



การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Hypertonic saline-sodium
hydroxide ในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้น
เพื่อการเพาะเชื้อ Mycobacteria

โดย

นายอนุกุล บุญคง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เทคนิคการแพทยมหาบัณฑิต

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Hypertonic saline-sodium
hydroxide ในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อ
การเพาะเชื้อ Mycobacteria

โดย

นายอนุกุล บุญคง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เทคนิคการแพทยมหาบัณฑิต

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

EVALUATION OF HYPERTONIC SALINE-SODIUM HYDROXIDE
SOLUTION FOR CONCENTRATION OF SPUTUM SAMPLES
FOR MYCOBACTERIAL CULTURE

BY

MR. ANUGOON BUNKHONG



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF MEDICAL TECHNOLOGY
FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2017
COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะสหเวชศาสตร์

วิทยานิพนธ์

ของ

นายอนุกุล บุญคง

เรื่อง

การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Hypertonic saline-sodium hydroxide ในการใช้เตรียม
ตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อการเพาะเชื้อ Mycobacteria

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เทคนิคการแพทยมหาบัณฑิต

เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



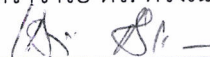
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตร วงศ์ลำซำ)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์



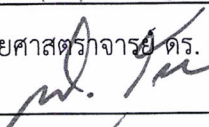
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสกสรรค์ สโมสรสุข)

คณบดี



(รองศาสตราจารย์ ดร. กำพล รุจิวิชญ์)

2560

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Hypertonic saline-sodium hydroxide ในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อการเพาะเชื้อ Mycobacteria
ชื่อผู้เขียน	นายอนุกุล บุญคง
ชื่อปริญญา	เทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	เทคนิคการแพทย์ สหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

เชื้อ Mycobacteria ก่อโรคที่สำคัญในคน ได้แก่ เชื้อวัณโรค เกิดจากกลุ่มเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) ซึ่งปัจจุบันยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก นอกจากเชื้อวัณโรคแล้วยังมีเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่น (Nontuberculous mycobacteria: NTM) ที่พบว่ามีโรคก่อโรคในคนเพิ่มมากขึ้น การตรวจหาเชื้อ Acid-fast bacilli (AFB) และการเพาะเชื้อยังคงมีความสำคัญในการวินิจฉัยการติดเชื้อ Mycobacteria ซึ่งการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา Hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) ในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อ Mycobacteria เปรียบเทียบกับวิธีเดิม คือ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH)

ผลการศึกษาตัวอย่างเสมหะส่งตรวจ 427 ตัวอย่าง ในปีงบประมาณ 2559 ที่ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ พบว่าผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB โดยวิธีเตรียมเสมหะโดยตรง และการเตรียมเสมหะแบบเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยผลบวกของวิธีตรวจโดยตรง วิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH เท่ากับร้อยละ 60.66, 68.15 และ 67.92 ตามลำดับ สำหรับผล AFB ของวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH นั้น มีระดับความสอดคล้องของผลที่ยอดเยี่ยม (Percent of agreement=96.96, Kappa=0.96) ในส่วนของผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria ด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ทั้งในอาหารแข็ง Löwenstein-Jensen (L-J)

และอาหารเหลว MGIT 960 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องของผลเพาะเชื้อในอาหารแข็งและอาหารเหลวอยู่ในระดับดี (Percent of agreement=92.27, Kappa=0.59 และ Percent of agreement=87.59, Kappa=0.45 ตามลำดับ) ในด้านความคงตัวของน้ำยา HS-SH นั้น พบว่าประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH อายุ 1 เดือนให้ผลความสอดคล้องกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ อยู่ในระดับยอดเยี่ยม ทั้งในการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นสำหรับตรวจ AFB และการเพาะเชื้อในอาหาร L-J และ MGIT 960 (Percent of agreement=100.00, 95.00 และ 88.33, Kappa=1.00, 0.90 และ 0.78 ตามลำดับ) สำหรับต้นทุนของน้ำยา HS-SH ที่เตรียมเองนั้น มีราคาอยู่ที่ 0.31 บาทต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งถูกกว่าน้ำยา NALC-NaOH ที่เตรียมเอง 6.5 เท่า

น้ำยา HS-SH มีประสิทธิภาพที่ดีเหมาะสมที่จะนำมาใช้เตรียมเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB และเพาะเชื้อ Mycobacteria โดยสามารถเตรียมและเก็บไว้ใช้ได้นานอย่างน้อย 1 เดือน เป็นการลดภาระงานเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และที่สำคัญคือ มีราคาถูก

คำสำคัญ: เชื้อ Mycobacteria, น้ำยา Hypertonic saline-sodium hydroxide

Thesis Title	EVALUATION OF HYPERTONIC SALINE-SODIUM HYDROXIDE SOLUTION FOR CONCENTRATION OF SPUTUM SAMPLES FOR MYCOBACTERIAL CULTURE
Author	Mr. Anugoon Bunkhong
Degree	Master of Medical Technology
Major Field/Faculty/University	Medical Technology Allied Health Sciences Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Duangnate Pipatsatitpong, Ph.D.
Academic Years	2017

ABSTRACT

The important pathogenic species of mycobacteria is a group of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) that is still a major public health problem in many countries around the world at present. There is not only MTBC but nontuberculous mycobacteria (NTM) can also cause human disease and prevalence is increasing. Acid-fast bacilli (AFB) testing and mycobacterial culture remain the important methods for diagnosis of mycobacterial infection. This study aimed to evaluate hypertonic saline-sodium hydroxide solution (HS-SH) method for concentration of sputum samples for detection of AFB and mycobacterial culture by comparing to conventional N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) method.

There were 427 valid sputa that were sent to tuberculosis laboratory of the Office of Disease Prevention and Control 3rd Nakhon Sawan Province in fiscal year 2016. The results of AFB microscopic examination by direct and concentrated smear, HS-SH and NALC-NaOH, were statistically significant difference ($p < 0.001$). The positive rates of AFB smears by direct, HS-SH and NALC-NaOH methods were 60.66%, 68.15%

and 67.92%, respectively. HS-SH and NALC-NaOH methods represented excellent agreement of AFB testing (Percent of agreement=96.96, Kappa=0.96). Mycobacterial culture results of HS-SH and NALC-NaOH methods on Löwenstein–Jensen (L-J) solid media and MGIT 960 liquid media were no statistically significant difference and they were both good agreement (Percent of agreement=92.27, Kappa=0.59 and Percent of agreement=87.59, Kappa=0.45, respectively). For stability of HS-SH solution, fresh and 1-month-old HS-SH solution showed the excellent agreement for AFB testing and mycobacterial culture on L-J and MGIT 960 media (Percent of agreement=100.00, 95.00 and 88.33, Kappa=1.00, 0.90 and 0.78, respectively). Cost of in-house HS-SH solution was 0.31 baht per test and 6.5-fold cheaper than in-house NALC-NaOH.

Performance of HS-SH solution is good and suitable for concentration of sputum for AFB microscopy and mycobacterial culture. HS-SH working solution is stable for at least 1 month that can reduce workload for laboratory personnel and especially low-cost.

Keywords: Mycobacteria, Hypertonic saline-sodium hydroxide

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา และการชี้แนะที่เป็นประโยชน์จากกรรมการวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วิจิตร วงศ์ล้ำค่า ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสกสรรค์ สโมสรรสุข กรรมการวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงเนตร พิพัฒน์สถิตพงศ์ กรรมการและที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และชี้แนะให้คำปรึกษา ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ทุกท่านในความช่วยเหลือต่างๆ ท้ายที่สุดขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจ

หากผลการศึกษานี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้ศึกษาขอน้อมรับไว้เพื่อปรับปรุง แก้ไขในการศึกษาครั้งต่อไป

นายอนุกุล บุญคง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(9)
สารบัญภาพ	(11)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(12)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 ปัญหาการวิจัย	3
1.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเชื้อ Mycobacteria	4
2.1.1 ชนิดของเชื้อ Mycobacteria ก่อโรคที่สำคัญ	4
2.1.1.1 เชื้อ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (MTBC)	4
2.1.1.2 เชื้อ Nontuberculous mycobacteria (NTM)	5
2.1.1.3 เชื้อ <i>Mycobacterium leprae</i>	5

2.2 เชื้อ Mycobacteria ก่อโรคปอด	6
2.2.1 วัณโรคปอด	6
2.2.2 เชื้อ NTM ก่อโรคปอด	6
2.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacteria ทางห้องปฏิบัติการ	7
2.3.1 การตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์	7
2.3.1.1 การตรวจเสมหะโดยตรง (Direct smear)	7
2.3.1.2 การตรวจเสมหะแบบเข้มข้น (Concentrated smear)	7
2.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ	8
2.3.3 การตรวจทางอณูชีววิทยา	8
2.4 การย่อยเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนในกระบวนการเพาะเชื้อ	9
 บทที่ 3 วิธีการวิจัย	 14
3.1 รูปแบบงานวิจัย	14
3.2 ตัวอย่างที่ศึกษา	14
3.2.1 ประเภทผู้ป่วย	14
3.2.1.1 Re-treatment	14
3.2.1.2 On-treatment	14
3.2.1.3 Pre-treatment	14
3.2.1.4 New case	14
3.2.2 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง	14
3.2.2.1 เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)	14
3.2.2.2 เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)	15
3.2.3 ขนาดตัวอย่าง	15
3.3 อุปกรณ์ น้ำยาและสารเคมี	16
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	17

3.4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH	17
3.4.1.1 การตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์	18
3.4.1.2 การเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้น (Concentrated smear)	20
และการเพาะเชื้อ (Culture)	
3.4.1.3 การศึกษาความคงตัวของน้ำยา HS-SH	24
3.4.2 การเปรียบเทียบราคาต้นทุนของน้ำยา	24
3.4.3 วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย	25
 บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	 26
4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมหะ	26
4.1.1 ประเภทผู้ป่วย	26
4.1.2 ข้อมูลตัวอย่างเสมหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย	27
4.2 ประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH	30
4.2.1 การตรวจ AFB	30
4.2.2 การเพาะเชื้อ Mycobacteria	35
4.2.3 การเปรียบเทียบผลตรวจ AFB และผลเพาะเชื้อ	43
4.2.4 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ	45
และความถูกต้อง	
4.3 ความคงตัวของน้ำยา HS-SH	47
4.4 ต้นทุนราคาน้ำยา HS-SH	54
4.5 ข้อดีและข้อด้อยของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH	56
 บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	 57
 รายการอ้างอิง	 60
 ประวัติผู้เขียน	 66

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การรายงานผล AFB ตามแนวทางของ WHO/IUATLD grading scale	19
3.2 การเตรียมน้ำยา NALC-NaOH	20
3.3 การเตรียมน้ำยา HS-SH	20
3.4 การรายงานปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง L-J	23
4.1 จำนวนตัวอย่างเสมหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย	26
4.2 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย	27
4.3 ผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์	31
4.4 การเปรียบเทียบวิธีเตรียมเสมหะและผล AFB grading	32
4.5 การเปรียบเทียบวิธีเตรียมเสมหะและผล AFB grading แยกตามประเภทผู้ป่วย	33
4.6 การเปรียบเทียบกับคุณภาพของเสมหะและผลการตรวจ AFB	34
4.7 ผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria บนอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT ด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH	36
4.8 ชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเพาะเชื้อ Positive	37
4.9 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อและวิธีเพาะเชื้อ	38
4.10 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อรวมและวิธีเพาะเชื้อแยกตามประเภทผู้ป่วย	38
4.11 การเปรียบเทียบกับคุณภาพของเสมหะและผลเพาะเชื้อ	39
4.12 การเปรียบเทียบกับคุณภาพของเสมหะและผลเพาะเชื้อ ระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH	41
4.13 ระยะเวลาการตรวจพบเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อ	42
4.14 ค่า Growth Unit ของเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเหลว MGIT	43
4.15 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อรวมและผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB แยกตามประเภทผู้ป่วย	43
4.16 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ และค่าความถูกต้อง ของการตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อ	45
4.17 ผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ระหว่างวิธีตรวจโดยตรง และวิธีเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	48

4.18 การเปรียบเทียบผล AFB grading กับวิธีเตรียมสเมียร์เสมหะด้วยวิธีตรวจโดยตรง และวิธีเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	49
4.19 ผลการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	50
4.20 การเปรียบเทียบวิธีเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	51
4.21 ชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเพาะเชื้อ Positive ที่เพาะด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	51
4.22 ระยะเวลาการตรวจพบเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	52
4.23 ค่า Growth Unit ของเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเหลว MGIT ด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน	53
4.24 ชนิดและราคาของสารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH	54
4.25 ต้นทุนน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ในการเตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร	54
4.26 ต้นทุนน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ที่ใช้ต่อตัวอย่างเสมหะ 1 ตัวอย่าง	55
4.27 เปรียบเทียบข้อดีข้อด้อยของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH	56

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพน้ำยา	24



รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์/คำย่อ	คำเต็ม/คำจำกัดความ
AFB	Acid-fast bacilli
BSC	Biological safety cabinet
HIV	Human immunodeficiency virus
HS-SH	Hypertonic saline-sodium hydroxide
IUATLD	International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
L-J	Löwenstein–Jensen
LPF	Low power field
Max	Maximum
MDR-TB	Multidrug-resistant tuberculosis
Min	Minimum
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
NALC	N-acetyl-L-cysteine
NaOH	Sodium hydroxide
NTM	Nontuberculous mycobacteria
PBS	Phosphate-buffered saline
RCF	Relative centrifugal force
SD	Standard deviation
TB	Tuberculosis
WBC	White blood cell
WHO	World Health Organization

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) มีเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักก่อโรคในคน คือ *Mycobacterium tuberculosis* โดยวัณโรคเป็นโรคติดต่อ ที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากที่สุดเป็นอันดับที่สองรองจากเชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) เชื้อวัณโรคสามารถก่อโรคได้หลายอวัยวะ มีอวัยวะที่สำคัญที่เกิดโรคมากที่สุด คือปอด ซึ่งทำให้เชื้อติดต่อได้ง่ายจากคนสู่คนผ่านอากาศ (Airborne transmission) จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) พบว่าในปี 2558 มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ถึง 10.4 ล้านราย มีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant TB: MDR-TB) รายใหม่ประมาณ 480,000 ราย และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคถึง 1.4 ล้านราย สำหรับประเทศไทยองค์การอนามัยโลกได้จัดให้เป็น 1 ใน 14 ประเทศที่พบปัญหาทั้งวัณโรค วัณโรคดื้อยาหลายขนาน และวัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี (TB/HIV) สูง โดยมีอุบัติการณ์ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 117,000 ราย หรือคิดเป็น 172 รายต่อประชากรแสนคน และมีผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานถึง 2,500 ราย และจะมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคประมาณ 8,400 ราย⁽¹⁾

ปัจจุบันแม้จะมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยเทคนิคใหม่ๆ เช่น เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) ขึ้นมาใช้ แต่เนื่องจากอุปกรณ์และน้ำยาที่ใช้มีราคาแพง อีกทั้งหน่วยงานหลักที่ดูแลงบประมาณด้านสาธารณสุขของประเทศไทย คือ สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช.) ยังไม่มียุทธศาสตร์สนับสนุนค่าตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา⁽²⁾ จึงเป็นข้อจำกัดด้านงบประมาณในการเข้าถึงเทคโนโลยีใหม่นี้ ดังนั้นสำหรับประเทศไทยตามแนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ. 2556 ได้กำหนดให้การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทึบกรด (Acid-fast bacilli: AFB) และการเพาะเชื้อเป็นวิธีการหลักที่ใช้ในห้องปฏิบัติการในประเทศทั้งสำหรับการวินิจฉัยและการติดตามการรักษาวัณโรค⁽³⁾ ข้อดีของการตรวจ AFB คือ ทำได้ง่ายและประหยัด แต่มีความไวที่ต่ำ สามารถเพิ่มความไวโดยใช้เทคนิคการเตรียมสเมียร์เสมหะให้เข้มข้น (Concentrated smear) จะช่วยเพิ่มโอกาสพบเชื้อได้มากขึ้น⁽⁴⁾ ข้อจำกัดอื่นของวิธีนี้คือไม่สามารถบอกการมีชีวิตของเชื้อได้ และไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อวัณโรคกับเชื้อ Nontuberculous mycobacteria (NTM) ซึ่งเป็นเชื้อ Mycobacteria ชนิดอื่นได้ ส่วนการเพาะเชื้อนั้นมีความไวมากกว่าการตรวจสเมียร์ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในตัวอย่างที่มีเชื้อปริมาณน้อยประมาณ 10 ถึง 100 เซลล์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร⁽⁵⁾ และมีข้อดีกว่าวิธีทางอณูชีววิทยา คือ สามารถบ่งบอกการ

มีชีวิตของเชื้อได้ จึงสามารถใช้ตรวจติดตามการรักษาได้ และสามารถเพิ่มจำนวนเชื้อเพื่อนำไปทดสอบความไวต่อยา หรือเพื่อศึกษาลักษณะการแสดงออกของเชื้อ (Phenotype) รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) ได้ด้วยเช่นกัน ทำให้ปัจจุบันการเพาะเชื้อยังคงเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ในการวินิจฉัยวัณโรค และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยและติดตามการรักษาผู้ป่วยวัณโรคกลุ่มต่างๆ อันได้แก่

1. Re-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่กลับเป็นซ้ำ (Relapse) หรือขาดยามากกว่า 2 เดือนแล้วกลับมารักษา (Treatment after default)

2. On-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เสมหะบวก ที่มีผลการตรวจเสมหะยังคงเป็นบวกหลังการรักษา 2 เดือน หรือ 3 เดือน หรือ 5 เดือน

3. Pre-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติสัมผัสกับผู้ป่วยวัณโรคที่อยู่ร่วมกัน (Household MDR-TB contact) หรือผู้ป่วยในเรือนจำที่สงสัยวัณโรค หรือผู้ติดเชื้อเอชไอวี

4. New case ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยรายใหม่ที่ยังไม่ได้เริ่มการรักษา หรือผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยวัณโรค (TB suspect) ซึ่งมีอาการสำคัญของวัณโรค คือ ไอเรื้อรังติดต่อกันนานเกิน 2 สัปดาห์

สำหรับผู้ป่วยสามกลุ่มแรกนั้นถือเป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อวัณโรคดื้อยา ส่วนผู้ป่วยกลุ่ม New case มีความสำคัญในการเฝ้าระวังป้องกันการแพร่เชื้อวัณโรค ซึ่งผู้ป่วยเหล่านี้มีความจำเป็นต้องได้รับการเพาะเชื้อและทดสอบความไวต่อยา ดังนั้นการเพาะเชื้อจึงต้องมีประสิทธิภาพ เพื่อให้การรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องเหมาะสม ช่วยลดการเกิดวัณโรคดื้อยา และสำหรับผู้ป่วยกลุ่ม New case จำเป็นต้องได้รับการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB และอาจต้องส่งเสมหะเพาะเชื้อเพื่อยืนยันการวินิจฉัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่ผลตรวจ AFB เป็นลบ แต่มีอาการเข้าได้กับวัณโรค เพราะถ้าหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาจะสามารถแพร่เชื้อไปยังผู้อื่นได้

