันธ์สอดคล้องไปด้วยกัน

ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อใช้ระดับการแสดงออกของยีน ***GBP5*** ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด ที่จุดตัด 3.0 normalized expression จะสามารถคำนวณดัชนีการวินิจฉัยแยกโรคได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับยีนตัวอื่นและ ADA จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนว่ายีน ***GBP5*** มีความจำเพาะเจาะจงและอาจนำมาใช้ในการวินิจฉัยแยกวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจากโรคมะเร็งระยะแพร่กระจายมาเยื่อหุ้มปอดได้ แต่การนำไปใช้ยังมีข้อจำกัดที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บรรณานุกรม

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.

2. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการควบคุมวัณโรคประเทศไทย พ.ศ. 2561. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์อักษรกราฟฟิคแอนด์ดีไซน์; 2561. 120 p.

3. Wiwatworapan T, Anantasetagoon T. Extra-pulmonary tuberculosis at a regional hospital in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2008;39(3):521-5.

4. Ferreiro L, San Jose E, Valdes L. Tuberculous pleural effusion. Arch Bronconeumol. 2014;50(10):435-43.

5. Koegelenberg CF, Irusen EM, von Groote-Bidlingmaier F, Bruwer JW, Batubara EM, Diacon AH. The utility of ultrasound-guided thoracentesis and pleural biopsy in undiagnosed pleural exudates. Thorax. 2015;70(10):995-7.

6. Casalini AG, Mori PA, Majori M, Anghinolfi M, Silini EM, Gnetti L, et al. Pleural tuberculosis: medical thoracoscopy greatly increases the diagnostic accuracy. ERJ Open Res. 2018;4(1).

7. Valdes L, San Jose ME, Pose A, Gude F, Gonzalez-Barcala FJ, Alvarez-Dobano JM, et al. Diagnosing tuberculous pleural effusion using clinical data and pleural fluid analysis A study of patients less than 40 years-old in an area with a high incidence of tuberculosis. Respir Med. 2010;104(8):1211-7.

8. Gopi A, Madhavan SM, Sharma SK, Sahn SA. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. Chest. 2007;131(3):880-9.

9. Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. Nature. 2010;466(7309):973-7.

10. Bloom CI, Graham CM, Berry MP, Wilkinson KA, Oni T, Rozakeas F, et al. Detectable changes in the blood transcriptome are present after two weeks of antituberculosis therapy. PLoS One. 2012;7(10):e46191.

11. Satproedprai N, Wichukchinda N, Suphankong S, Inunchot W, Kuntima T, Kumpeerasart S, et al. Diagnostic value of blood gene expression signatures in active tuberculosis in Thais: a pilot

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

study. Genes Immun. 2015;16(4):253-60.

12. Richard W. Light. Pleural Diseases. sixth ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 504 p.

13. Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. Respirology. 2010;15(3):451-8.

14. Baumann MH, Nolan R, Petrini M, Lee YC, Light RW, Schneider E. Pleural tuberculosis in the United States: incidence and drug resistance. Chest. 2007;131(4):1125-32.

15. Saks AM, Posner R. Tuberculosis in HIV positive patients in South Africa: a comparative radiological study with HIV negative patients. Clin Radiol. 1992;46(6):387-90.

16. Jeon D. Tuberculous pleurisy: an update. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2014;76(4):153-9.

17. Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy. An acute illness. Arch Intern Med. 1968;122(4):329-32.

18. Berger HW, Mejia E. Tuberculous pleurisy. Chest. 1973;63(1):88-92.

19. Valdes L, Alvarez D, San Jose E, Penela P, Valle JM, Garcia-Pazos JM, et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. Arch Intern Med. 1998;158(18):2017-21.

20. Frye MD, Pozsik CJ, Sahn SA. Tuberculous pleurisy is more common in AIDS than in non-AIDS patients with tuberculosis. Chest. 1997;112(2):393-7.

21. Roper WH, Waring JJ. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. Am Rev Tuberc. 1955;71(5):616-34.

22. Casalini AG, Cusmano F, Sverzellati N, Mori PA, Majori M. An undiagnosed pleural effusion with surprising consequences. Respir Med Case Rep. 2017;22:53-6.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

23. Lee SJ, Kim HS, Lee SH, Lee TW, Lee HR, Cho YJ, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculous pleurisy. Am J Med Sci. 2014;348(5):362-5.