เนื่องจากการเพาะเชื้อวัณโรคของงานห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ยังคงพบอัตราการปนเปื้อนเฉลี่ยที่ค่อนข้างสูง แม้จะมีการควบคุมกระบวนการเก็บตัวอย่างและกระบวนการเพาะเชื้อที่ดี ซึ่งสาเหตุหนึ่งที่สำคัญมาจากน้ำยาที่ใช้ย่อยสลายเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนยังขาดประสิทธิภาพที่ดีพอ จำเป็นที่จะต้องมีการใช้น้ำยาย่อยสลายเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เพื่อควบคุมอัตราการปนเปื้อนไม่ให้เกินค่ามาตรฐาน และในขณะเดียวกันน้ำยานั้นต้องมีความเป็นพิษต่อเชื้อวัณโรคที่ต้องการเพาะเลี้ยงน้อยที่สุด เพื่อให้อัตราการเพาะเชื้อเป็นบวกมากขึ้น นอกจากนี้ควรมีราคาถูก และมีกระบวนการเตรียมที่ง่าย เหมาะที่จะนำมาใช้กับห้องปฏิบัติการวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งน้ำยาที่ใช้ยู่ในปัจจุบันคือ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) นั้นยังคงมีความยุ่งยากในการเตรียม และที่สำคัญคือน้ำยา NALC-NaOH เสื่อมสภาพได้ง่ายต้องใช้ให้หมดภายใน 24 ชั่วโมง จึงต้องมีการ

เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกาการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นภาระงานกับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ จึงนำไปสู่ปัญหาวิจัยของการศึกษาในครั้งนี้

1.2 ปัญหาการวิจัย

วิธี Hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ย่อยสลายเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนที่มีการคิดค้นขึ้นมาใหม่เมื่อไม่นานมานี้ จะมีประสิทธิภาพเพียงใด ในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นสำหรับการตรวจ AFB และเพาะเชื้อ Mycobacteria เมื่อนำมาใช้แทนน้ำยาเดิม คือ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) ณ ห้องปฏิบัติการวัดโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์

1.3 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบน้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ AFB ในตัวอย่างเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และในการเพาะเชื้อ Mycobacteria
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย ได้แก่ Re-treatment, On-treatment, Pre-treatment และ New case กับผลการตรวจหาเชื้อ AFB ในตัวอย่างเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และผลการเพาะเชื้อ โดยใช้ น้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเตรียมตัวอย่าง
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของคุณภาพเสมหะกับผลการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และผลการเพาะเชื้อ โดยใช้ น้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเตรียมตัวอย่าง

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเชื้อ Mycobacteria

เชื้อ Mycobacteria เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales อันดับย่อย (Suborder) Corynebacterineae วงศ์ (Family) Mycobacteriaceae สกุล (Genus) Mycobacterium ซึ่งมีมากมายหลายชนิด (Species) เชื้อในสกุลนี้ เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ต้องการออกซิเจน (Aerobic bacteria) ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีแคปซูลและไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก แต่เนื่องจากผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไขมัน Mycolic acid ทำให้ติดสีแกรม (Gram stain) ได้ไม่ดี ต้องย้อมด้วยสีทนกรด (Acid-fast stain) จึงเรียกชื่อเชื้อนี้ว่าแบคทีเรียติดสีทนกรด (Acid-fast bacilli: AFB) ซึ่งสกุล Mycobacterium ทุกชนิดสามารถติดสีทนกรดได้

2.1.1 ชนิดของเชื้อ Mycobacteria ก่อโรคที่สำคัญ

เชื้อ Mycobacteria สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

2.1.1.1 เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC)

เป็นกลุ่มเชื้อวัณโรคที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ประกอบด้วยเชื้อ 8 ชนิด ดังนี้

(1) *M. tuberculosis* เป็นเชื้อหลักที่ก่อโรควัณโรคในคน

(2) *M. bovis* และ *M. bovis* BCG โดย *M. bovis* ก่อวัณโรคในสัตว์จำพวกวัว ควาย และยังสามารถก่อโรคในคนได้ด้วย ส่วน *M. bovis* BCG เป็นสายพันธุ์ของ *M. bovis* ที่ใช้ทำวัคซีน

(3) *M. africanum* พบว่าก่อวัณโรคในคนแอฟริกา และพบมากถึงครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยวัณโรคในแอฟริกาตะวันตก เชื้อนี้แบ่งออกเป็น 2 Subtype คือ Subtype I พบมากในแอฟริกาตะวันตก และ Subtype II พบมากในแอฟริกาตะวันออก⁽⁶⁾

(4) *M. microti* ก่อวัณโรคในสัตว์ฟันแทะ มีรายงานการก่อโรคในคน⁽⁷⁾ แต่พบได้น้อย

(5) *M. caprae* ก่อโรคในสัตว์จำพวกแพะ⁽⁶⁾

(6) *M. pinipedi* พบก่อโรคในแมวน้ำ⁽⁸⁾ และสิงโตทะเล⁽⁹⁾

(7) *M. canettii* ก่อวัณโรคในคน แต่พบได้น้อยมักพบในผู้ป่วยจากแอฟริกาหรือมีประวัติการเดินทางไปแอฟริกา^(6,10)

(8) *M. mungi* ก่อโรคในตัวพังพอนลาย (Banded mongoose) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Mungos mungo*⁽¹¹⁾

2.1.1.2 เชื้อ Nontuberculous mycobacteria (NTM)

เชื้อกลุ่มนี้อาจเรียกในชื่ออื่นว่า Mycobacteria other than tuberculosis (MOTT) หรือ Atypical mycobacteria หรือ Environmental mycobacteria เป็นกลุ่มเชื้อ Mycobacteria ที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติทั้งในดิน ในน้ำ มีจำนวนมากกว่า 125 ชนิด⁽¹²⁾ และสามารถก่อโรคในคนได้ โดยก่อโรคแบบฉวยโอกาส (Opportunistic pathogen) ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี หรือผู้ที่มีความผิดปกติทางด้านภูมิคุ้มกัน (Immunocompromised host) อีกทั้งยังสามารถก่อโรคในผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวีด้วย ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการแพร่เชื้อของ NTM จากคนสู่คน สำหรับความชุกและอุบัติการณ์ของเชื้อ NTM นั้นมีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ แต่พบว่ามี การติดเชื้อ NTM เพิ่มขึ้นทั่วโลก⁽¹³⁾

เชื้อ NTM สามารถแบ่งตามแบบของ Runyon (Runyon classification) ออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยอาศัยระยะเวลาในการเจริญเติบโต (Growth rate) บนอาหารแข็ง และการสร้างสารสี (Pigment) เมื่อได้รับแสงและไม่ได้รับแสง ได้ดังนี้

(1) Group I หรือ Photochromogens เป็นกลุ่มเชื้อ NTM ที่เจริญจนมองเห็นโคโลนีได้ใช้เวลานานกว่า 7 วัน และสร้างสารสีเหลืองส้มเมื่อได้รับแสง เช่น *M. kansasii* และ *M. marinum* เป็นต้น

(2) Group II หรือ Scotochromogens เป็นกลุ่มเชื้อ NTM ที่เจริญจนมองเห็นโคโลนีได้ใช้เวลานานกว่า 7 วัน และสร้างสารสีเหลืองส้มได้ทั้งที่มีแสงและไม่มีแสง เช่น *M. scrofulaceum* และ *M. goodii* เป็นต้น

(3) Group III หรือ Nonphotochromogens เป็นกลุ่มเชื้อ NTM ที่เจริญจนมองเห็นโคโลนีได้ใช้เวลานานกว่า 7 วัน และไม่สร้างสารสี แต่อาจมองเห็นโคโลนีมีสีเหลืองอ่อนๆ เช่น *M. avium* และ *M. intracellulare* ซึ่งทั้งสองสปีชีส์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเรียกว่า *M. avium* complex (MAC) เป็นเชื้อ NTM ที่สามารถก่อโรคในคน พบได้บ่อยในผู้ป่วยติดเชื้อ NTM

(4) Group IV หรือ Rapid grower เป็นกลุ่มเชื้อ NTM ที่เจริญจนมองเห็นโคโลนีได้เร็วกว่า 7 วัน และไม่สร้างสารสี เช่น *M. fortuitum*, *M. abscessus* และ *M. chelonae* เป็นต้น

2.1.1.3 เชื้อ *Mycobacterium leprae*

เป็นเชื้อสาเหตุของโรคเรื้อน (Leprosy) หรือโรคแฮนเซน (Hansen's disease) เชื้อนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ต้องเพาะเลี้ยงในสัตว์ทดลอง เช่น เพาะใน

อั้งเท้าหนู (Mouse foot-pad technique)⁽¹⁴⁾ เชื้อใช้เวลาในการแบ่งเซลล์โดยใช้เวลาประมาณ 7 ถึง 14 วัน⁽¹⁵⁾ เชื้อ *M. leprae* สามารถติดต่อกับคนได้โดยการสัมผัสกับผู้ป่วยเป็นเวลานาน

2.2 เชื้อ Mycobacteria ก่อโรคปอด

2.2.1 วัณโรคปอด

วัณโรคที่เกิดมากที่สุดคือวัณโรคปอด (Pulmonary tuberculosis) โดยพบประมาณร้อยละ 85 ของวัณโรคทั้งหมด⁽⁵⁾ มีช่องทางการติดต่อหลักผ่านทางหายใจ โดยเชื้อแพร่จากผู้ป่วยสู่คนอื่นผ่านทางละอองฝอยขนาดเล็ก (Droplet nuclei) มีขนาดประมาณ 1-5 ไมครอนเมตร ซึ่งมีเชื้อประมาณ 1-3 เซลล์ โดยเกิดจากการไอ จาม ของผู้ป่วย ละอองฝอยเหล่านี้ถูกสูดหายใจเข้าไป โดยคนที่อยู่ใกล้กับผู้ป่วยและตกลงไปจนถึงถุงลม เชื้อจะถูกจับกินโดยเซลล์ Macrophage หากระบบภูมิคุ้มกันไม่ดี หรือเชื้อเป็นสายพันธุ์รุนแรง (Virulent strain) จะทำให้เซลล์ Macrophage กำจัดเชื้อได้ไม่หมด เชื้อจะทำการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในเซลล์ Macrophage ภายในระยะเวลาประมาณ 2 ถึง 12 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ ทำให้ผู้ป่วยเป็นวัณโรคเรียกว่าวัณโรคปฐมภูมิ (Primary tuberculosis) มักพบในเด็กหรือผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำ ปกติแล้วมีเพียงร้อยละ 10 ของผู้ติดเชื้อวัณโรคเท่านั้นที่จะป่วยเป็นวัณโรค โดยครึ่งหนึ่ง (ร้อยละ 5) จะป่วยเป็นวัณโรคภายใน 2 ปีหลังรับเชื้อ อีกประมาณร้อยละ 90 ที่ได้รับเชื้อจะไม่มีอาการป่วยแต่บางรายอาจเป็นวัณโรคแฝง (Latent TB infection: LTBI) เป็นเพราะผู้ติดเชื้อมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้หมด เพียงแต่ควบคุมเชื้อไม่ให้ก่อโรคเท่านั้น ซึ่งเชื้อจะอาศัยอยู่ในเซลล์ Macrophage โดยไม่แบ่งตัวและมีกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ที่ต่ำ เป็นเชื้อที่อยู่ในระยะพัก (Dormant state) ทำให้เชื้ออยู่ในร่างกายได้หลายปี เมื่อเวลาผ่านไปร่างกายอ่อนแอ ระบบภูมิคุ้มกันไม่แข็งแรง เชื้อจะเพิ่มจำนวนก่อพยาธิสภาพในเนื้อปอดส่วนบน เรียกว่า วัณโรคทุติยภูมิ (Secondary tuberculosis) ซึ่งเป็นลักษณะของวัณโรคในผู้ป่วยส่วนใหญ่ ผู้ป่วยวัณโรคที่ไม่ได้รับการรักษาร้อยละ 50 จะเสียชีวิตภายใน 2 ปี⁽³⁾ เชื้อวัณโรคสามารถแพร่ไปตามท่อน้ำเหลืองเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตไปก่อโรคที่อวัยวะต่างๆ ได้ เช่น เยื่อหุ้มปอด ต่อม้ำเหลือง ไต สมอง กระดูก เป็นต้น ซึ่งเรียกววัณโรคที่เกิดนอกปอดเหล่านี้ว่า วัณโรคนอกปอด (Extrapulmonary tuberculosis)

2.2.2 เชื้อ NTM ก่อโรคปอด

การติดเชื้อ NTM ทางปอดมีลักษณะคล้ายคลึงกับการติดเชื้อวัณโรค เพียงแต่แหล่งแพร่เชื้อของ NTM ไม่ใช่คน เพราะยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ NTM จากคนสู่คน ช่องทางการติดเชื้อผ่านทางละอองฝอยเข้าสู่ระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากเชื้อเหล่านี้อยู่ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปทั้งในน้ำ

และดิน เมื่อเชื้อเข้าสู่ถุงลมจะถูกจับกินโดยเซลล์ Macrophage ซึ่งจะทำให้เซลล์ Macrophage สร้าง Interleukin-12 (IL-12) เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการสร้าง Interferon- γ (IFN- γ) เพิ่มขึ้น ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาว Neutrophil และ Macrophage มากำจัดเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ แต่ถ้าหากระบบภูมิคุ้มกันมีความผิดปกติ เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี หรือความผิดปกติด้านอื่นแล้วทำให้ระบบการทำงานของ IL-12 และ IFN- γ ต้อยประสิทธิภาพลง จะทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อ NTM ได้ และทำให้เกิดโรคขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบอีกว่า NTM สามารถก่อโรคได้ในผู้ป่วยที่ไม่ใช่ผู้ติดเชื้อเอชไอวี โดยผู้ป่วยที่พบได้บ่อยมักเป็นผู้ที่มีความผิดปกติที่ปอด^(12,16) เช่น ผู้ป่วยโรค Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), Bronchiectasis, Cystic fibrosis, Pneumoconiosis หรือแม้แต่ผู้ที่เคยป่วยเป็นวัณโรคมาก่อน โดยเชื้อ NTM ที่พบได้บ่อยว่าก่อโรคในปอด⁽¹⁷⁾ เช่น *M. avium* complex, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. malmoense* และ *M. xenopi* เป็นต้น

2.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อ Mycobacteria ทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากการติดเชื้อวัณโรคและเชื้อ NTM ที่ปอด มักมีลักษณะอาการทางคลินิกและผลภาพรังสีทรวงอกที่คล้ายคลึงกัน อีกทั้งมีความคล้ายคลึงกับโรคอื่นด้วย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันเชื้อก่อโรค

2.3.1 การตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์

เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ให้ผลเร็ว ทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป สามารถใช้ตรวจตัวอย่างได้หลากหลายประเภท และเป็นวิธีหลักที่ใช้วินิจฉัยวัณโรคปอดในประเทศไทย โดยให้ผู้ป่วยที่มีอาการเข้าได้กับวัณโรคเก็บเสมหะส่งตรวจอย่างน้อย 2 ตัวอย่าง และต้องเป็นเสมหะที่เก็บทันทีเมื่อตื่นนอนตอนเช้า (Early morning sputum) อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องมีจำนวนเชื้ออย่างน้อย 5,000 ถึง 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จึงจะมีโอกาสตรวจพบเชื้อ ไม่สามารถแยกเชื้อที่ตายแล้วและเชื้อที่มีชีวิตได้ และที่สำคัญ คือ ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเชื้อวัณโรคและเชื้อ NTM ได้ ดังนั้นในความเป็นจริงแล้ว วิธีนี้อาจจะเรียกได้ว่าเป็นการทดสอบเบื้องต้นของการพิสูจน์ชนิดเชื้อ Mycobacteria เท่านั้น สำหรับขั้นตอนการเตรียมเสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB ทำได้ 2 แบบ ได้แก่

2.3.1.1 การตรวจเสมหะโดยตรง (Direct smear) เป็นการสเมียร์เสมหะลงบนกระจกสไลด์โดยตรง เป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมใช้ เพราะง่ายและรวดเร็ว

2.3.1.2 การตรวจเสมหะแบบเข้มข้น (Concentrated smear) เป็นวิธีที่ต้องเตรียมเสมหะให้เข้มข้นด้วยการตกตะกอน โดยนำเสมหะมาผสมกับสารเคมีที่มีฤทธิ์สลายเมือก แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อเอาเฉพาะตะกอนมาป้ายบนกระจกสไลด์ วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้ใน

ห้องปฏิบัติการทั่วไปเนื่องจากมีความยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้องมีเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเสมหะ ซึ่งต้องมีแรงปั่นอย่างน้อย 3,000g (Relative centrifugal force: RCF) จึงจะทำให้เชื้อตกตะกอนได้ ร้อยละ 95⁽¹⁸⁾ แต่มีข้อดีคือมีโอกาสพบเชื้อได้มากกว่าวิธีตรวจเสมหะโดยตรง⁽¹⁹⁾ วิธีนี้นิยมใช้ใน ห้องปฏิบัติการวัณโรคที่มีการเพาะเชื้อร่วมด้วย

2.3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เป็นวิธีการที่มีความไวกว่าการตรวจเสมหะ มีข้อดี คือ สามารถตรวจพบเชื้อได้แม้มี ปริมาณน้อย 10 ถึง 100 เซลล์ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร สามารถแยกเชื้อที่ตายแล้วและมีชีวิตได้ จึงเหมาะสำหรับใช้ติดตามการรักษา และเชื้อ Mycobacteria ที่เพาะได้สามารถนำไปทดสอบแยก ชนิดต่อได้ ดังนั้นวิธีนี้ในปัจจุบันยังคงถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) แต่อย่างไรก็ตามการ เพาะเชื้อนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ และใช้เวลานานกว่าการตรวจ AFB เนื่องจากต้องมีกระบวนการเตรียมตัวอย่างเสมหะสำหรับเพาะเชื้อด้วย ที่สำคัญต้องทำใน ห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosafety level 3) และผลการเพาะ เชื้ออาจมีปัญหาการปนเปื้อน (Contamination) สำหรับอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ อาหารแข็ง (Solid media) เช่น Löwenstein–Jensen (L-J) media, Ogawa media, Middlebrook 7H10 และ Middlebrook 7H11 เป็นต้น และอาหารเหลว (Liquid media หรือ Broth) เช่น Middlebrook 7H9 และ Middlebrook 7H12 เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติโดยใช้อาหารเหลว (Automated liquid culture) ซึ่งให้ผลเพาะเชื้อเร็วกว่าการเพาะเชื้อบนอาหารแข็งและเพิ่มจำนวนการพบเชื้อได้ มากกว่าอาหารแข็งประมาณร้อยละ 10⁽²⁰⁾ อาทิเช่น เครื่อง BACTEC MGIT 960 ซึ่งใช้อาหารเหลว Modified Middlebrook 7H9 ผสมกับอาหารเสริม (Supplement) ของเชื้อ ได้แก่ Oleic acid, Albumin, Dextrose และ Catalase (OADC) ในการเพาะเชื้อ ช่วยลดระยะเวลาการตรวจพบเชื้อได้ เร็วกว่าอาหารแข็งเล็กน้อย โดยหลักการของเครื่อง BACTEC MGIT 960 นั้น ใช้ออกซิเจนติดกับสารเรืองแสง (Oxygen-quenched fluorochrome) เคลือบไว้ที่ก้นหลอด ออกซิเจนจะยับยั้งการเรืองแสงของสารเรืองแสง เมื่อมีเชื้อเจริญออกซิเจนจะถูกใช้ไป ทำให้สารเรืองแสงเกิดเรืองแสงขึ้น ซึ่งเครื่องจะรายงานผลเป็นบวก (Positive) โดยเครื่องจะตรวจจับการเรืองแสงที่เกิดขึ้นทุกๆ 60 นาที

2.3.3 การตรวจทางอณูชีววิทยา

เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) มีความไวความจำเพาะสูง ใช้หลักการสกัด และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ Deoxyribonucleic acid (DNA) ที่จำเพาะกับเชื้อ Mycobacteria โดยส่วนใหญ่อาศัยหลักการ Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งปัจจุบันได้ถูก พัฒนาให้สามารถอ่านผลได้ขณะทดสอบ และสะดวกในใช้งาน ดังเช่น วิธี Real-time PCR ซึ่งสามารถใช้ตรวจแยกระหว่างเชื้อวัณโรคและเชื้อ NTM จากตัวอย่างเสมหะได้ แต่เนื่องจากวิธีนี้เป็น

การใช้เทคโนโลยีขั้นสูง ต้องมีใช้เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญ อีกทั้งอุปกรณ์และน้ำยาตรวจมีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมกับการตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2.4 การย่อยเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนในกระบวนการเพาะเชื้อ

เนื่องจากเชื้อวัณโรคใช้เวลาแบ่งตัว (Generation time) นานประมาณ 12 ถึง 24 ชั่วโมง⁽¹⁵⁾ เช่นเดียวกันเชื้อ NTM ก่อโรคส่วนใหญ่ อาทิเช่น เชื้อ *M. avium* complex ซึ่งเป็นเชื้อเจริญช้า (Slow grower) เช่นเดียวกัน โดยเจริญหลังเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง 7 วัน ขึ้นไป ทำให้การเพาะเชื้อจำเป็นต้องกำจัดเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่างก่อน โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อนได้ง่าย ดังเช่น ตัวอย่างเสมหะ (Sputum) มิเช่นนั้นจะทำให้เชื้อปนเปื้อน ซึ่งส่วนใหญ่เจริญเร็วเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อวัณโรคส่งผลให้ไม่สามารถอ่านผลและแปลผลการเพาะเชื้อได้ ทั้งนี้เป็นเพราะในตัวอย่างเพาะเชื้อที่เป็นเสมหะนั้นมีเมือก (Mucus) อยู่เป็นจำนวนมากโดยองค์ประกอบหลักของเมือกคือ Mucin หรือ Mucin glycoprotein สร้างจากเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelium) ซึ่งมีหน้าที่สร้างเมือกพบว่ายีนที่สร้าง Mucin มีอยู่ด้วยกันหลายยีน เช่น ในทางเดินหายใจส่วนล่างพบยีนสร้าง Mucin อย่างน้อย 12 ยีน⁽²¹⁾ โดย Mucin นี้มีลักษณะเป็นเส้นสายเชื่อมต่อกันเป็นโครงร่างตาข่ายด้วยพันธะ Noncovalent ได้แก่ พันธะ Ionic, พันธะ Hydrogen และแรง Van der Waals การเกิดเมือกนั้นเกิดได้จากหลายสาเหตุ โดยอาจเกิดจากโรคต่างๆ ที่ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวมีการหลั่งเมือกมากผิดปกติหรือกลไกการกำจัดเมือกผิดปกติไป เช่น Asthma, Chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), Cystic fibrosis (CF) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากระบบทางเดินหายใจเกิดการอักเสบ หรือมีการติดเชื้อต่างๆ ซึ่งรวมถึงการติดเชื้อ Mycobacteria ด้วย โดยในเสมหะที่เกิดจากการติดเชืื่อนั้นนอกจากเมือกแล้วยังมีเซลล์เม็ดเลือดขาว Neutrophil ซึ่งทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคปนออกมา มีบางส่วนได้ตายลง และหลั่งสารต่างๆ ออกจากเซลล์เพื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอื่นให้ออกมายังตำแหน่งที่ติดเชื้อมากขึ้น และสารที่หลั่งออกมายังส่งผลให้เซลล์เยื่อบุผิวบริเวณนั้นเสียหาย นอกจากนี้เซลล์ที่ตายลงจะมีการปลดปล่อย Deoxyribonucleic acid (DNA) และ Filamentous actin (F-actin) ออกมาซึ่งจะรวมกันเป็น Polymer เกิด Rigid network ขึ้นอุดกั้นทางเดินหายใจสำหรับสีของเสมหะนั้นเกิดจากผลของเอนไซม์ Myeloperoxidase ของเม็ดเลือดขาว หากมีการติดเชื้อจำนวนมากเสมหะจะมีสีเหลืองเข้ม เขียว หรือน้ำตาล ลักษณะเป็นหนอง (Purulent)⁽²²⁾ ซึ่งเสมหะเองก็เป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียด้วย เนื่องจากมีเมือกเหนียวดักจับแบคทีเรีย และมีสารที่เป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้⁽²³⁾ จึงพบแบคทีเรียได้หลายชนิดในเสมหะ จากการศึกษาของ Cukic⁽²⁴⁾ พบว่าเชื้อแบคทีเรียในเสมหะของ

ผู้ป่วย COPD ส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ที่ไม่ก่อโรค และสามารถพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ ได้ด้วยเช่นกัน

สำหรับการปนเปื้อน (Contamination) ในการเพาะเชื้อวัณโรคนั้นยังคงเป็นปัญหาสำคัญของห้องปฏิบัติการ ทั้งในการเพาะเชื้อด้วยอาหารแข็งและโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเหลวที่มีอัตราการปนเปื้อนเกิดสูงเกินร้อยละ 10^(25,26) แม้จะใช้วิธีการเพาะเชื้อมาตรฐานโดยใช้น้ำยา N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH) ย่อยสลายเมือกและกำจัดเชื้อปนเปื้อนในเสมหะตามมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกและศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค ประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) แนะนำก็ตาม^(18,27) หรือแม้จะมีการควบคุมกระบวนการเก็บตัวอย่างเสมหะที่ดีโดยเจ้าหน้าที่และช่วยลดอัตราการปนเปื้อนลงได้แต่อย่างไรก็ตามยังคงพบการปนเปื้อนที่สูงถึงร้อยละ 13⁽²⁸⁾ ซึ่งตามมาตรฐานการควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อวัณโรคขององค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ควรมีอัตราการปนเปื้อนอยู่ในช่วงร้อยละ 2 ถึง 5 สำหรับอาหารแข็ง⁽²⁷⁾ ดังนั้นในการลดการปนเปื้อนในขั้นตอนการเพาะเชื้อ ปัจจัยสำคัญที่สุดประการหนึ่ง คือ น้ำยาที่ใช้ย่อยสลายเมือกและกำจัดเชื้อปนเปื้อนในเสมหะที่มีประสิทธิภาพ เพราะนอกจากจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อแล้ว น้ำยาที่ดีควรจะเป็นพิษกับเชื้อวัณโรคน้อย ซึ่งจะทำให้ผลเพาะเชื้อมีอัตราพบเชื้อเจริญหรือมีผลบวกที่สูง และเชื้อวัณโรคเองสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถนำตัวอย่างที่ย่อยสลายเมือกและทำให้เข้มข้น (Concentrated smear) ไปตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อได้มากกว่าการตรวจเสมหะโดยตรง (Direct smear)

วิธีลดการปนเปื้อนนอกจากวิธี NALC-NaOH ยังสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Cetyl pyridinium chloride, 5% Oxalic acid, 4% Sulphuric acid และ 4% NaOH เป็นต้น⁽¹⁸⁾ วิธีที่ใช้ Cetyl pyridinium chloride ซึ่งเป็นสารประกอบ Quaternary ammonia เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีโดยเฉพาะเมื่อใช้เก็บรักษาตัวอย่างเสมหะไว้นานหลายวัน⁽²⁹⁾ แต่พบว่าเกิดผลลบปลอมได้หากเพาะเชื้อในอาหารเหลวด้วยเครื่องอัตโนมัติ MGIT 960 system (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA)⁽³⁰⁾ ส่วนวิธี 5% Oxalic acid และ 4% Sulphuric acid นั้นพบว่ามีอัตราการปนเปื้อนสูงกว่าร้อยละ 10 ในอาหารแข็ง L-J และอัตราผลบวกของการเพาะเชื้อในตัวอย่างเสมหะค่อนข้างต่ำ⁽³¹⁾ สำหรับวิธี 4% NaOH นั้นเป็นวิธีที่ต้องควบคุมเวลาและกระบวนการอย่างเข้มงวดเนื่องจาก NaOH ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 นั้นนอกจากจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อปนเปื้อนแล้วยังสามารถฆ่าเชื้อวัณโรคได้ด้วย โดยพบว่าวิธีนี้อาจทำให้เชื้อวัณโรคตายได้สูงถึงร้อยละ 73⁽¹⁸⁾ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาคิดค้นน้ำยาย่อยเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อนสำหรับเพาะเชื้อวัณโรคเพื่อให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น

ปี ค.ศ. 2007 Ricaldi และคณะ⁽³²⁾ ได้พัฒนาวิธีการเพาะเชื้อวัณโรคโดยใช้ Hypertonic saline (HS) ในการย่อยสลายเสมหะ ร่วมกับ Sodium hydroxide (SH) เพื่อช่วยกำจัดเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่าง โดยได้แนวคิดมาจากการสังเกตการใช้ Hypertonic saline ขจัดเสมหะเพื่อรักษาอาการของโรค Cystic fibrosis (CF) ซึ่งเป็นโรคพันธุกรรมเกิดความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผิว (Epithelial cell) ไม่สามารถควบคุมปริมาณ Chloride ที่ผ่านเข้าออกเซลล์ได้ จึงเกิดเมือกหนาตัวเหนียว และเกาะติดแน่นที่ทางเดินหายใจ โดย Hypertonic saline นั้นแม้ไม่ใช่สารที่ใช้ย่อยสลายเสมหะ (Mucolytic agent) แต่ก็มีคุณสมบัติในการทำลายพันธะ Ionic ในเมือก⁽³³⁾ และอาจมีส่วนช่วยแยก DNA ออกจากเมือก⁽²¹⁾ ทำให้ลดความเหนียวของเสมหะลงได้ จึงถูกนำมาใช้ในกระบวนการกำจัดเสมหะที่อุดตันทางเดินหายใจของผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากคุณสมบัติของ HS จึงถูกนำมาใช้ในกระบวนการเพาะเชื้อวัณโรค และพบว่าลดการปนเปื้อนได้ดีกว่าวิธีมาตรฐาน NALC-NaOH

ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้วิธี Hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) กับวิธี NALC-NaOH ในการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อวัณโรค โดยใช้ HS เข้มข้นร้อยละ 7.00 (ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2.33) พบว่าวิธี HS-SH มีความไวกว่าการตรวจเชื้อ AFB จากเสมหะโดยตรง สำหรับการเพาะเชื้อซึ่งทำในอาหารแข็ง L-J พบว่ามีอัตราการปนเปื้อนต่ำกว่าวิธี NALC-NaOH และพบว่ามีค่าไว (Sensitivity) และประสิทธิภาพ (Efficiency) สูงถึงร้อยละ 95.00 และ 99.00 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าวิธี NALC-NaOH ที่ได้ค่าร้อยละ 76.00 และ 95.00 ตามลำดับ และในปีเดียวกันนี้ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้วิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH ในการเพาะเชื้อวัณโรค โดยใช้ HS เข้มข้นร้อยละ 7.00 (ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2.55) พบว่าวิธี HS-SH ลดการอัตราการปนเปื้อนได้มากกว่าวิธี NALC-NaOH ทั้งในอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT 960 โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการปนเปื้อนในตัวอย่างที่ผล AFB เป็นบวก (P-value = 0.008) และพบว่าค่าพยากรณ์ผลบวก (Positive predictive value) ของวิธี HS-SH สูงกว่าวิธี NALC-NaOH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.001) และราคาต้นทุนน้ำยา HS-SH น้อยกว่าน้ำยา NALC-NaOH ประมาณ 4 เท่า

เมื่อไม่นานมานี้ ในปี ค.ศ. 2013 Chaudhary และคณะ⁽³⁶⁾ ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้วิธี HS-SH กับวิธี Modified Petroff โดยใช้ HS เข้มข้นร้อยละ 7.00 (ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 2.33) พบว่าวิธี HS-SH มีอัตราผลการเพาะเชื้อที่เป็นบวกร้อยละ 84.00 ซึ่งสูงกว่าวิธี Modified Petroff ที่ให้ผลบวกร้อยละ 70.00 และอัตราการปนเปื้อนของวิธี HS-SH ต่ำกว่าวิธี Modified Petroff อยู่ร้อยละ 2.00 ทั้งนี้ความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentration) ของน้ำยา NaOH ในวิธี

HS-SH หลังผสมกับตัวอย่างเสมหะเท่ากับร้อยละ 1.33 ขณะที่ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำยา NaOH วิธี Modified Petroff เท่ากับร้อยละ 2.00 ซึ่งเข้มข้นกว่าวิธี HS-SH ถึง 1.5 เท่า แต่กลับมีอัตราการปนเปื้อนสูงกว่าวิธี HS-SH จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่ช่วยยืนยันว่า Hypertonic saline มีส่วนสำคัญในการช่วยกำจัดเชื้อปนเปื้อนในตัวอย่างเสมหะ และในปี ค.ศ. 2016 Someshwaran และคณะ⁽³⁷⁾ ได้ประเมินประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ AFB จากเสมหะเสมหะเข้มข้นที่เตรียมด้วยวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH จำนวน 143 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง

สำหรับงานห้องปฏิบัติการวินิจฉัย สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ นั้น พบว่ามีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนในการเพาะเชื้อวัณโรคค่อนข้างสูง โดยในปีงบประมาณ 2557 พบอัตราการปนเปื้อนของการเพาะเชื้อในอาหารเหลวเท่ากับร้อยละ 12.32 และในอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 14.64 ต่อมาในปีงบประมาณ 2558 พบว่าการปนเปื้อนในอาหารแข็งเท่ากับร้อยละ 14.64 และในอาหารเหลวเท่ากับร้อยละ 23.28 โดยมีอัตราการปนเปื้อนเฉลี่ยของแต่ละปีเท่ากับร้อยละ 13.48 และ 18.90 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยทั้งสองปีเท่ากับร้อยละ 16.19 แม้ว่าทางห้องปฏิบัติการวัณโรค จะได้มีการควบคุมคุณภาพในกระบวนการเพาะเชื้อ โดยในขั้นตอนก่อนการตรวจวิเคราะห์นั้น ได้จัดทำคู่มือแนวทางการเก็บเสมหะ และการส่งตรวจที่เหมาะสมส่งให้กับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกโรงพยาบาลในพื้นที่รับผิดชอบในช่วงปลายปีงบประมาณ 2556 เพื่อควบคุมกระบวนการเก็บเสมหะ ก่อนการวิเคราะห์ ให้เหมาะสม อีกทั้งมีเกณฑ์รับและปฏิเสธส่งตรวจที่ไม่เหมาะสม ส่วนการควบคุมคุณภาพในขั้นตอนการวิเคราะห์นั้นได้มีการทำ Positive control ซึ่งใช้ตัวอย่างเชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv เจือจางด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) pH 6.8 และ Negative control ซึ่งใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำควบคุมไปกับการเพาะเชื้อจากตัวอย่างเสมหะ โดยไม่พบการปนเปื้อนในส่วนของการ Control แสดงให้เห็นว่าในส่วนของการบุคลากรและอุปกรณ์เครื่องมือมีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้อัตราการปนเปื้อนก็ยังไม่ลดลง นอกจากนี้จากวิเคราะห์ผลการประเมินคุณภาพเสมหะตามแนวทางการประกันคุณภาพการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ของโรงพยาบาลรัฐในเขตพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ประจำปีงบประมาณ 2557 นั้น พบว่าโรงพยาบาลจำนวน 42 แห่งที่มีการสุ่มเก็บสไลด์ AFB เพื่อประกันคุณภาพมีค่าเฉลี่ยของตัวอย่างเสมหะที่มีคุณภาพดีเท่ากับร้อยละ 56.2 แสดงให้เห็นว่าคุณภาพเสมหะที่ให้ผู้ป่วยเก็บนั้นเกือบครึ่งหนึ่ง (ร้อยละ 43.8) เป็นตัวอย่างที่ไม่มีคุณภาพ ซึ่งอาจส่งผลต่อการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อด้วยเช่นกัน

จากข้อมูลการศึกษาที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่ากระบวนการเพาะเชื้อวัณโรคยังมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อน และพบว่าน้ำยา Hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) สามารถนำมาใช้ย่อยสลายและกำจัดเชื้อปนเปื้อน ช่วยลดอัตราการปนเปื้อนและเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อสำหรับ

การเพาะเชื้อวัณโรคได้ดี แต่กลับมีการศึกษาวิจัยน้อยมาก ทำให้ยังไม่มีหรือนำมาใช้อย่างแพร่หลายเหมือนวิธี NALC-NaOH และที่สำคัญคือในประเทศไทยยังไม่มีหรือนำวิธีนี้มาใช้เพราะยังคงยึดตามวิธีมาตรฐาน จึงนำมาสู่ความจำเป็นและความสนใจของผู้วิจัยที่จะทำการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH นี้ ทั้งประสิทธิภาพในการเพาะเชื้อวัณโรค รวมทั้งประสิทธิภาพในการเพิ่มความไวของการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สำหรับการเพาะเชื้อวัณโรคนั้น ถ้าหากไม่สามารถลดอัตราการปนเปื้อนได้จะส่งผลเสียโดยตรงต่อการวินิจฉัย และดูแลรักษาผู้ป่วย หากได้ทำการศึกษาวิจัยนี้แล้วจะได้วิธีการใหม่ในการเพาะเชื้อวัณโรคสำหรับห้องปฏิบัติการวัณโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพเกิดผลดีต่อผู้ป่วยวัณโรค



บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 รูปแบบงานวิจัย

งานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental study)

3.2 ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ ตัวอย่างเสมหะที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำของงานห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ในปีงบประมาณ 2559 โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม ตามประเภทผู้ป่วย

3.2.1 ประเภทผู้ป่วย

3.2.1.1 Re-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคที่กลับเป็นซ้ำ (Relapse) หรือขาดยามากกว่า 2 เดือนแล้วกลับมารักษา (Treatment after default)

3.2.1.2 On-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เสมหะบวก ที่มีผลการตรวจเสมหะยังคงเป็นบวกหลังการรักษา 2 หรือ 3 เดือน หรือ 5 เดือน

3.2.1.3 Pre-treatment ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยที่มีประวัติสัมผัสกับผู้ป่วยวัณโรคที่อยู่ร่วมบ้าน (Household MDR-TB contact) หรือผู้ป่วยในเรือนจำที่สงสัยวัณโรค หรือผู้ติดเชื้อเอชไอวี

3.2.1.4 New case ผู้ป่วยวัณโรคเสมหะบวกรายใหม่ที่ยังไม่ได้เริ่มการรักษาหรือผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยวัณโรค (TB suspect) โดยไม่เคยมีประวัติเป็นวัณโรค ซึ่งมีอาการสำคัญของวัณโรค คือ ไอเรื้อรังติดต่อกันนานเกิน 2 สัปดาห์