24. Wongtim S, Silachamroon U, Ruxrungtham K, Udompanich V, Limthongkul S, Charoenlap P, et al. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. Thorax. 1999;54(10):921-4.

25. Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. J Clin Microbiol. 2011;49(12):4341-2.

26. Diacon AH, Van de Wal BW, Wyser C, Smedema JP, Bezuidenhout J, Bolliger CT, et al. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. Eur Respir J. 2003;22(4):589-91.

27. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, Wright VJ, Banwell CM, Chagaluka G, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. N Engl J Med.

2014;370(18):1712-23.

28. Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, Stanley K, Roberts T, Black G, et al. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. Genes Immun. 2011;12(1):15-22.

29. Jacobsen M, Repsilber D, Gutschmidt A, Neher A, Feldmann K, Mollenkopf HJ, et al. Candidate biomarkers for discrimination between infection and disease caused by Mycobacterium tuberculosis. J Mol Med (Berl). 2007;85(6):613-21.

30. Mahasirimongkol S, Yanai H, Mushiroda T, Promphittayarat W, Wattanapokayakit S, Phromjai J, et al. Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis. J Hum Genet. 2012;57(6):363-7.

31. Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, et al. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. Genes Immun. 2009;10(1):77-83.

32. Omae Y, Toyo-Oka L, Yanai H, Nedsuwan S, Wattanapokayakit S, Satproedprai N, et al. Pathogen lineage-based genome-wide association study identified CD53 as susceptible locus in tuberculosis. J Hum Genet. 2017;62(12):1015-22.

33. Rosner BR. Fundamentals of Biostatistics fifth ed: S.Chand (G/L) & Company Ltd; 2000.

34. American Thoracic S. Management of malignant pleural effusions. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162(5):1987-2001.

35. Na MJ. Diagnostic tools of pleural effusion. Tuberc Respir Dis (Seoul). 2014;76(5):199-210.

36. Shaw JA, Irusen EM, Diacon AH, Koegelenberg CF. Pleural tuberculosis: A concise clinical review. Clin Respir J. 2018;12(5):1779-86.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

37. Vestal DJ, Jeyaratnam JA. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. J Interferon Cytokine Res. 2011;31(1):89-97.

38. Francisco NM, Fang YM, Ding L, Feng S, Yang Y, Wu M, et al. Diagnostic accuracy of a selected signature gene set that discriminates active pulmonary tuberculosis and other pulmonary diseases. J Infect. 2017;75(6):499-510.

39. Baris S, Alroqi F, Kiykim A, Karakoc-Aydiner E, Ogulur I, Ozen A, et al. Severe Early-Onset Combined Immunodeficiency due to Heterozygous Gain-of-Function Mutations in STAT1. J Clin Immunol. 2016;36(7):641-8.

40. Yao K, Chen Q, Wu Y, Liu F, Chen X, Zhang Y. Unphosphorylated STAT1 represses

apoptosis in macrophages during Mycobacteriumtuberculosis infection. J Cell Sci. 2017;130(10):1740-51.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก แบบเก็บข้อมูลงานวิจัย

การวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การตรวจระดับการแสดงออกของยีนเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

(ภาษาอังกฤษ) Gene expression test for diagnosis in tuberculous pleuritis

โปรดกรอกแบบบันทึกข้อมูลโดยเครื่องหมาย ⁄ ในช่องว่าง [ ] กรณีที่เว้นช่องว่าง โปรดเขียนคำตอบในช่องว่าง