3.2.2 เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง

3.2.2.1 เกณฑ์คัดเข้า (Inclusion criteria)

ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วย 4 กลุ่ม ได้แก่ Re-treatment, On-treatment, Pre-treatment และ New case ของโรงพยาบาลในพื้นที่รับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ที่ส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรค ณ งานห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งดูแลรับผิดชอบพื้นที่ 5 จังหวัด ได้แก่ นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท กำแพงเพชร และพิจิตร

3.2.2.2 เกณฑ์คัดออก (Exclusion criteria)

- ตัวอย่างที่เก็บไว้นานเกิน 7 วัน
- ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยกว่า 2 มิลลิลิตร
- ตัวอย่างปนเปื้อนเชื้อรา
- ตัวอย่างผู้ป่วยซ้ำราย

3.2.3 ขนาดตัวอย่าง

การคำนวณขนาดตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาใช้ค่าเฉลี่ยอัตราผลการเพาะเชื้อเป็นบวก ในปีงบประมาณ 2557 และ 2558 ของงานห้องปฏิบัติการวินิจฉัยสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ เท่ากับร้อยละ 36 ($P=0.36$)

จากสูตร
$$N = \frac{Z_{\alpha/2}^2 PQ}{d^2}$$

กำหนดให้ $\alpha = 0.05$ ดังนั้น $Z_{\alpha/2} = 1.96$

$$P = 0.36$$

$$Q = 1 - P = 1 - 0.36 = 0.64$$

$$d = 0.05$$

แทนค่า
$$N = \frac{(1.96)^2 (0.36)(0.64)}{(0.05)^2}$$

$$N = 354.04$$

$$N \approx 355$$

สรุป ขนาดตัวอย่างที่ใช้ประมาณ 355 ตัวอย่าง

3.3 อุปกรณ์ น้ำยาและสารเคมี

- 3.3.1 BBL MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT media)
- 3.3.2 BACTEC™ MGIT™ 960 Growth Supplement Kit
- 3.3.3 Löwenstein–Jensen (L-J) media
- 3.3.4 น้ำยา NALC-NaOH
- 3.3.5 น้ำยา HS-SH
- 3.3.6 ชุดทดสอบ SD Bioline TB Ag MPT64 rapid test
- 3.3.7 ชุดสีย้อม AFB วิธี Ziehl-Neelsen
- 3.3.8 Phosphate-buffered saline 0.067 M pH 6.8
- 3.3.9 Disposable transfer plastic pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 3.3.10 แอลกอฮอล์เข้มข้น 70%
- 3.3.11 สไลด์ขอบฟ้า
- 3.3.12 ถังร้อน ขนาด 10 x 15 นิ้ว
- 3.3.13 สำลีม้วน
- 3.3.14 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile distilled water)
- 3.3.15 น้ำยาฆ่าเชื้อวัณโรค Peracetic acid
- 3.3.16 เสื่อกาว
- 3.3.17 หน้ากาก N95
- 3.3.18 หมวกคลุมผม
- 3.3.19 ถังมือยาง
- 3.3.20 ถาดสำหรับวางตัวอย่าง
- 3.3.21 ปากกา Permanent
- 3.3.22 แผ่นรองซับ (Labmat)
- 3.3.23 ถังขยะติดเชื้อ
- 3.3.24 สไลด์ขอบฟ้า
- 3.3.25 หลอดพลาสติกปราศจากเชื้อ (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.3.26 Autopipette ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร
- 3.3.27 Filter tip ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- 3.3.28 ตะเกียงแอลกอฮอล์

- 3.3.29 Vortex mixer
- 3.3.30 Stainless rack
- 3.3.31 Forceps
- 3.3.32 นาฬิกาจับเวลา
- 3.3.33 BD BACTEC™ MGIT™ 960 System
- 3.3.34 Biological safety cabinet class II (BSC Class II)
- 3.3.35 Autoclave
- 3.3.36 Incubator
- 3.3.37 Refrigerated centrifuge
- 3.3.38 เครื่องชั่ง

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ในการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นโดยวัดอัตราการตรวจพบเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์อัตราผลการเพาะเชื้อที่เป็นบวก และอัตราการปนเปื้อนนั่น เป็นกระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการซึ่งดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ดำเนินการตามระบบความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 3 (Biosafety level 3) กระบวนการเสมหะโดยตรง (Direct smear) จะดำเนินการภายในตู้ชีวนิรภัย Class II (Biological safety cabinet Class II) สำหรับการเตรียมเสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการที่มีแรงดันบรรยากาศเป็นลบ (Negative pressure room) ซึ่งมีประตูล็อก 3 ชั้น และมีระบบกรองอากาศเข้าและออกสู่สภาพแวดล้อมด้วย High efficiency particulate air filter (HEPA filter) โดยการเตรียมตัวอย่างตรวจและการเพาะเชื้อจะกระทำภายในตู้ชีวนิรภัย Class II (Biological safety cabinet Class II) ซึ่งใช้ระบบกรองอากาศด้วย Ultra low penetration air filter (ULPA filter) ผู้ปฏิบัติงานเป็นเจ้าหน้าที่ที่มีประสบการณ์การทำงานด้านเชื้อวัณโรคและผ่านการอบรมจากสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค ตามหลักสูตรการประกันคุณภาพการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเชื้อและทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค โดยในการปฏิบัติงานทุกครั้งต้องใช้อุปกรณ์ป้องกันอันตรายส่วนบุคคล (Personal protective equipment) เช่น หน้ากาก N95, เสื้อกาวน์ใช้แล้วทิ้ง, แว่นตานิรภัย, ถุงมือ และหมวก

คลุมผม เป็นต้น สำหรับอุปกรณ์ ของเสีย และสิ่งต่างๆ ที่ปนเปื้อนจะถูกแช่น้ำยาฆ่าเชื้อที่มีฤทธิ์ทำให้ปราศจากเชื้อ (Sterilizing solution) ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave อีกครั้ง ส่วนขยะติดเชื้อเมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จะถูกนำส่งเพื่อเผาทำลายต่อไป

3.4.1.1 การตรวจสอบหะด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างส่งตรวจวินิจฉัยหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการย้อมสีแบบ Ziehl-Neelsen ดำเนินการภายในตู้ชีวนิรภัย Class II (Biological safety cabinet Class II)

(1) การเตรียมสเมียร์เสมหะโดยตรง (Direct smear)⁽³⁸⁾

1. ตรวจสอบชื่อ-นามสกุลผู้ป่วยที่ตลับเสมหะกับแบบฟอร์มส่งตรวจหาเชื้อวัณโรค
2. เขียนหมายเลข (Lab serial number) ลงบนแผ่นกระจกสไลด์
3. ทำการสเมียร์เสมหะในตู้ชีวนิรภัย (BSC Class II) โดยนำไม้เขี่ยเสมหะมาป้ายบนสไลด์วนไปมาเป็นวงกลมแบบก้นหอยเล็กๆ (Repeated coil type) ให้ได้ขนาดประมาณ 2 x 3 เซนติเมตร สเมียร์ให้มีความหนาที่สม่ำเสมอ
4. วางสไลด์รอให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อนำไปย้อมสี

(2) การย้อมสีสเมียร์เสมหะด้วยวิธี Ziehl-Neelsen⁽³⁹⁾

1. วางแผ่นสไลด์ให้อยู่แนวระนาบ ห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร
2. หยดสี 1% Carbol fuchsin ให้ทั่วทั้งสไลด์
3. ลนไฟใต้แผ่นสไลด์จนเริ่มมีไอ ทิ้งไว้ 5 นาที
4. ค่อยๆ ล้างสีด้วยน้ำสะอาด แล้วหยดน้ำยา 3% Acid alcohol บนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ 2 นาที
5. ค่อยๆ ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ถ้ายังมีสีแดงติดอยู่ให้พอกด้วย 3% Acid alcohol ซ้ำอีกครั้ง แต่ไม่ควรเกิน 10 วินาที
6. หยดสี 0.3% Methylene blue ลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ 10 วินาที
7. ค่อยๆ ล้างสีออกด้วยน้ำสะอาด เช็ดด้านหลังสไลด์ให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง เพื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

(3) การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

1. วางแผ่นสไลด์บนแท่น ใช้เลนส์ใกล้วัตถุ Low power objective lens (LPF) หรือกำลังขยาย 10X เพื่อตรวจคุณภาพเสมหะว่าดีหรือไม่ดีโดย

ใช้เกณฑ์ของ Van Scoy ที่ White blood cell (WBC) มากกว่า 25 เซลล์ต่อ LPF และเกณฑ์ของ Geckler ที่ Squamous epithelial cell น้อยกว่า 25 เซลล์ต่อ LPF บ่งบอกว่าเสมหะมีคุณภาพดีตามการศึกษาของ Umesh และคณะ⁽⁴⁰⁾ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ AFB ได้สูงขึ้น

2. จากนั้นเปลี่ยนเลนส์กำลังขยายที่สูงขึ้น แล้วหยด Immersion oil บนกระจก 1 หยด เปลี่ยนเลนส์ใกล้วัตถุเป็นกำลังขยาย 100X เพื่อหาเชื้อ AFB
3. อ่านสไลด์อย่างน้อย 100 วงกลิ้ง โดยอ่านในทิศทางแนวนอนจากซ้ายไปขวา สลับไปมา

(4) การรายงานผล

รายงานผลตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO) และสหพันธ์องค์กรต่อต้านวัณโรคและโรคปอดนานาชาติ (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: IUATLD) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การรายงานผล AFB ตามแนวทางของ WHO/IUATLD grading scale^(39,41)

จำนวนเชื้อที่พบ	รายงานผล	จำนวนวงกลิ้งที่ตรวจ (อย่างน้อย)
0 AFB/100 วงกลิ้ง	Negative	100
1-9 AFB/100 วงกลิ้ง	จำนวนเชื้อที่พบทั้งหมด	100
10-99 AFB/100 วงกลิ้ง	1+	100
1-10 AFB/วงกลิ้ง	2+	50
>10 AFB/วงกลิ้ง	3+	20

(5) การควบคุมคุณภาพ

ควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control: IQC) โดยทดสอบคุณภาพสไลด์ด้วยสเมียร์เสมหะบวก (Positive control slide) และสเมียร์เสมหะลบ (Negative control slide) ทุกครั้งก่อนทำการตรวจ AFB จากตัวอย่างผู้ป่วย

3.4.1.2 การเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้น (Concentrated smear) และการเพาะเชื้อ (Culture)

กระบวนการเตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้นและการเพาะเชื้อดำเนินการภายในตู้ชีวนิรภัย (BSC Class II) ภายในห้องที่มีแรงดันบรรยากาศเป็นลบ (Negative pressure room)

(1) การเตรียมน้ำยาลอยสลายเสมหะและกำจัดเชื้อปนเปื้อน

สูตรการเตรียมน้ำยา NALC-NaOH และ HS-SH เป็นดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 การเตรียมน้ำยา NALC-NaOH⁽¹⁸⁾

ปริมาตรสารละลายที่ต้องการ NALC-NaOH (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย NaOH และ Sodium citrate ที่ต้องผสมรวมกัน		ปริมาณสาร NALC (กรัม)
	4% NaOH (มิลลิลิตร)	2.9% Sodium citrate (มิลลิลิตร)	
50	25	25	0.25
100	50	50	0.5
200	100	100	1
500	250	250	2.5
1,000	500	500	5

ตารางที่ 3.3 การเตรียมน้ำยา HS-SH⁽³⁵⁾

ปริมาตรสารละลายที่ต้องการ HS-SH (มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลาย NaOH และ NaCl ที่ต้องผสมรวมกัน	
	4% NaOH (มิลลิลิตร)	10% NaCl (มิลลิลิตร)
50	25	25
100	50	50
200	100	100
500	250	250
1,000	500	500

(2) การเตรียมตัวอย่างเสมหะ

1. เรียงตลับเสมหะและหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร ใช้หลอดพลาสติก 2 หลอด สำหรับ 1 ตัวอย่าง เขียนหมายเลข Culture Number กำกับหลอดทั้งสองหลอด ตามด้วยหมายเลข 1 และหมายเลข 2 ตามลำดับหลอด แล้วแบ่งเสมหะเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน เหยลงในหลอดพลาสติกที่เตรียมไว้แล้วปิดฝาให้สนิท
2. สุ่มตัวอย่างหลอดเสมหะเพื่อลดอคติจากการเลือก (Reduced selection bias) โดยใช้วิธีการสุ่มอย่างง่าย (Simple random sampling) ด้วยการจับสลาก ให้สลากรหัส H แทนวิธี HS-SH และรหัส N แทนวิธี NALC-NaOH เมื่อจับสลากได้วิธีใด ให้ทดสอบวิธีนั้น กับหลอดหมายเลข 1 โดยเขียนรหัสลงบนหลอด ส่วนหลอดหมายเลข 2 ให้ใช้วิธีที่เหลือโดยเขียนรหัสลงบนหลอดเช่นกัน
3. เปิดฝาหลอดเพื่อใส่น้ำยา
 - สำหรับวิธี NALC-NaOH ใส่น้ำยา NALC-NaOH ลงไปประมาณ 1 เท่าของปริมาตรเสมหะ (ความเข้มข้นสุดท้าย (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 0.25% NALC, 1.00% NaOH และ 0.73% Sodium citrate) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex (ไม่เกิน 20 วินาที) เอียงหลอดกลับไปกลับมาให้น้ำยากระจายทั่วทั้งหลอด
 - สำหรับวิธี HS-SH ใส่น้ำยา HS-SH ลงไปประมาณ 1 เท่าของปริมาตรเสมหะ (ความเข้มข้นสุดท้าย (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของสารแต่ละชนิดเท่ากับ 1.00% NaOH และ 2.50% NaCl) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex เอียงหลอดกลับไปกลับมาให้น้ำยากระจายทั่วทั้งหลอด
4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจับเวลา 15 นาที
5. เมื่อครบเวลา เติมน้ำยา PBS ถึงขีดบอกปริมาตร 45 มิลลิลิตร
6. ผสมให้สารละลายเข้ากันดี โดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา 4-5 ครั้ง
7. นำเข้าเครื่องปั่นตกตะกอนแรงเหวี่ยงสูง Refrigerated centrifuge โดยตั้งความเร็ว 3,000g (Relative centrifugal force: RCF) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. หลังจากเครื่องปั่นหยุดทำงานแล้ว 5 นาที จึงนำหลอดตัวอย่างออกจากเครื่องปั่นและนำไปใส่ไว้ในตู้ชีวนิรภัยก่อนทำงานขั้นต่อไป
9. เปิดหลอดทดสอบภายในตู้ชีวนิรภัย ให้เห็นน้ำส่วนบนทั้งลงในภาชนะที่มีน้ำยาฆ่าเชื้อใส่ไว้แล้ว ต้องค่อยๆ เทเพื่อไม่ให้ส่วนของตะกอนที่ก้นหลอดหลุดปนไปกับสิ่งที่เททิ้ง
10. เติมน้ำยา PBS pH 6.8 ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายประมาณ 1-3 มิลลิลิตร ผสมให้น้ำยาและตะกอนเข้ากันดี โดยใช้เครื่อง Vortex

(3) การทำสเมียร์เสมหะเข้มข้น และการเพาะเชื้อลงในอาหาร

1. ละลายยาปฏิชีวนะที่ผสมในขวดประกอบด้วย Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim และ Azlocillin (PANTA) ด้วย MGIT growth supplement ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ต่อ PANTA 1 ขวด เมื่อยาละลายดีแล้ว ดูดใส่หลอดอาหารเหลว MGIT ขนาด 7 มิลลิลิตร หลอดละ 800 ไมโครลิตร
2. ดูดตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการเตรียมปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดอาหารเหลว MGIT จำนวน 1 หลอด จากนั้นดูดตัวอย่างที่เหลือเพาะใส่อาหารแข็ง L-J จำนวน 2 ขวดต่อ 1 ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างขวดละ 100 ไมโครลิตร
3. ตัวอย่างที่เหลือจากการเพาะเชื้อใช้เตรียมสเมียร์เสมหะเข้มข้น (Concentrated smear) เพื่อย้อมหาเชื้อ AFB
4. บ่มหลอดอาหารเหลว MGIT ในเครื่องอัตโนมัติ MGIT 960 system ส่วนอาหาร L-J บ่มในตู้เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. ตรวจการเจริญของเชื้อทุกวัน สำหรับอาหาร MGIT ทำโดยดูที่หน้าลินซ์เครื่องอัตโนมัติ MGIT 960 และสัญญาณเสียง เมื่อมีเชื้อเจริญ จะมีไฟสัญญาณ (+) สีแดงปรากฏหรือเมื่อครบ 42 วัน ไม่มีเชื้อเจริญ จะมีไฟสัญญาณ (-) สีเขียวปรากฏให้เห็นนำหลอดสแกนออกมาตรวจดูด้วยตาเปล่าเมื่อไม่พบเชื้อเจริญให้นำไปทิ้งทำลาย สำหรับอาหารแข็ง L-J ตรวจสอบการเจริญของเชื้อทุกวันจนกว่าจะมีโคโลนีเชื้อเจริญขึ้นให้เห็น หรือจนครบ 8 สัปดาห์เมื่อไม่มีกลุ่มเชื้อเจริญให้เห็น
6. นำอาหารที่มีการเจริญของเชื้อไปพิสูจน์ชนิดเพื่อแยกระหว่างเชื้อวัณโรคกับเชื้อ NTM ด้วยชุดทดสอบ SD Bioline TB Ag MPT64

rapid test ใช้หลักการ Immunochromatographic assay ตรวจหาโปรตีน MPT64 ของเชื้อวัณโรค ซึ่งเป็นชุดทดสอบแบบเร็ว สามารถอ่านผลได้ภายใน 15 นาที

(4) การรายงานผล

- ผล Growth สำหรับอาหารแข็ง และ ผล Positive สำหรับอาหารเหลว หมายถึง มีเชื้อ Mycobacteria เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ผล No growth สำหรับอาหารแข็ง และ ผล Negative สำหรับอาหารเหลว หมายถึง ไม่พบเชื้อ Mycobacteria เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ผล Contaminated หมายถึง มีเชื้ออื่นที่ไม่ใช่ Mycobacteria เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่พบเชื้อ Mycobacteria เจริญในอาหาร

สำหรับผลเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ (Growth) ในอาหารแข็ง L-J ต้องรายงานปริมาณเชื้อที่พบ ดังนี้

ตารางที่ 3.4 การรายงานปริมาณเชื้อบนอาหารแข็ง L-J

จำนวนโคโลนีเชื้อที่เจริญ	การรายงานผลเพาะเชื้อ
<50	จำนวนโคโลนีทั้งหมด
50 - 100	1+
101 - 200	2+
201 - 500	3+
>500	4+

(5) การควบคุมคุณภาพ

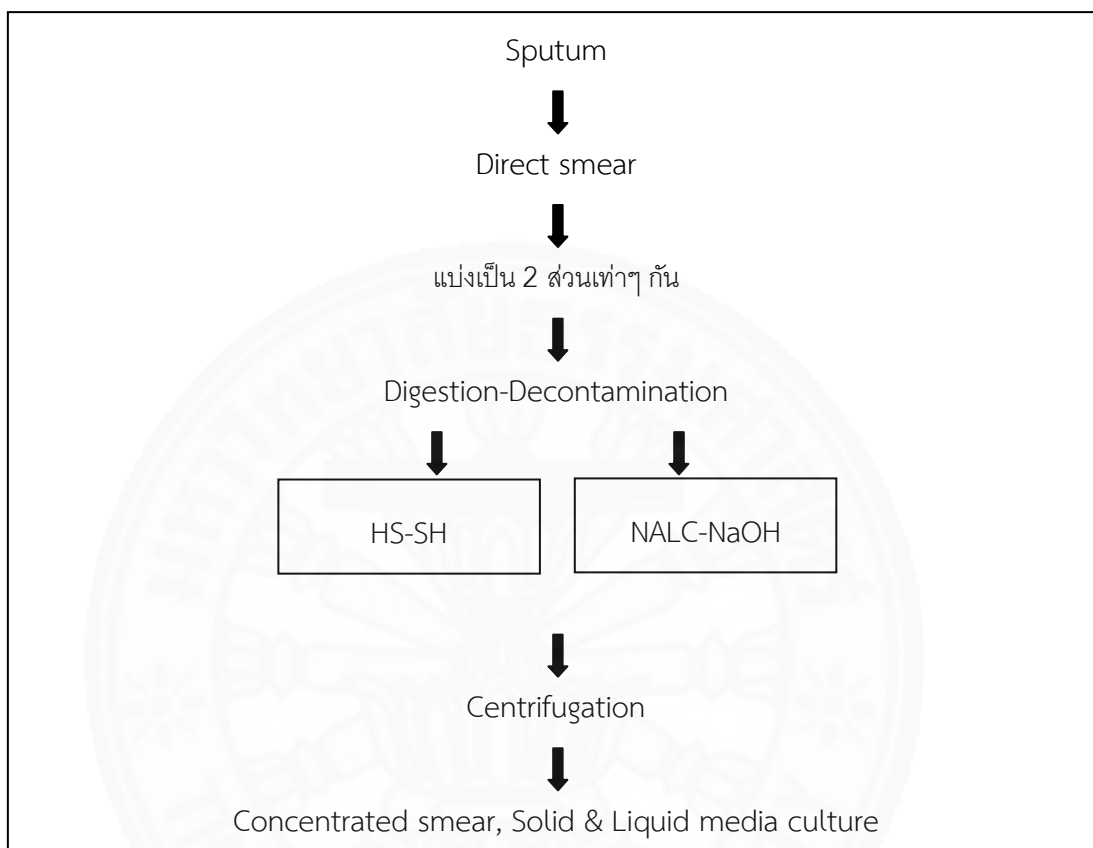
ทำการควบคุมคุณภาพการเพาะเชื้อโดย

- Positive control ใช้เชื้อ *M. tuberculosis* H37Rv ปรับความขุ่น 0.5 McFarland แล้วเจือจางด้วย PBS pH 6.8 ในอัตราส่วน 1:500

- Negative control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ทำการเพาะเชื้อ Control เช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นดูระยะเวลาการเจริญของเชื้อสำหรับ Positive control ซึ่งจะต้องพบเชื้อเจริญภายใน 6 สัปดาห์ สำหรับอาหาร

MGIT และภายใน 8 สัปดาห์ สำหรับอาหารแข็ง L-J ส่วน Negative control จะต้องไม่พบเชื้อเจริญ และต้องตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ด้วย



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพน้ำยา

3.4.1.3 การศึกษาความคงตัวของน้ำยา HS-SH

ประเมินประสิทธิภาพในการเพาะเชื้อของน้ำยา HS-SH ที่เตรียมไว้นาน 1 เดือนเปรียบเทียบกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ โดยทดสอบกับตัวอย่างเสมหะส่งตรวจ 60 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ผลตรวจ AFB จากตัวอย่างโดยตรงเป็นลบ และบวกอย่างละ 30 ตัวอย่าง

3.4.2 การเปรียบเทียบราคาต้นทุนของน้ำยา

เปรียบเทียบต้นทุนน้ำยา HS-SH และ NALC-NAOH และเปรียบเทียบราคาต้นทุนของวิธีการทั้งสองต่อการทดสอบตัวอย่างทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว

3.4.3 วิเคราะห์และสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ผลใช้ค่าสถิติเชิงพรรณนาในการบรรยายลักษณะทั่วไปของข้อมูล รวมทั้งใช้สถิติเชิงอนุมานในการทดสอบสมมติฐานทางสถิติเปรียบเทียบค่าของกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้

- Chi square test หรือ Fisher's exact test สำหรับข้อมูลเชิงคุณภาพ (Qualitative data) ได้แก่ ผลตรวจคุณภาพเสมหะ, ผล AFB และ ผลเพาะเชื้อ

- Wilcoxon signed rank test สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณ (Quantitative data) ได้แก่ ระยะเวลาการเจริญของเชื้อวัณโรคระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH และค่า Growth Unit (GU) ของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว

การประเมินและเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ใช้ค่าสถิติดังนี้

- Percent agreement และ Kappa statistic เพื่อวัดความสอดคล้องกัน โดยใช้ระดับความสัมพันธ์ตามเกณฑ์ของ Landis และ Koch⁽⁴²⁾ ดังนี้

ระดับแย่ (Poor) ค่า Kappa < 0.40

ระดับดี (Good) ค่า Kappa = 0.40-0.70

ระดับยอดเยี่ยม (Excellent) ค่า Kappa > 0.75

- ค่าความไว (Sensitivity)
- ความจำเพาะ (Specificity)
- ค่าพยากรณ์ผลบวก (Positive predictive value)
- ค่าพยากรณ์ผลลบ (Negative predictive value)
- ค่าความถูกต้องของการทดสอบ (Accuracy)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมอ

จากการศึกษาตัวอย่างเสมอส่งตรวจในปีงบประมาณ 2559 ที่เข้าเกณฑ์คัดเลือกเพื่อใช้ศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีจำนวนทั้งสิ้น 427 ตัวอย่าง

4.1.1 ประเภทผู้ป่วย

เมื่อทำการจำแนกประเภทผู้ป่วยที่ทำการศึกษาในครั้งนี้จะพบว่าจำนวนผู้ป่วยแต่ละกลุ่มค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม Re-treatment มีจำนวนสูงสุด รองลงมาเป็นกลุ่ม On-treatment, New case และ Pre-treatment ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเสมอจำแนกตามประเภทผู้ป่วย

ประเภท	Re-treatment (ร้อยละ)	On-treatment (ร้อยละ)	Pre-treatment (ร้อยละ)	New case (ร้อยละ)	รวม (ร้อยละ)
จำนวน	120 (28.10)	117 (27.40)	83 (19.44)	107 (25.06)	427 (100.00)

4.1.2 ข้อมูลตัวอย่างเสมอหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมอหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย

ข้อมูลทั่วไป		Re- treatment (ร้อยละ)	On- treatment (ร้อยละ)	Pre- treatment (ร้อยละ)	New case (ร้อยละ)	รวม (ร้อยละ)
เพศ	ชาย	91 (75.83)	97 (82.91)	66 (79.52)	79 (73.83)	333 (77.99)
	หญิง	29 (24.17)	20 (17.09)	17 (20.48)	28 (26.17)	94 (22.01)
อายุ (ปี)	<31	5 (4.17)	7 (5.98)	16 (19.28)	8 (7.48)	36 (8.43)
	31-40	12 (10.00)	13 (11.11)	28 (33.73)	12 (11.22)	65 (15.22)
	41-50	26 (21.67)	29 (24.79)	13 (15.66)	20 (18.69)	88 (20.61)
	51-60	31 (25.83)	27 (23.08)	18 (21.69)	18 (16.82)	94 (22.02)
	>60	46 (38.33)	41 (35.04)	8 (9.64)	49 (45.79)	144 (33.72)
	Mean $\pm$ SD	56.16 $\pm$ 14.07	54.96 $\pm$ 14.87	42.42 $\pm$ 13.64	56.89 $\pm$ 17.54	53.34 $\pm$ 16.04
	Median (Min-Max)	56.00 (22-102)	54.00 (19-87)	40.00 (20-80)	58.00 (18-91)	53.00 (18-102)

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมอหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย (ต่อ)

ข้อมูลทั่วไป		Re- treatment (ร้อยละ)	On- treatment (ร้อยละ)	Pre- treatment (ร้อยละ)	New case (ร้อยละ)	รวม (ร้อยละ)
ระยะเวลา ที่เก็บ จนถึง เพาะเชื้อ (วัน)	Mean $\pm$ SD	4.15 $\pm$ 2.18	4.48 $\pm$ 2.10	5.42 $\pm$ 2.12	5.42 $\pm$ 1.97	4.81 $\pm$ 2.16
	Median (Min-Max)	4.00 (0-7)	5.00 (1-7)	7.00 (0-7)	7.00 (1-7)	5.00 (0-7)
ปริมาตร (มิลลิลิตร)	Mean $\pm$ SD	5.25 $\pm$ 4.91	4.79 $\pm$ 3.09	3.57 $\pm$ 1.96	3.64 $\pm$ 2.50	4.39 $\pm$ 3.49
	Median (Min-Max)	4.00 (2-40)	4.00 (2-20)	3.00 (2-10)	3.00 (2-20)	4.00 (2-40)
จังหวัด	กำแพงเพชร	21 (17.50)	16 (13.68)	1 (1.20)	1 (0.94)	39 (9.13)
	พิจิตร	13 (10.83)	20 (17.09)	27 (32.53)	7 (6.54)	67 (15.69)
	นครสวรรค์	56 (46.67)	56 (47.86)	45 (54.22)	86 (80.37)	243 (56.91)
	อุทัยธานี	11 (9.17)	6 (5.13)	6 (7.23)	0 (0)	23 (5.39)
	ชัยนาท	19 (15.83)	19 (16.24)	4 (4.82)	13 (12.15)	55 (12.88)

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเสมอหะจำแนกตามประเภทผู้ป่วย (ต่อ)

ข้อมูลทั่วไป		Re-treatment (ร้อยละ)	On-treatment (ร้อยละ)	Pre-treatment (ร้อยละ)	New case (ร้อยละ)	รวม (ร้อยละ)
การขนส่ง	รถ	105	99	67	102	373
	โรงพยาบาล	(87.50)	(84.62)	(80.72)	(95.33)	(87.35)
	ไปรษณีย์	15	18	16	5	54
		(12.50)	(15.38)	(19.28)	(4.67)	(12.65)
การแช่เย็นระหว่างขนส่ง	แช่เย็น	94	84	46	35	259
	ไม่แช่เย็น	26	33	37	72	168
		(21.67)	(28.21)	(44.58)	(67.29)	(39.34)
รวม		120	117	83	107	427
		(100.00)	(100.00)	(100.00)	(100.00)	(100.00)

จากตารางที่ 4.2 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่างพบว่าเพศชายมากกว่าเพศหญิง ทั้ง 4 กลุ่ม ซึ่งมีอัตราส่วนโดยรวมของเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 3.5 ต่อ 1 เป็นอัตราส่วนที่สูงกว่าค่ารายงานขององค์การอนามัยโลกที่มีค่าอยู่ที่ 1.7 ต่อ 1 โดยมีช่วงอยู่ระหว่าง 1-3.1 ต่อ 1⁽¹⁾ สำหรับอายุของผู้ป่วยเมื่อจำแนกตามกลุ่มอายุแล้วนั้น พบว่าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มมีอายุมากกว่า 60 ปี อย่างไรก็ตามอายุเฉลี่ยของผู้ป่วยอยู่ที่ 53.34 ปี และเมื่อพิจารณาจำนวนผู้ป่วยที่มีอายุต่ำกว่า 60 ปี รวมกันแล้วมีมากถึงร้อยละ 66.28 เป็นกลุ่มที่มีความสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสโรค เนื่องจากอยู่ในช่วงอายุวัยทำงาน ต้องมีการพบปะผู้คน การทำกิจกรรมในชุมชน และเข้าสังคมมากกว่าผู้ที่อายุมากกว่า 60 ปี ที่เป็นวัยสูงอายุ ซึ่งปกติมักจะอยู่กับบ้านมากกว่า

สำหรับระยะเวลาตั้งแต่เก็บตัวอย่างเสมอหะจนถึงการเพาะนั้นโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 4.81 วัน ซึ่งการศึกษาของ Banda และคณะ⁽⁴³⁾ นั้นพบว่าการเก็บเสมอหะแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องที่ 25 องศาเซลเซียส สามารถใช้ตรวจหาเชื้อ AFB ได้นานถึง 4 สัปดาห์

และหากเป็นการเพาะเชื้อวัณโรคสามารถเก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ไว้ได้นาน 1 สัปดาห์ โดยผลการตรวจไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการตรวจ AFB หรือเพาะเชื้อทันที ในการศึกษานี้จะเห็นว่าตัวอย่างยังคงอยู่ในช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ AFB และการเพาะเชื้อ สำหรับค่าเฉลี่ยของปริมาณเสมหะมีค่าเท่ากับ 4.39 มิลลิกรัม ใกล้เคียงกับปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการตรวจ AFB และเพาะเชื้อ ที่ Rashid และคณะ⁽⁴⁴⁾ ได้ทำการศึกษา คือ 5 มิลลิกรัม ในส่วนของโรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดที่อยู่ในเขตรับผิดชอบของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 พบว่าจังหวัดที่โรงพยาบาลส่งตัวอย่างตรวจมากที่สุด คือ จังหวัดนครสวรรค์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 ตั้งอยู่ในจังหวัดนครสวรรค์ ทำให้โรงพยาบาลในพื้นที่จังหวัดนครสวรรค์สามารถส่งตรวจได้ง่ายกว่าโรงพยาบาลในจังหวัดอื่นๆ ในด้านการขนส่งตัวอย่างนั้นพบว่าส่งด้วยรถพยาบาลมากกว่าส่งไปรษณีย์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในจังหวัดนครสวรรค์มีโรงพยาบาลศูนย์สวรรค์ประชารักษ์ ซึ่งเป็นโรงพยาบาลตติยภูมิ รักษาผู้ป่วยที่ส่งต่อจากโรงพยาบาลในเขตพื้นที่เดียวกันกับสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 ดังนั้นจึงทำให้โรงพยาบาลมีความสะดวกมากขึ้นในการส่งตัวอย่างโดยการฝากตัวอย่างมากับรถพยาบาลที่มาส่งผู้ป่วยที่โรงพยาบาลศูนย์สวรรค์ประชารักษ์ และสามารถแวะมาส่งตัวอย่างที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 ได้ เพราะสถานที่ตั้งอยู่ไม่ไกลกัน ดังนั้นตัวอย่างที่ส่งด้วยรถพยาบาลจึงพบสูงถึงร้อยละ 87.35 สำหรับการแช่เย็นตัวอย่างขณะขนส่งพบว่าการแช่เย็นมากกว่าตัวอย่างไม่แช่เย็น แต่ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ไม่แช่เย็นที่พบร้อยละ 39.34 โดยสูงกว่าตัวอย่างที่ส่งทางไปรษณีย์ซึ่งโดยปกติไม่แช่เย็น ทั้งนี้มีสาเหตุมาจาก ในจำนวนนี้มีตัวอย่างส่วนหนึ่งที่ส่งจากโรงพยาบาลศูนย์สวรรค์ประชารักษ์ เป็นตัวอย่างที่ส่งโดยรถพยาบาล แต่ไม่ได้แช่เย็น เนื่องจากโรงพยาบาลศูนย์สวรรค์ประชารักษ์ตั้งอยู่ไม่ไกลจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 ซึ่งใช้เวลาเดินทางไม่เกิน 20 นาที

4.2 ประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH

4.2.1 การตรวจ AFB

ผลการตรวจ AFB ในตัวอย่างทั้งหมด 427 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการตรวจเสมหะแบบเข้มข้น (Concentrated smear) ทั้งวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH ให้สัดส่วนผลบวกที่สูงกว่าวิธีตรวจโดยตรง (Direct smear) โดยวิธีที่ให้ผลบวกมากที่สุด คือ วิธี HS-SH รองลงมา คือ วิธี NALC-NaOH และวิธีตรวจโดยตรง ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 4.3 โดยวิธี HS-SH ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีตรวจโดยตรงร้อยละ 7.49 และสูงกว่าวิธี NALC-NaOH ร้อยละ 0.23 ในขณะที่วิธี NALC-NaOH ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีตรวจโดยตรงร้อยละ 7.26 เหตุผลเนื่องจากการทำเสมหะ

เข้มข้นใช้มีน้อยและการปั่นตกตะกอนตัวอย่างเสมหะก่อนนำมาทำสเมียร์ จึงเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าวิธีการตรวจเสมหะแบบเข้มข้นให้ผลบวกที่สูงกว่าวิธีการตรวจเสมหะโดยตรง แต่ทั้งนี้ผลการศึกษายังคงมีความแตกต่างกันไปในแต่ละงานวิจัย โดยการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ซึ่งใช้การเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH พบว่าให้ผลบวกเพิ่มขึ้นจากวิธีการตรวจโดยตรงร้อยละ 19.15 และ 18.09 ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ ซึ่งทำการศึกษา 2 ช่วง โดยช่วงแรกใช้ตัวอย่างเดียวกันแบ่งเป็น 2 ส่วน เตรียมตัวอย่างเข้มข้นด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลบวกสูงกว่าวิธีการตรวจโดยตรงร้อยละ 2.19 และ 2.34 ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาของ Uddin และคณะ⁽⁴⁵⁾ กับ Kumar และคณะ⁽⁴⁶⁾ พบว่าวิธี NALC-NaOH ให้ผล AFB บวกเพิ่มขึ้นจากวิธีการตรวจโดยตรงร้อยละ 1.50 เท่ากัน

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผล AFB	Direct smear (ร้อยละ)	Concentrated smear	
		HS-SH (ร้อยละ)	NALC-NaOH (ร้อยละ)
Negative	168 (39.34)	136 (31.85)	137 (32.08)
Positive	259 (60.66)	291 (68.15)	290 (67.92)
Scanty (จำนวนเชื้อที่พบ)	43 (10.07)	11 (2.58)	12 (2.81)
1+	63 (14.76)	58 (13.58)	58 (13.58)
2+	60 (14.05)	43 (10.07)	45 (10.54)
3+	93 (21.78)	179 (41.92)	175 (40.99)
รวม	427 (100.00)	427 (100.00)	427 (100.00)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าวิธีการเตรียมเสมียร์เสมหะที่ต่างกันมีผลต่อการตรวจ AFB ($P\text{-value} < 0.001$) เมื่อทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบวิธีตรวจโดยตรงกับวิธีตรวจแบบเข้มข้นทั้งวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} < 0.001$) โดยค่ามีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.43 และ 0.44 ตามลำดับ

บ่งบอกความสัมพันธ์อยู่ในระดับดี (Good) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P\text{-value} = 0.998$) มีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.96 บ่งบอกความสัมพันธ์อยู่ในระดับยอดเยี่ยม (Excellent) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ที่พบว่าการเตรียมสเมียร์เสมหะวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH ให้ผลการตรวจ AFB ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P\text{-value} = 0.780$) และมีระดับความสัมพันธ์ ที่ดี โดยมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.63 ซึ่งการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ พบว่าผลการเตรียมสเมียร์เสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยวิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P\text{-value} = 0.800$)