ส่วนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป	
วันเดือนปีที่บันทึกข้อมูล (วัน/เดือน/ปี พ.ศ.) ……../……../25……	
เพศ	[ ] 0. หญิง [ ] 1. ชาย
อายุ	.……ปี [ ] 0. อายุ < 30 ปี [ ] 1. อายุ 30-60 ปี [ ] 2. อายุ > 60 ปี
อาชีพปัจจุบัน	[ ] 0. อื่นๆ ระบุ.. [ ] 1. เกษตรกรรม เช่น ทำนา ทำสวน ฯลฯ [ ] 2. ข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ [ ] 3. รับจ้างทั่วไป [ ] 4. ค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว [ ] 5. งานบ้าน เช่น พ่อบ้าน แม่บ้าน [ ] 6. นักเรียน/นักศึกษา [ ] 7. พระ/ชี/นักบวช [ ] 8. นักโทษ
ประวัติวัณโรคในอดีต	[ ] 0. ไม่เคยเป็นวัณโรค [ ] 1. เคยเป็นวัณโรค ถ้าเคยเป็นวัณโรค ระบุประวัติการป่วยวัณโรคในอดีต [ ] 1. วัณโรคไม่ดื้อยา (Drug susceptible tuberculosis; DS-TB) [ ] 2. วัณโรคดื้อยา (Drug resistant tuberculosis; DR-TB)
ประวัติโรคมะเร็งในอดีต	[ ] 0. ไม่เคยเป็นมะเร็ง [ ] 1. เคยเป็นมะเร็ง ถ้าเคยเป็นมะเร็ง ระบุประวัติการป่วยมะเร็งในอดีต [ ] 1. โรคมะเร็งปอด (Primary CA lung) [ ] 2. โรคมะเร็งต้นกำเนิดเป็นระบบอื่นที่ไม่ใช่ปอด ระบุชนิดของโรคมะเร็ง...
ประวัติโรคติดเชื้อเอชไอวี	[ ] 0. ไม่มีโรคติดเชื้อเอชไอวี [ ] 1. มีโรคติดเชื้อเอชไอวี
ประวัติโรคเบาหวาน	[ ] 0. ไม่มีโรคเบาหวาน [ ] 1. มีโรคเบาหวาน
ประวัติโรคทางระบบภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง	[ ] 0. ไม่มี [ ] 1. มี ระบุโรคทางระบบภูมิคุ้มกันทำลายตนเอง..
โรคประจำตัวอื่น	[ ] 0. โรคอื่น ระบุ …………………………………………………………….. [ ] 1. โรคหอบหืด [ ] 2. โรคถุงลมโป่งพอง [ ] 3. โรคหลอดลมโป่งพอง [ ] 4. โรคพังผืดที่ปอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	[ ] 5. โรคไตวายเรื้อรัง [ ] 6. โรคตับแข็ง
ยาที่รับประทานเป็นยากดภูมิคุ้มกัน	[ ] 0. ไม่มี [ ] 1. มี ถ้ามีช่วยระบุ…………………………………………………………..
ใช้สารเสพติด	[ ] 0. ไม่ใช้ [ ] 1. ใช้ ระบุชนิด…………….. ใช้วิธีไหน………..………………………………………….
สูบบุหรี่	[ ] 0. ไม่สูบ [ ] 1. เคยสูบ [ ] 2. สูบ ถ้าสูบ สูบมา………………ปี วันละ…………มวน ถ้าเคยสูบ หยุดมา……………..ปี
ดื่มสุรา	[ ] 0. ไม่ดื่ม [ ] 1. เคยดื่ม [ ] 2. ดื่ม ถ้าดื่ม ดื่ม………………… วันละ………………..แก้ว ถ้าเคยดื่ม หยุดมา……………..ปี

ส่วนที่ 2 ข้อมูลที่ได้จากการตรวจร่างกาย ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ และภาพถ่ายรังสีทรวงอก	
ส่วนสูง (Height; cm)	………………………….cm
น้ำหนัก (Weight; kg)	………………………….kg
BMI (kg/m^2)	………………………… kg/m^2
HbA1C (%)	………………………….%
Fasting plasma glucose (FPG; mg/dl)	………………………….mg/dl
CD4 level (ถ้ามี)	………………………….mm^3
Chest X-ray finding	[ ] 0. ปกติ [ ] 1. ผิดปกติ ระบุลักษณะรอยโรคที่ผิดปกติได้มากกว่า 1 ข้อ [ ] 1. Unilateral pleural effusion ☐ Right side ☐ Left side [ ] 2. Bilateral pleural effusion [ ] 3. Without lung parenchymal lesion [ ] 4. With lung parenchymal lesion ☐ No cavity lesion (NC) ☐ Cavity lesion (C) ☐ Other Findings ระบุ………………………………………………………………
Sputum AFB stain	[ ] 0. Negative [ ] 1. positive
Sputum real time PCR for TB	[ ] 0. MTB not detected [ ] 1. MTB detected without resistance [ ] 2. MTB detected with any drug resistance
Sputum TB culture	[ ] 0. MTB no growth