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบวิธีเตรียมสเมียร์เสมหะและผล AFB grading

วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผล AFB grading					รวม	% Agreement	Kappa	Chi square	P-value
	Negative	Scanty	1+	2+	3+					
Direct	168	43	63	60	93	427	-	-	70.00	<0.001*
HS-SH	136	11	58	43	179	427				
NALC-NaOH	137	12	58	45	175	427				
Direct	168	43	63	60	93	427	57.38	0.43	52.53	<0.001*
HS-SH	136	11	58	43	179	427				
Direct	168	43	63	60	93	427	58.31	0.44	48.06	<0.001*
NALC-NaOH	137	12	58	45	175	427				
HS-SH	136	11	58	43	179	427	96.96	0.96	0.14	0.998
NALC-NaOH	137	12	58	45	175	427				

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

เมื่อแยกวิเคราะห์ทางสถิติตามประเภทผู้ป่วย ยังคงให้ผลเช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์ในภาพรวม คือ ทุกกลุ่มตัวอย่างพบว่าวิธีการเตรียมเสมียร์เสมหะที่ต่างกันมีผลต่อการตรวจ AFB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.5 ทั้งนี้ยังพบว่ามีตัวอย่างกลุ่ม New case เพียงกลุ่มเดียวที่ผล AFB ของการตรวจแบบเข้มข้นระหว่างวิธี HS-SH กับ NALC-NaOH มีความแตกต่างกัน โดยวิธี HS-SH ให้ผลบวกสูงกว่า 1 ตัวอย่าง ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วยอื่นๆ ทั้งสองวิธีให้ผลบวกและลบจำนวนเท่ากัน

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบวิธีเตรียมเสมียร์เสมหะและผล AFB grading แยกตามประเภทผู้ป่วย

กลุ่มผู้ป่วย	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผล AFB grading					รวม	Chi square	P-value
		Negative	Scanty	1+	2+	3+			
Re-treatment	Direct	51	15	10	9	35	120	20.47	0.009*
	HS-SH	42	3	17	9	49	120		
	NALC-NaOH	42	3	18	8	49	120		
On-treatment	Direct	37	11	34	24	11	117	45.02	<0.001*
	HS-SH	24	2	19	23	49	117		
	NALC-NaOH	24	3	19	24	47	117		
Pre-treatment	Direct	30	9	11	11	22	83	18.51	0.018*
	HS-SH	28	1	10	6	38	83		
	NALC-NaOH	28	1	10	7	37	83		
New case	Direct	50	8	8	16	25	107	16.49	0.036*
	HS-SH	42	5	12	5	43	107		
	NALC-NaOH	43	5	11	6	42	107		

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

สำหรับคุณภาพเสมหะนั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับผลการตรวจ AFB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งทั้ง 3 วิธีให้ผลเหมือนกัน โดยจะพบว่าตัวอย่างเสมหะคุณภาพดีจะให้สัดส่วนผลบวกที่สูงกว่าเสมหะที่มีคุณภาพไม่ดี รายละเอียดดังตารางที่ 4.6 โดยในการศึกษานี้พบว่าตัวอย่างเสมหะที่ดีให้ผลบวกสูงกว่าเสมหะที่ไม่ดีสำหรับวิธีตรวจโดยตรง วิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH เท่ากับร้อยละ 23.96, 20.15 และ 20.48 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผลการศึกษาของ Lee และคณะ⁽⁴⁷⁾

ที่ศึกษาคุณภาพเสมหะที่เหมาะสมกับการตรวจ AFB ด้วยวิธีตรวจโดยตรง ที่ใช้เกณฑ์ $WBC \geq 25$ เซลล์/LPF สำหรับเสมหะคุณภาพดี และ $WBC < 25$ เซลล์/LPF สำหรับเสมหะคุณภาพไม่ดี ซึ่งคล้ายกับเกณฑ์ของ Van Scoy⁽⁴⁰⁾ โดยพบว่าเสมหะคุณภาพดีให้ผลบวกสูงกว่าเสมหะคุณภาพไม่ดีร้อยละ 17.23 จากผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเสมหะคุณภาพดีมีโอกาที่จะตรวจพบเชื้อ AFB ได้สูงกว่าตัวอย่างที่คุณภาพไม่ดี ดังนั้นกระบวนการเก็บเสมหะจึงมีความสำคัญ การแนะนำวิธีการเก็บเสมหะที่ถูกต้องกับผู้ป่วยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สำหรับผลการตรวจ AFB ของแต่ละวิธีนั้น พบว่าวิธีตรวจโดยตรงมีความแตกต่างของสัดส่วนผลบวกระหว่างตัวอย่างเสมหะดีและไม่ดีสูงกว่าวิธีตรวจแบบเข้มข้น โดยพบความแตกต่างร้อยละ 23.96 ขณะที่วิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH พบความแตกต่างร้อยละ 20.15 และ 20.48 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบกับคุณภาพของเสมหะและผลการตรวจ AFB

วิธีเตรียม ตัวอย่าง	คุณภาพ เสมหะ	ผล AFB (ร้อยละ)		รวม (ร้อยละ)	Chi square	P-value
		Negative	Positive			
Direct	ดี	28 (22.40)	97 (77.60)	125 (100.00)	21.26	<0.001*
	ไม่ดี	140 (46.36)	162 (53.64)	302 (100.00)		
HS-SH	ดี	22 (17.60)	103 (82.40)	125 (100.00)	16.53	<0.001*
	ไม่ดี	114 (37.75)	188 (62.25)	302 (100.00)		
NALC-NaOH	ดี	22 (17.60)	103 (82.40)	125 (100.00)	17.02	<0.001*
	ไม่ดี	115 (38.08)	187 (61.92)	302 (100.00)		

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

4.2.2 การเพาะเชื้อ Mycobacteria

ผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria พบว่าวิธี HS-SH ให้สัดส่วนผลบวกที่สูงกว่าวิธี NALC-NaOH ในอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT เท่ากับร้อยละ 0.71 และ 2.34 ตามลำดับ สำหรับผลปนเปื้อน (Contaminated) นั้นวิธี HS-SH พบการปนเปื้อนน้อยกว่าวิธี NALC-NaOH ในอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT เท่ากับร้อยละ 3.15 และ 4.45 ตามลำดับ รายละเอียดดังตารางที่ 4.7 ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยพบว่าวิธี HS-SH ให้ผลบวกสูงกว่าและผลปนเปื้อนที่ต่ำกว่าวิธี NALC-NaOH แต่ทั้งนี้มีความแตกต่างในรายละเอียดของผลในแต่ละงานวิจัย โดยการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ซึ่งทดสอบการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง L-J นั้นพบว่าวิธี HS-SH ให้ผลเพาะเชื้อเป็นบวกและมีการปนเปื้อน (Contaminated) ร้อยละ 18.87 และ 0.94 ตามลำดับ สำหรับวิธี NALC-NaOH พบผลเพาะเชื้อเป็นบวกและการปนเปื้อนร้อยละ 15.09 และ 11.32 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างของผลการเพาะเชื้อเป็นบวกและผลการปนเปื้อนร้อยละ 3.78 และ 10.38 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ ซึ่งเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH โดยทดสอบทั้งในอาหาร L-J และ MGIT พบว่าวิธี HS-SH มีผลเพาะเชื้อเป็นบวกในอาหาร L-J และในอาหาร MGIT ร้อยละ 12.30 และ 12.88 ตามลำดับ และมีการปนเปื้อนในอาหาร L-J และในอาหาร MGIT ร้อยละ 1.17 เท่ากัน ในขณะที่วิธี NALC-NaOH มีผลเพาะเชื้อเป็นบวกในอาหาร L-J และในอาหาร MGIT ร้อยละ 12.30 และ 12.74 ตามลำดับ และมีการปนเปื้อนในอาหาร L-J และในอาหาร MGIT ร้อยละ 2.50 และ 2.05 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคิดค่าผลต่างระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH จะพบว่าในอาหาร L-J สัดส่วนผลบวกของทั้งสองวิธีเท่ากัน ส่วนในอาหาร MGIT มีความแตกต่างร้อยละ 0.14 ในขณะที่การปนเปื้อนในอาหาร L-J และ MGIT มีความแตกต่างกันร้อยละ 1.33 และ 0.88 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาของ Chaudhary และคณะ⁽³⁶⁾ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลเพาะเชื้อในอาหาร L-J ด้วยวิธี HS-SH และวิธี modified Petroff's โดยมีผลเพาะเชื้อเป็นบวกร้อยละ 84.00 และ 70.00 ตามลำดับ และมีการปนเปื้อนร้อยละ 6.00 และ 8.00 ตามลำดับ โดยพบความแตกต่างของผลเพาะเชื้อเป็นบวก และการปนเปื้อนเท่ากับร้อยละ 14.00 และ 2.00 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria บนอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT ด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH

ผลเพาะเชื้อ	L-J media (ร้อยละ)		MGIT media (ร้อยละ)	
	HS-SH	NALC-NaOH	HS-SH	NALC-NaOH
Negative	193 (45.20)	181 (42.39)	144 (33.72)	135 (31.61)
Positive	197 (46.14)	194 (45.43)	238 (55.74)	228 (53.40)
<50 โคโลนี	58 (13.58)	56 (13.11)	-	-
1+	28 (6.56)	26 (6.09)	-	-
2+	10 (2.34)	10 (2.34)	-	-
3+	26 (6.09)	26 (6.09)	-	-
4+	75 (17.57)	76 (17.80)	-	-
Contaminated	37 (8.67)	52 (12.18)	45 (10.54)	64 (14.99)
รวม	427 (100.00)	427 (100.00)	427 (100.00)	427 (100.00)

ตัวอย่างที่ผลเพาะเชื้อเป็นบวกของทั้งสองวิธี พบเป็นเชื้อวัณโรค (MTBC) มากกว่าเชื้อ NTM ดังตารางที่ 4.8 โดยในอาหาร MGIT พบเชื้อวัณโรคและ NTM ในจำนวนที่มากกว่าอาหาร L-J ซึ่งวิธี HS-SH พบเชื้อวัณโรคในอาหาร MGIT เพิ่มขึ้นร้อยละ 6.09 ของอาหาร L-J ขณะที่พบ NTM เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.51 ส่วนวิธี NALC-NaOH พบเชื้อวัณโรคและ NTM ในอาหาร MGIT เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.51 และ 4.45 ของอาหาร L-J ตามลำดับ ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าการเพาะเชื้อด้วยอาหาร MGIT สามารถเพิ่มจำนวนการตรวจพบเชื้อ Mycobacteria ได้สูงกว่าอาหาร L-J ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในอาหาร MGIT ใส่อาหารเสริมที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ Mycobacteria เข้าไปจึงทำให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งเชื้อวัณโรคและ NTM ได้ดีกว่าอาหารแข็ง L-J สอดคล้องกับการศึกษาของ Hasan และคณะ⁽⁴⁸⁾ ที่พบว่าอาหาร MGIT สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรค และเชื้อ NTM ได้เพิ่มขึ้นจากอาหาร L-J ร้อยละ 23.81 และ 91.67 ตามลำดับ สำหรับสัดส่วนของ NTM ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 14-20 ของเชื้อ Mycobacteria ทั้งหมด ซึ่งสูงกว่าการศึกษาของ Jain และคณะ⁽⁴⁹⁾ ที่ทำการศึกษาในสถานพยาบาลตติยภูมิ เมืองเดลี ประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นประเทศที่มีปัญหาของวัณโรคสูง ในช่วงเดือนมกราคม ค.ศ. 2011 ถึง เดือนมิถุนายน ค.ศ. 2012 โดยผล

การศึกษาการเพาะเชื้อตัวอย่างทางเดินหายใจ (Respiratory specimen) ได้แก่ เสมหะ, Bronchoalveolar lavage, Bronchial wash และ Endotracheal aspirate พบว่ามีสัดส่วนของเชื้อ NTM เท่ากับร้อยละ 9.68 และพบเชื้อวัณโรคสูงถึงร้อยละ 90.32 แต่บางประเทศในเอเชีย กลับพบสัดส่วนของ NTM ที่สูงกว่าวัณโรค ดังเช่นการศึกษาของ Yoo และคณะ⁽⁵⁰⁾ ในสถานพยาบาล ตติยภูมิ กรุงโซล ประเทศเกาหลีใต้ ในปี ค.ศ. 2010 พบว่าผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria ด้วยอาหารแข็ง 3% Ogawa จากตัวอย่างทางเดินหายใจ ได้แก่ เสมหะ และ Bronchial aspirate ของผู้ป่วย มีสัดส่วนของเชื้อ NTM สูงถึงร้อยละ 62.90 ในขณะที่พบเชื้อวัณโรคเพียงร้อยละ 37.10 ซึ่งในประเทศที่พัฒนาแล้ว อาทิเช่น สหรัฐอเมริกา ที่มีระบบการดูแลรักษาวัณโรคอย่างจริงจังทำให้ ความชุกและอุบัติการณ์ของวัณโรคลดลงมาก แต่กลับพบว่าเกิดปัญหาการก่อโรคของเชื้อ NTM เพิ่มขึ้น โดยเชื้อ NTM ที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อในกลุ่ม *M. avium* complex (MAC)^(51,52)

ตารางที่ 4.8 ชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเพาะเชื้อ Positive

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผลเพาะเชื้อ Positive (ร้อยละ)		ตัวอย่างทั้งหมด (ร้อยละ)
		MTBC	NTM	
L-J media	HS-SH	167 (39.11)	30 (7.03)	427 (100.00)
	NALC-NaOH	167 (39.11)	27 (6.32)	427 (100.00)
MGIT media	HS-SH	193 (45.20)	45 (10.54)	427 (100.00)
	NALC-NaOH	182 (42.62)	46 (10.77)	427 (100.00)

จากที่กล่าวมาแล้วนั้นแม้วิธี HS-SH กับวิธี NALC-NaOH จะให้ผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria ที่แตกต่างกัน แต่เมื่อทดสอบทางสถิติแล้ว พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการเพาะเชื้อที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในอาหารแข็ง L-J และอาหารเหลว MGIT (P-value = 0.093 และ 0.051 ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4.9 โดยมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.59 และ 0.45 สำหรับอาหารแข็ง และอาหารเหลวตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีอยู่ในระดับดี (Good) และเป็นไปในลักษณะเดียวกันเมื่อแยกตัวอย่างตามประเภทผู้ป่วย ดังตารางที่ 4.10 ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ที่พบว่าวิธี HS-SH ให้ผลเพาะเชื้อด้วยอาหาร L-J เป็นบวกสูงกว่าวิธี NALC-NaOH ร้อยละ 4.26 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value = 0.100) และความสัมพันธ์ของทั้งสองวิธีอยู่ในระดับยอดเยี่ยม โดยมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.79 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ ซึ่งพบว่าผลเพาะเชื้อวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value = 0.844)

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อและวิธีเพาะเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผลเพาะเชื้อ (ร้อยละ)		รวม (ร้อยละ)	% Agreement	Kappa	Chi square	P-value
		Non contaminated	Contaminated					
L-J media	HS-SH	390 (91.34)	37 (8.66)	427 (100.00)	92.27	0.59	2.82	0.093
	NALC-NaOH	375 (87.82)	52 (12.18)	427 (100.00)				
MGIT media	HS-SH	382 (89.46)	45 (10.54)	427 (100.00)	87.59	0.45	3.80	0.051
	NALC-NaOH	363 (85.01)	64 (14.99)	427 (100.00)				

เมื่อแยกวิเคราะห์ผลการเพาะเชื้อตามกลุ่มผู้ป่วย พบว่าผลเพาะเชื้อโดยรวมของแต่ละกลุ่มที่เพาะด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์เหมือนกับการวิเคราะห์ในภาพรวม รายละเอียดดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อรวมและวิธีเพาะเชื้อแยกตามประเภทผู้ป่วย

กลุ่มผู้ป่วย	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผลเพาะเชื้อ		รวม	Chi square	P-value
		Non contaminated	Contaminated			
Re-treatment	HS-SH	113	7	120	0.08	0.776
	NALC-NaOH	114	6	120		
On-treatment	HS-SH	113	4	117	1.41	0.236
	NALC-NaOH	109	8	117		
Pre-treatment	HS-SH	80	3	83	-	1.000 [‡]
	NALC-NaOH	79	4	83		
New case	HS-SH	105	2	107	-	1.000 [‡]
	NALC-NaOH	104	3	107		

[‡] Fisher's exact test

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบกับคุณภาพของเสมหะและผลเพาะเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	คุณภาพเสมหะ	ผลเพาะเชื้อ (ร้อยละ)			รวม (ร้อยละ)	Chi square	P-value
			Negative	Positive	Contaminated			
L-J media	HS-SH	ดี	45 (36.00)	67 (53.60)	13 (10.40)	125 (100.00)	6.06	0.048*
		ไม่ดี	148 (49.00)	130 (43.05)	24 (7.95)	302 (100.00)		
	NALC-NaOH	ดี	42 (33.60)	68 (54.40)	15 (12.00)	125 (100.00)	6.35	0.042*
		ไม่ดี	139 (60.03)	126 (41.72)	37 (12.25)	302 (100.00)		
MGIT media	HS-SH	ดี	33 (26.40)	82 (65.60)	10 (8.00)	125 (100.00)	6.98	0.031*
		ไม่ดี	111 (36.75)	156 (51.66)	35 (11.59)	302 (100.00)		
	NALC-NaOH	ดี	31 (24.80)	81 (64.80)	13 (10.40)	125 (100.00)	9.38	0.009*
		ไม่ดี	104 (34.44)	147 (48.67)	51 (16.89)	302 (100.00)		

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

การวิเคราะห์คุณภาพเสมหะกับผลการเพาะเชื้อ ดังตารางที่ 4.11 นั้น การทดสอบทางสถิติพบว่าคุณภาพเสมหะที่เพาะเชื้อแต่ละวิธีมีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะเห็นได้ว่าผลเพาะเชื้อเป็นลบ (Negative) ของเสมหะคุณภาพดีจะมีสัดส่วนที่ต่ำกว่าผลลบของเสมหะคุณภาพไม่ดี ในขณะที่ผลบวก (Positive) ของตัวอย่างเสมหะคุณภาพดีมีสัดส่วนที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับผลบวกของตัวอย่างเสมหะคุณภาพไม่ดีอย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง L-J หรืออาหารเหลว MGIT ด้วยวิธี HS-SH หรือ วิธี NALC-NaOH ก็ตาม สำหรับผลที่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน (Contaminated) นั้น จะพบว่าส่วนใหญ่ตัวอย่างเสมหะคุณภาพดีมีสัดส่วนการปนเปื้อนต่ำกว่าตัวอย่างเสมหะคุณภาพไม่ดี ยกเว้นการเพาะเชื้อด้วยอาหารแข็ง L-J โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี HS-SH ที่พบว่าตัวอย่างเสมหะคุณภาพดีมีสัดส่วนการปนเปื้อนสูงกว่าตัวอย่างเสมหะ

คุณภาพไม่ดีอยู่เล็กน้อย จากผลที่ได้นี้ย่อมแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเสมหะที่มีคุณภาพดีมีผลอย่างยิ่งต่อการตรวจพบเชื้อ Mycobacteria ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาของ McCarter และคณะ⁽⁵³⁾ ศึกษาคุณภาพเสมหะกับผลเพาะเชื้อ Mycobacteria โดยแบ่งคุณภาพเสมหะออกเป็นระดับ Q1, Q2 และ Q3 อาศัยเกณฑ์จำนวนของ Squamous epithelial cell กับเม็ดเลือดขาว Neutrophil ที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุกำลังขยาย 10X โดยให้ Q1 เป็นเสมหะที่มีคุณภาพต่ำสุด พบ Squamous epithelial cell จำนวนมากและมีจำนวนเม็ดเลือดขาวจำนวนน้อย ขณะที่ Q3 เป็นเสมหะที่มีคุณภาพสูงสุดซึ่งตรวจไม่พบ Squamous epithelial cell เลย ผลการศึกษาพบว่าในจำนวนตัวอย่างเพาะเชื้อ Mycobacteria เป็นบวกทั้งหมดกลับพบว่าส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างเสมหะคุณภาพ Q1 ถึงร้อยละ 54.93 เป็นตัวอย่าง Q2 ร้อยละ 33.80 และเป็นตัวอย่าง Q3 น้อยที่สุดเพียงร้อยละ 11.27 ซึ่งผลการศึกษาสรุปว่าเกณฑ์ประเมินคุณภาพเสมหะที่ใช้ในงานเพาะเชื้อแบคทีเรียทั่วไปไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับการเพาะเชื้อ Mycobacteria และอีกหนึ่งการศึกษาของ Curione และคณะ⁽⁵⁴⁾ ใช้ Gram stain ประเมินคุณภาพเสมหะสำหรับเพาะเชื้อ Mycobacteria โดยแบ่งคุณภาพเสมหะจากน้อยไปมาก โดยใช้คะแนน 1 ถึง 5 ขึ้นกับจำนวน Squamous epithelial cell และเม็ดเลือดขาวที่ตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X ซึ่งคะแนน 1 และ 2 เป็นตัวอย่างน้ำลายไม่เหมาะสมกับการเพาะเชื้อแบคทีเรีย สำหรับคะแนน 3, 4 และ 5 เป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับเพาะเชื้อแบคทีเรีย ผลการศึกษาพบว่าในจำนวนตัวอย่างที่เพาะเชื้อ Mycobacteria เป็นบวกนั้น เป็นตัวอย่างที่คะแนนได้ 1 และ 2 จำนวน 8 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างที่ได้คะแนน 3, 4 และ 5 จำนวน 23 ตัวอย่าง แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม (P-value = 0.110) โดยการศึกษาของ Curione และคณะ ได้สรุปว่าไม่มีคัมค่าในการใช้ Gram stain ประเมินคุณภาพเสมหะสำหรับเพาะเชื้อ Mycobacteria จากทั้งสองงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น จะพบว่าวิธีการคำนวณเปรียบเทียบคุณภาพเสมหะกับผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria นั้น ใช้เฉพาะตัวอย่างที่ผลเพาะเชื้อเป็นบวก แล้วคิดสัดส่วนของตัวอย่างคุณภาพดีและไม่ดีเปรียบเทียบกัน โดยไม่ได้นำตัวอย่างที่ผลเพาะเชื้อเป็นลบ และผลเพาะเชื้อปนเปื้อน มาใช้ในการคำนวณดังเช่นงานวิจัยนี้ ดังนั้นผลสรุปที่ได้จึงมีความแตกต่างกับการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งในความเป็นจริงหากนำผลเพาะเชื้อทั้งหมดมาใช้พิจารณา ย่อมจะเห็นถึงความแตกต่างของผลเพาะเชื้อระหว่างตัวอย่างเสมหะที่มีคุณภาพและไม่มีคุณภาพ

ในการเปรียบเทียบเสมหะคุณภาพดีและไม่ดี กับผลเพาะเชื้อระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ดังตารางที่ 4.12 พบว่าผลเพาะเชื้อของเสมหะคุณภาพดีในอาหารแข็ง L-J ระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งผลเป็นไปในทางเดียวกัน

สำหรับการเปรียบเทียบสมหะคุณภาพไม่ดี ส่วนผลเปรียบเทียบในอาหาร MGIT ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของคุณภาพสมหะกับผลเพาะเชื้อของทั้งสองวิธีเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบคุณภาพของสมหะและผลเพาะเชื้อระหว่างวิธี HS-SH และ NALC-NaOH

อาหาร เลี้ยง เชื้อ	วิธี เตรียม ตัวอย่าง	คุณภาพ สมหะ	ผลเพาะเชื้อ (ร้อยละ)			รวม (ร้อยละ)	Chi square	P- value
			Negative	Positive	Contaminated			
L-J media	HS-SH	ดี	45 (36.00)	67 (53.60)	13 (10.40)	125 (100.00)	0.25	0.881
	NALC- NaOH	ดี	42 (33.60)	68 (54.40)	15 (12.00)	125 (100.00)		
	HS-SH	ไม่ดี	148 (49.00)	130 (43.05)	24 (7.95)	302 (100.00)	3.12	0.211
	NALC- NaOH	ไม่ดี	139 (60.03)	126 (41.72)	37 (12.25)	302 (100.00)		
MGIT media	HS-SH	ดี	33 (26.40)	82 (65.60)	10 (8.00)	125 (100.00)	0.46	0.795
	NALC- NaOH	ดี	31 (24.80)	81 (64.80)	13 (10.40)	125 (100.00)		
	HS-SH	ไม่ดี	111 (36.75)	156 (51.66)	35 (11.59)	302 (100.00)	3.47	0.176
	NALC- NaOH	ไม่ดี	104 (34.44)	147 (48.67)	51 (16.89)	302 (100.00)		

ตารางที่ 4.13 ระยะเวลาการตรวจพบเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ระยะเวลาการตรวจพบการเจริญของเชื้อ		Wilcoxon signed rank test (Z)	P-value
		Mean $\pm$ SD	Median (Min-Max)		
L-J media (n=187)	HS-SH	25.05 $\pm$ 8.45	21.00 (3-50)	-0.38	0.705
	NALC-NaOH	25.03 $\pm$ 8.31	21.00 (3-50)		
MGIT media (n=216)	HS-SH	9.82 $\pm$ 6.35	8.00 (3-40)	-1.59	0.111
	NALC-NaOH	9.64 $\pm$ 6.03	8.00 (2-33)		

ในการวิเคราะห์ระยะเวลาการตรวจพบเชื้อ Mycobacteria ตามตารางที่ 4.13 นั้น เนื่องจากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลระยะตรวจพบเชื้อทั้งอาหารแข็ง และอาหารเหลวด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH โดยสถิติ Kolmogorov-Smirnov พบว่าข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ ดังนั้นจึงต้องนำสถิติ Wilcoxon signed rank test มาใช้ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ซึ่งพบว่าระยะเวลาการตรวจพบเชื้อของวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยการตรวจพบเชื้อ Mycobacteria ของทั้งสองวิธี สำหรับอาหาร L-J อยู่ที่ประมาณ 25 วัน ในขณะที่อาหาร MGIT ตรวจพบเชื้อได้ไวกว่า มีระยะเวลาอยู่ที่ประมาณ 10 วัน ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hasan และคณะ⁽⁴⁸⁾ พบว่าระยะเวลาเฉลี่ยของการพบเชื้อวัณโรคในอาหาร L-J เท่ากับ 17.90 วัน (10-29 วัน) และอาหาร MGIT เท่ากับ 10.90 วัน (5-22 วัน) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Satti และคณะ⁽⁵⁵⁾ ที่พบว่าระยะเวลาเฉลี่ยในการตรวจพบเชื้อ Mycobacteria สำหรับอาหาร L-J และ MGIT เท่ากับ 28.30 วัน (16-52 วัน) และ 11.20 วัน (1-30 วัน) ตามลำดับ

เช่นเดียวกับระยะเวลาพบเชื้อเจริญ ค่า Growth Unit (GU) ของเชื้อที่เพาะในอาหารเหลวด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ตามตารางที่ 4.14 เมื่อทดสอบการแจกแจงข้อมูลโดยสถิติ Kolmogorov-Smirnov พบว่าข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ ดังนั้นจึงต้องนำสถิติ Wilcoxon signed rank test มาใช้ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ซึ่งพบว่าค่า GU ของเชื้อที่เตรียมตัวอย่างเสมหะด้วยวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4.14 ค่า Growth Unit ของเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเหลว MGIT

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ค่า Growth Unit		Wilcoxon signed rank test (Z)	P-value
		Mean $\pm$ SD	Median (Min-Max)		
MGIT media (n= 216)	HS-SH	3938.12 $\pm$ 6476.24	943.50 (0-31023)	-0.81	0.421
	NALC-NaOH	4220.00 $\pm$ 7056.25	969.00 (0-32650)		

4.2.3 การเปรียบเทียบผลตรวจ AFB และผลเพาะเชื้อ

ตารางที่ 4.15 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อรวมและผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB แยกตามประเภทผู้ป่วย

วิธีเตรียมตัวอย่าง	ประเภทผู้ป่วย	ผลตรวจ AFB/เพาะเชื้อ (ร้อยละ)						รวม (ร้อยละ)
		+/+	+/-	-/+	-/-	+/-c	-/-c	
HS-SH	Re-treatment	70 (58.33)	5 (4.17)	3 (2.50)	35 (29.17)	3 (2.50)	4 (3.33)	120 (100)
	On-treatment	39 (33.33)	50 (42.73)	8 (6.84)	16 (13.68)	4 (3.42)	0 (0.00)	117 (100)
	Pre-treatment	51 (61.45)	2 (2.41)	4 (4.82)	23 (27.71)	2 (2.41)	1 (1.20)	83 (100)
	New case	63 (58.88)	2 (1.87)	3 (2.80)	37 (34.58)	0 (0.00)	2 (1.87)	107 (100)
NALC-NaOH	Re-treatment	72 (60.00)	5 (4.17)	2 (1.67)	35 (29.16)	1 (0.83)	5 (4.17)	120 (100)
	On-treatment	35 (29.91)	51 (43.59)	7 (5.98)	16 (13.68)	7 (5.98)	1 (0.86)	117 (100)
	Pre-treatment	50 (60.24)	2 (2.41)	3 (3.61)	24 (28.92)	3 (3.61)	1 (1.21)	83 (100)
	New case	62 (57.95)	2 (1.87)	5 (4.67)	35 (32.71)	0 (0.00)	3 (2.80)	107 (100)

+ คือ Positive, - คือ Negative, c คือ ผลเพาะเชื้อ contaminated

จากตารางที่ 4.15 การเปรียบเทียบผล AFB กับผลเพาะเชื้อ จะเห็นได้ว่าทั้งสองวิธี คือ HS-SH และ NALC-NaOH ให้ผลคล้ายคลึงกัน โดยตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่ผล AFB เป็นบวกและเพาะเชื้อเป็นบวก (+/+) ซึ่งวิธี HS-SH พบร้อยละ 55.22 และวิธี NALC-NaOH พบร้อยละ 51.29 กับตัวอย่าง AFB เป็นลบและเพาะเชื้อเป็นลบ (-/-) ซึ่งวิธี HS-SH พบร้อยละ 26.00 และวิธี NALC-NaOH พบร้อยละ 25.76 เป็นที่น่าสังเกตว่าวิธี HS-SH ให้ผล AFB บวกทั้งหมด 291 ตัวอย่าง แต่กลับพบผลเพาะเชื้อบวกร้อยละ 76.63 ของตัวอย่าง AFB บวกทั้งหมด ส่วนวิธี NALC-NaOH ให้ผล AFB บวกทั้งหมด 290 ตัวอย่าง แต่กลับพบผลเพาะเชื้อบวกร้อยละ 75.51 ของตัวอย่าง AFB บวกทั้งหมด สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้ตัวอย่างเสมหะ AFB บวก แต่ผลเพาะเชื้อเป็นลบ (+/-) เนื่องมาจากตัวอย่างส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นผู้ป่วยประเภท On-treatment ซึ่งทานยาต้านวัณโรคอยู่ในช่วงเดือนที่ 2, 3 หรือ 5 ดังนั้นเชื้อ AFB ที่ตรวจพบในผู้ป่วยประเภทนี้บางตัวอย่างเป็นเชื้อที่ตายแล้ว จึงทำให้การเพาะเชื้อเป็นลบสูง โดยจะเห็นได้จากในตัวอย่างของผู้ป่วยประเภท On-treatment ทั้งหมด 117 ตัวอย่าง ที่ผล AFB บวกแต่เพาะเชื้อลบ (+/-) พบสูงถึงร้อยละ 42.73 สำหรับวิธี HS-SH และร้อยละ 43.59 สำหรับวิธี NALC-NaOH ในขณะที่ผู้ป่วยประเภทอื่นพบผล AFB บวกแต่ผลเพาะเชื้อเป็นลบ (+/-) ไม่เกินร้อยละ 5 และถ้าคิดเฉพาะตัวอย่าง AFB บวก ในผู้ป่วยประเภท On-treatment ซึ่งพบจำนวน 93 ตัวอย่าง เท่ากันทั้งวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH โดยพบว่าผลเพาะเชื้อเป็นบวกในกลุ่มที่ผล AFB เป็นบวกของผู้ป่วย On-treatment สำหรับวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH เท่ากับร้อยละ 41.94 และ 37.63 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lim และคณะ⁽⁵⁶⁾ ที่พบว่าตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยวัณโรคที่ผล AFB ยังเป็นบวกหลังรักษา 2 เดือน จำนวน 60 ตัวอย่าง เมื่อนำมาเพาะเชื้อกลับให้ผลเพาะเชื้อเป็นบวกเพียงร้อยละ 55.00 โดยอีกร้อยละ 45.00 ให้ผลเพาะเชื้อเป็นลบ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kang และคณะ⁽⁵⁷⁾ ที่ศึกษาผู้ป่วยวัณโรคที่ผลตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ยังบวกหลังรักษาเป็นระยะมากกว่าหรือเท่ากับ 5 เดือน พบว่าในตัวอย่างเสมหะที่ AFB ยังบวก จำนวน 41 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเพาะเชื้อบวกกับเชื้อวัณโรค 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 2.44) ในขณะที่พบว่าผลเพาะเชื้อเป็นลบ 33 ตัวอย่าง (ร้อยละ 80.49) และนอกจากนี้ยังพบผลเพาะเชื้อบวกเป็นเชื้อ NTM จำนวน 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 17.07)

4.2.4 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ และ ความถูกต้อง

ตารางที่ 4.16 ค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ และค่าความถูกต้อง ของการตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเชื้อ

ค่าสถิติ	การตรวจ AFB			การเพาะเชื้อ	
	Direct	HS-SH	NALC-NaOH	HS-SH	NALC-NaOH
ค่าความไว (%)	83.40	90.91	90.51	96.40	96.33
ค่าความจำเพาะ (%)	73.21	65.48	65.48	100.00	100.00
ค่าพยากรณ์ผลบวก (%)	82.42	79.86	79.79	100.00	100.00
ค่าพยากรณ์ผลลบ (%)	74.54	82.71	82.10	94.71	94.71
ค่าความถูกต้อง (%)	79.33	80.76	80.52	97.81	97.78

ในการคำนวณค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ ค่าความถูกต้อง เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจหา AFB ด้วยวิธีตรวจเสมหะโดยตรง (Direct smear) วิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH โดยใช้ผลเพาะเชื้อรวมเป็นวิธีอ้างอิง ซึ่งจำนวนตัวอย่างผลเพาะเชื้อรวมที่นำมาใช้เปรียบเทียบมีทั้งสิ้น 421 ตัวอย่าง เป็นผลเพาะเชื้อลบ 168 ตัวอย่าง และผลเพาะเชื้อบวก 253 ตัวอย่าง จากตัวอย่างเพาะเชื้อทั้งหมด 427 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากมีผลเพาะเชื้อที่มีการปนเปื้อนรวม (ปนเปื้อนทั้งวิธี HS-SH และ NALC-NaOH) จำนวน 6 ตัวอย่าง ผลการศึกษาซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.16 พบว่าวิธีเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH เป็นวิธีที่มีค่าความไว ค่าพยากรณ์ผลลบ และค่าความถูกต้องสูงสุด รองลงมาคือวิธี NALC-NaOH และวิธีตรวจโดยตรง ตามลำดับ สำหรับค่าความจำเพาะพบที่วิธีตรวจโดยตรงมีค่าสูงสุด ส่วนวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ให้ค่าความจำเพาะเท่ากัน ส่วนค่าพยากรณ์ผลบวกนั้นวิธีตรวจโดยตรงเป็นวิธีที่ให้ค่าสูงสุด รองลงมา คือวิธี HS-SH และ NALC-NaOH ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา โดยการศึกษา Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ พบว่าการตรวจ AFB นั้นวิธีที่มีค่าความไวสูงสุด คือ วิธี HS-SH ได้ค่าร้อยละ 71.40 รองลงมาคือวิธี NaLC-NaOH มีค่าความไวร้อยละ 66.70 และวิธีตรวจโดยตรงมีค่าความไวต่ำสุดร้อยละ 28.60 สำหรับความจำเพาะพบที่วิธีการตรวจโดยตรงมีค่าความจำเพาะสูงสุด เท่ากับร้อยละ 100.00 ขณะที่วิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH

มีค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 87.70 ส่วนค่าความถูกต้องหรือประสิทธิภาพการทดสอบ พบว่าวิธี HS-SH และวิธีตรวจโดยตรงมีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 84.00 รองลงมาเป็นวิธี NALC-NaOH มีค่าเท่ากับร้อยละ 83.00 ซึ่งในการศึกษาของ Ganoza และคณะ ใช้วิธีอ้างอิงเป็นผลเพาะเชื้อรวม เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ แม้ว่าค่าที่ได้จากการศึกษาของ Ganoza และคณะจะต่างจากค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่าค่าความไวของการศึกษาในครั้งนี้ มีค่าสูงกว่า แต่ความจำเพาะมีค่าต่ำกว่า ส่วนความถูกต้องนั้นมีค่าต่ำกว่าเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าผลของ Ganoza และคณะนั้น มีความสอดคล้องอย่างมากกับการศึกษาในครั้งนี้ ส่วนอีกหนึ่งการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ พบว่าค่าความไวของการตรวจ AFB ด้วยวิธี NALC-NaOH เท่ากับร้อยละ 75.00 ซึ่งสูงกว่าวิธี HS-SH ที่มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 73.50 แต่ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P-value = 0.349) สำหรับค่าความจำเพาะ และค่าพยากรณ์ผลลบของทั้งสองวิธีนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน โดยค่าความจำเพาะของวิธี HS-SH และ NALC-NaOH มีค่าเท่ากับร้อยละ 99.50 และ 99.30 ตามลำดับ ส่วนค่าพยากรณ์ผลลบมีค่าเท่ากับร้อยละ 94.10 และ 94.20 ตามลำดับ สำหรับค่าพยากรณ์ผลบวกพบว่าทั้งสองวิธีมีความแตกต่างทางสถิติ (P-value = 0.040) โดยวิธี HS-SH มีค่าเท่ากับร้อยละ 95.20 ซึ่งสูงกว่าวิธี NALC-NaOH ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 93.5 ค่าที่ได้จากการศึกษาของ Morcillo และคณะต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ โดยพบว่าการศึกษาของ Morcillo มีค่าความไวของวิธีตรวจแบบเข้มข้นทั้งสองวิธีต่ำกว่าการศึกษาในครั้งนี้ ขณะที่มีความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบสูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้