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

	[ ] 1. MTB growth without resistance [ ] 2. MTB growth with any drug resistance
ส่วนที่ 3 Pleural fluid profiles	
Appearance	[ ] 0. Clear [ ] 1. Straw [ ] 2. serosangrenous [ ] 3. Milky [ ] 4. Purulent [ ] 5. Bloody [ ] 6. อื่นๆ ระบุ.................................
Cell count	……………………………/mm3
Lymphocyte count % of total cell count	……………………………/mm3 ………………………… % of total cell count
Glucose	……………………………mg/dL
Total protein Ratio of TP fluid: serum	……………………………g/dL …………………………
Lactate dehydrogenase (LDH) Ratio of LDH fluid: serum	……………………………IU/L …………………………
Albumin	……………………………g/dL
Adenosine deaminase (ADA)	……………………………mg/dL
AFB stain	[ ] 0. Negative [ ] 1. positive
Real time PCR for TB	[ ] 0. MTB not detected [ ] 1. MTB detected without resistance [ ] 2. MTB detected with any drug resistance
TB culture	[ ] 0. MTB no growth [ ] 1. MTB growth without resistance [ ] 2. MTB growth with any drug resistance
Pleural biopsy report	[ ] 0. Chronic nonspecific pleuritis [ ] 1. Granulomatous pleuritis [ ] 2. Caseating granulomatous pleuritis [ ] 3. Malignancy (any cell type)
Pleural gene expression level (Normalized expression; fold change above housekeeping gene or internal control gene) (PF = pleural fluid)	PF_FCGR1B1 …………………………… PF_FCGR1A …………………………… PF_MAFB …………………………… PF_GBP5 …………………………… PF_APOL1 …………………………… PF_KCNJ15 …………………………… PF_STAT1 ……………………………

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

	PF_FCGR1B2	………………………………
	PF_KAZN	………………………………
	PF_CD53	………………………………
Blood gene expression level (Normalized expression; fold change above housekeeping gene or internal control gene) (BL = blood)	BL_FCGR1B1	………………………………
	BL_FCGR1A	………………………………
	BL_MAFB	………………………………
	BL_GBP5	………………………………
	BL_APOL1	………………………………
	BL_KCNJ15	………………………………
	BL_STAT1	………………………………
	BL_FCGR1B2	………………………………
	BL_KAZN	………………………………
	BL_CD53	………………………………

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นฤมล ลือกิตินันท์
วัน เดือน ปี เกิด	30 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	- พ.ศ. 2551 แพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) มหาวิทยาลัยมหิดล - พ.ศ. 2551 ใบอนุญาตประกอบวิชาชีพเวชกรรม แพทยสภา - พ.ศ. 2557 ประกาศนียบัตรบัณฑิตชั้นสูงทางวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก สาขาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย - พ.ศ. 2557 วุฒิบัตรฯ สาขาอายุรศาสตร์ แพทยสภา
ที่อยู่ปัจจุบัน	1/200 อาคารชุดยูดีไลท์รัตนาธิเบศร์ ถนนรัตนาธิเบศร์ ต.บางกระสอ อ.เมืองนนทบุรี จ.นนทบุรี 11000
ผลงานตีพิมพ์	Prevalence and Determinants of Obstructive Sleep Apnea (OSA) in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) : on process of submission
รางวัลที่ได้รับ	- พ.ศ. 2546 Scholarship Award on Best Score Sciences of 1st year medical training, Prof. Dr. Tap Neelanidhi Foundation. - พ.ศ. 2551 Doctor of Medicine (Second Class Honors), Mahidol University, Thailand. - พ.ศ. 2557 The 3rd prize of research contest of 100 Year-Experiences towards Excellence, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University