การคำนวณค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ ค่าความถูกต้อง ของการเพาะเชื้อนั้น สำหรับการเพาะเชื้อวิธี HS-SH ในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างที่สามารถนำมาคำนวณค่าได้จำนวน 411 ตัวอย่างจากตัวอย่างทั้งหมด 427 ตัวอย่าง ทั้งนี้เนื่องจากมีผลการปนเปื้อนรวมจำนวน 16 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ใช้คำนวณเป็นตัวอย่างที่ให้ผลเพาะเชื้อเป็นบวก 241 ตัวอย่าง และลบ 170 ส่วนวิธี NALC-NaOH มีตัวอย่างที่นำมาคำนวณได้จำนวน 406 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ผลเพาะเชื้อเป็นบวก 236 ตัวอย่าง และผลเพาะเชื้อเป็นลบ 170 ตัวอย่าง โดยวิธีอ้างอิงที่ใช้คำนวณ คือ ผลบวกรวมและผลลบรวมของการเพาะเชื้อทั้งสองวิธี เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลบวกและผลลบรวมของทั้งสองวิธี พบว่าทั้งสองวิธีให้ ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบเท่ากัน ทั้งนี้ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก นั้นมีค่าสูงถึงร้อยละ 100 สำหรับค่าความไว และค่าความถูกต้องของทั้งสองวิธีนั้นมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งวิธี HS-SH มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย รายละเอียดดังตารางที่ 4.15 โดยผลการศึกษาในครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Ganoza และคณะ⁽³⁴⁾ ที่พบว่าวิธี HS-SH มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 95.20 ซึ่งสูงกว่าวิธี NALC-NaOH ที่มีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 76.20 ในขณะที่ค่าความจำเพาะของทั้งสองวิธีนั้น

เท่ากับร้อยละ 100.00 สำหรับค่าความถูกต้องนั้นพบว่าวิธี HS-SH มีค่าเท่ากับร้อยละ 99.00 สูงกว่าวิธี NALC-NaOH ที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 95.00 ส่วนการศึกษาของ Morcillo และคณะ⁽³⁵⁾ พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้เช่นเดียวกัน โดยผลการศึกษาของ Morcillo และคณะ พบค่าความไว ค่าความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก ค่าพยากรณ์ผลลบ ของวิธี HS-SH เท่ากับร้อยละ 92.60, 100.00, 100.00 และ 98.80 ตามลำดับ ส่วนวิธี NALC-NaOH มีค่าเท่ากับร้อยละ 91.50, 99.80, 98.70 และ 98.60 ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้

4.3 ความคงตัวของน้ำยา HS-SH

การทดสอบความคงตัวของน้ำยา HS-SH นั้น ทำโดยประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH ที่เตรียมไว้ 1 เดือน เปรียบเทียบกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ ในการเตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นสำหรับตรวจ AFB (Concentrated smear) และการเพาะเชื้อ โดยใช้ตัวอย่างเสมหะทดสอบจำนวน 60 ตัวอย่าง โดยการประเมินนี้ใช้การเปรียบเทียบผลการตรวจ AFB และผลการเพาะเชื้อ ซึ่งคล้ายกับการประเมินประสิทธิภาพของน้ำยา HS-SH กับน้ำยามาตรฐาน NALC-NaOH

4.3.1 การตรวจ AFB

ผลการตรวจ AFB จากตัวอย่างเสมหะจำนวน 60 ตัวอย่าง ซึ่งมีผลการตรวจเสมหะโดยตรงเป็นบวก 30 ตัวอย่าง และเป็นลบ 30 ตัวอย่าง พบว่าวิธีตรวจเสมหะแบบเข้มข้นโดยใช้ น้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ และที่มีอายุ 1 เดือนนั้น ให้ผลการตรวจเป็นบวกร้อยละ 56.67 เท่ากัน โดยสูงกว่าการตรวจโดยตรงร้อยละ 6.67 ขณะที่ผลลบนั้นวิธีตรวจแบบเข้มข้นจากน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ และที่มีอายุ 1 เดือน ได้ผลร้อยละ 43.33 เท่ากัน ซึ่งต่ำกว่าวิธีตรวจโดยตรง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.17 สำหรับผลการศึกษานี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าวิธีตรวจเสมหะแบบเข้มข้นโดยใช้ น้ำยา HS-SH ให้สัดส่วนผลบวกสูงกว่าการตรวจเสมหะโดยตรง^(34,35)

ตารางที่ 4.17 ผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ระหว่างวิธีตรวจโดยตรงและวิธีเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

ผล AFB	Direct smear (ร้อยละ)	Concentrated smear	
		HS-SH เตรียมใหม่ (ร้อยละ)	HS-SH อายุ 1 เดือน (ร้อยละ)
Negative	30 (50.00)	26 (43.33)	26 (43.33)
Positive	30 (50.00)	34 (56.67)	34 (56.67)
Scanty (จำนวนเชื้อที่พบ)	11 (18.33)	0 (0.00)	0 (0.00)
1+	7 (11.67)	10 (16.67)	10 (16.67)
2+	2 (3.33)	7 (11.67)	7 (11.67)
3+	10 (16.67)	17 (28.33)	17 (28.33)
รวม	60 (100.00)	60 (100.00)	60 (100.00)

ผลการทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจ AFB ด้วยวิธีตรวจเสมหะโดยตรง และวิธีตรวจแบบเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ และที่มีอายุ 1 เดือน ตามตารางที่ 4.18 พบว่าวิธีการตรวจเสมหะมีความสัมพันธ์กับผล AFB grading อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} < 0.001$) เมื่อแยกวิเคราะห์ระหว่างวิธีการตรวจเสมหะโดยตรงกับวิธีตรวจแบบเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ พบว่าให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\text{-value} = 0.003$) โดยมีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.44 เป็นระดับความสัมพันธ์ที่ดี สำหรับผลวิเคราะห์ระหว่างวิธีการตรวจเสมหะโดยตรงกับวิธีตรวจแบบเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน ก็พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ ส่วนผลทดสอบระหว่างวิธีตรวจแบบเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ และที่มีอายุ 1 เดือน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P\text{-value} = 1.000$) ทั้งนี้เนื่องจากผล AFB grading ที่ได้จากการใช้น้ำยาทั้งสองแบบให้ผลที่ตรงกันทุกตัวอย่าง ซึ่งทำให้ค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 1.00 ซึ่งบ่งบอกว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับยอดเยี่ยม

ตารางที่ 4.18 การเปรียบเทียบผล AFB grading กับวิธีเตรียมสเมียร์เสมหะด้วยวิธีตรวจโดยตรงและวิธีเตรียมเสมหะเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผล AFB grading					รวม	% Agreement	Kappa	Chi square	P-value
	Negative	Scanty	1+	2+	3+					
Direct	30	11	7	2	10	60	-	-	28.41	<0.001*
HS-SH เตรียมใหม่	26	0	10	7	17	60				
HS-SH อายุ 1 เดือน	26	0	10	7	17	60				
Direct	30	11	7	2	10	60	60.00	0.44	16.41	0.003*
HS-SH เตรียมใหม่	26	0	10	7	17	60				
Direct	30	11	7	2	10	60	60.00	0.44	16.41	0.003*
HS-SH อายุ 1 เดือน	26	0	10	7	17	60				
HS-SH เตรียมใหม่	26	0	10	7	17	60	100.00	1.00	0.00	1.000
HS-SH อายุ 1 เดือน	26	0	10	7	17	60				

* มีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.05$

4.3.2 การเพาะเชื้อ Mycobacteria

การเพาะเชื้อ Mycobacteria จากตัวอย่างเสมหะจำนวน 60 ตัวอย่าง ด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ และที่มีอายุ 1 เดือน นั้น ในอาหาร L-J พบว่าวิธีเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ให้ผลบวกที่สูงกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน อยู่ร้อยละ 3.34 สำหรับผลเพาะเชื้อลบนั้น วิธีเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ให้ผลต่ำกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน ร้อยละ 3.34 ส่วนผลเพาะเชื้อที่มีการปนเปื้อนนั้น พบว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยาทั้งสองแบบให้ผลเท่ากันที่ร้อยละ 5.00 สำหรับอาหาร MGIT นั้น วิธีเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ให้ผลบวกที่สูงกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน ร้อยละ 3.33

โดยการเพาะเชื้อในอาหาร MGIT นั้นพบว่าให้ผลบวกที่สูงกว่าอาหาร L-J สำหรับผลเพาะเชื้อเป็นลบในอาหาร MGIT นั้น พบว่าน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ให้ผลลบต่ำกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน ร้อยละ 1.67 ส่วนผลเพาะเชื้อที่มีการปนเปื้อนพบว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือนมีสัดส่วนการปนเปื้อนที่สูงกว่าน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ร้อยละ 1.34 รายละเอียดดังตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ผลการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เตรียมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

ผลเพาะเชื้อ	L-J media (ร้อยละ)		MGIT media (ร้อยละ)	
	HS-SH เตรียมใหม่	HS-SH อายุ 1 เดือน	HS-SH เตรียมใหม่	HS-SH อายุ 1 เดือน
Negative	38 (63.33)	40 (66.67)	32 (53.33)	33 (55.00)
Positive	19 (31.67)	17 (28.33)	26 (43.33)	24 (40.00)
<50 โคโลนี	5 (8.33)	3 (5.00)	-	-
1+	1 (1.67)	1 (1.67)	-	-
2+	0 (0.00)	0 (0.00)	-	-
3+	3 (5.00)	3 (5.00)	-	-
4+	10 (16.67)	10 (16.67)	-	-
Contaminated	3 (5.00)	3 (5.00)	2 (3.34)	3 (5.00)
รวม	60	60	60	60

จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าผลการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่กับน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน มีความแตกต่างกันทั้งในอาหาร L-J และอาหาร MGIT แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติแล้วกลับพบว่าผลการเพาะเชื้อทั้งในอาหาร L-J และ อาหาร MGIT ด้วยน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่กับน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value = 0.949 และ 0.906 ตามลำดับ) โดยในอาหาร L-J มีค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.90 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ในระดับยอดเยี่ยม ส่วนอาหาร MGIT นั้นการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ทั้งสองแบบให้ค่าสถิติ Kappa เท่ากับ 0.78 ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ที่อยู่ในระดับยอดเยี่ยมเช่นเดียวกัน รายละเอียดดังตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 การเปรียบเทียบวิธีเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผลเพาะเชื้อ (ร้อยละ)			รวม (ร้อยละ)	% Agreement	Kappa	Fisher's exact test	P-value
		Negative	Positive	Contaminated					
L-J media	HS-SH เติร์ยมใหม่	38 (63.33)	19 (31.67)	3 (5.00)	60 (100.00)	95.00	0.90	0.26	0.949
	HS-SH อายุ 1 เดือน	40 (66.67)	17 (28.33)	3 (5.00)	60 (100.00)				
MGIT media	HS-SH เติร์ยมใหม่	32 (53.33)	26 (43.33)	2 (3.34)	60 (100.00)	88.33	0.78	0.37	0.906
	HS-SH อายุ 1 เดือน	33 (55.00)	24 (40.00)	3 (5.00)	60 (100.00)				

ในส่วนของการเพาะเชื้อ Mycobacteria ที่ตรวจพบจากการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่และน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน พบว่าเป็นเชื้อวัณโรคมากกว่าเชื้อ NTM โดยในอาหาร L-J พบว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่ ให้ผลบวกกับเชื้อวัณโรค และ NTM มากกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน อย่างละ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่ในอาหาร MGIT การเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ทั้งสองแบบ ให้ผลบวกกับเชื้อวัณโรคจำนวนเท่ากัน แต่สำหรับเชื้อ NTM การเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่ ให้ผลบวกมากกว่าการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน จำนวน 2 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่ สามารถตรวจพบเชื้อ NTM ได้มากกว่าน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน อยู่เล็กน้อย ในขณะที่อัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคนั้นแทบไม่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ชนิดของเชื้อจากตัวอย่างเพาะเชื้อ Positive ที่เพาะด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ผลเพาะเชื้อ Positive (ร้อยละ)		ตัวอย่างทั้งหมด (ร้อยละ)
		MTBC	NTM	
L-J media	HS-SH เติร์ยมใหม่	17 (28.33)	2 (3.33)	60 (100.00)
	HS-SH อายุ 1 เดือน	16 (26.67)	1 (1.67)	60 (100.00)
MGIT media	HS-SH เติร์ยมใหม่	20 (33.33)	6 (10.00)	60 (100.00)
	HS-SH อายุ 1 เดือน	20 (33.33)	4 (6.67)	60 (100.00)

ตารางที่ 4.22 ระยะเวลาการตรวจพบเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ระยะเวลาการตรวจพบการเจริญของเชื้อ		Wilcoxon signed rank test (Z)	P-value
		Mean $\pm$ SD	Median (Min-Max)		
L-J media (n=17)	HS-SH เติร์ยมใหม่	25.12 $\pm$ 7.03	21.00 (21-49)	0.00	1.000
	HS-SH อายุ 1 เดือน	25.12 $\pm$ 7.03	21.00 (21-49)		
MGIT media (n=22)	HS-SH เติร์ยมใหม่	12.23 $\pm$ 8.06	11.00 (3-35)	-0.74	0.457
	HS-SH อายุ 1 เดือน	12.45 $\pm$ 8.27	11.00 (3-35)		

จากตารางที่ 4.22 ในการเปรียบเทียบระยะเวลาการตรวจพบเชื้อ โดยวิธีการเพาะเชื้อด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน นั้น เนื่องจากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลระยะเวลาตรวจพบเชื้อทั้งอาหาร L-J และอาหาร MGIT ด้วยน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่ และน้ำยา HS-SH อายุ 1 เดือน โดยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าข้อมูลไม่มีการแจกแจงแบบปกติ ดังนั้นจึงต้องนำสถิติ Wilcoxon signed rank test มาใช้ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ซึ่งพบว่าระยะเวลาการตรวจพบเชื้อที่เพาะด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในอาหาร L-J และ MGIT (P-value = 1.000 และ 0.457 ตามลำดับ)

เช่นเดียวกับระยะเวลาพบเชื้อเจริญ ค่า Growth Unit (GU) ของเชื้อที่เพาะในอาหาร MGIT ด้วยน้ำยา HS-SH ที่เติร์ยมใหม่ และน้ำยา HS-SH อายุ 1 เดือน ข้อมูลค่า GU ที่ทดสอบโดยสถิติ Shapiro-Wilk พบว่าไม่มีการแจกแจงแบบปกติ ดังนั้นจึงต้องนำสถิติ Wilcoxon signed rank test มาใช้ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ซึ่งพบว่าค่า GU ของเชื้อที่เติร์ยมตัวอย่างเสมหะด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P-value = 0.935) รายละเอียดดังตารางที่ 4.23

ตารางที่ 4.23 ค่า Growth Unit ของเชื้อโดยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเหลว MGIT ด้วยน้ำยา HS-SH เติร์ยมใหม่ และ HS-SH อายุ 1 เดือน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	วิธีเตรียมตัวอย่าง	ค่า Growth Unit		Wilcoxon signed rank test (Z)	P-value
		Mean $\pm$ SD	Median (Min-Max)		
MGIT media (n= 22)	HS-SH เติร์ยมใหม่	8186.00 $\pm$ 9623.77	5012.50 (82-29964)	-0.08	0.935
	HS-SH อายุ 1 เดือน	5955.86 $\pm$ 8754.15	2599.50 (85-29402)		

จากผลการประเมินความคงตัวของน้ำยา HS-SH ผลที่ได้จะเห็นได้ว่าน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน มีประสิทธิภาพในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะเพื่อทำเสมียร์เสมหะแบบเข้มข้นเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ AFB และมีประสิทธิภาพในการเพาะเชื้อไม่ต่างกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่ ซึ่งน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่เองก็มีประสิทธิภาพไม่ต่างกับน้ำยามาตรฐาน NALC-NaOH ดังนั้นน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือนจึงมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับน้ำยามาตรฐาน NALC-NaOH ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้พบข้อดีของน้ำยา HS-SH ที่มีคุณสมบัติดีกว่าน้ำยามาตรฐาน NALC-NaOH ทั้งนี้เพราะน้ำยา NALC-NaOH นั้นหากเตรียมแล้ว ต้องใช้ภายใน 24 ชั่วโมง ไม่สามารถเก็บไว้ใช้ได้อีกเนื่องจากสาร NALC จะเสื่อมประสิทธิภาพ ดังนั้นหากเตรียมน้ำยาไว้มากเกิน จะทำให้น้ำยาเหลือและต้องทิ้งโดยเปล่าประโยชน์ ต่างกับน้ำยา HS-SH ที่เตรียมแล้วสามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 1 เดือน

4.4 ต้นทุนราคาน้ำยา HS-SH

การประเมินต้นทุนราคาทำโดยใช้ราคาสารเคมีที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ทำการจัดซื้อ โดยราคาสารเคมีที่ทำการจัดซื้อนั้นจะเป็นราคาของบริษัทที่เสนอราคาต่ำสุด ซึ่งเป็นไปตามระเบียบการจัดซื้อของทางราชการ โดยราคาสารเคมีที่ใช้คำนวณต้นทุนน้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH แสดงในตารางที่ 4.24

ตารางที่ 4.24 ชนิดและราคาของสารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH

รายการ	ขนาด	ราคา (บาท)
Sodium chloride (NaCl)	1,000 กรัม/ขวด	280
N-acetyl-L-cysteine powder	100 กรัม/ขวด	7,000
Sodium citrate dihydrate	500 กรัม/ขวด	260
Sodium hydroxide (NaOH)	1,000 กรัม/ขวด	500
น้ำกลั่น	6 ลิตร/ขวด	230

ตารางที่ 4.25 ต้นทุนน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ในการเตรียมปริมาตร 200 มิลลิลิตร

น้ำยา	ส่วนประกอบ	สารที่ใช้	ปริมาณที่ใช้	ราคา (บาท)
HS-SH	10% NaCl	NaCl	10 กรัม	2.80
		น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร	3.83
	4% NaOH	NaOH	4 กรัม	2.00
		น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร	3.83
	รวม			12.46
NALC-NaOH	NALC	N-acetyl-L-cysteine powder	1 กรัม	70.00
	2.9% Sodium citrate	Sodium citrate dihydrate	2.9 กรัม	1.51
		น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร	3.83
	4% NaOH	NaOH	4 กรัม	2.00
		น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร	3.83
	รวม			81.17

จากตารางที่ 4.25 แสดงให้เห็นถึงการคำนวณราคาต้นทุนของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ซึ่งปริมาตรที่ใช้คำนวณนั้นเท่ากับ 200 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นปริมาณน้ำยาที่ ห้องปฏิบัติการ วัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ เตรียมในแต่ละครั้งที่มีการเพาะเชื้อ เนื่องจากคิดคำนวณจากตัวอย่างเสมหะที่ปริมาตรเฉลี่ยประมาณ 5 มิลลิลิตร ดังนั้นน้ำยา 200 มิลลิลิตร จะสามารถใช้เพาะเชื้อได้ประมาณ 40 ตัวอย่าง (อัตราส่วนน้ำยาต่อเสมหะเท่ากับ 1:1) โดยปกติตัวอย่างที่ทำการเพาะเชื้อแต่ละครั้งจะอยู่ที่ประมาณ 30-40 ตัวอย่าง ซึ่งจากการคำนวณ ราคาต้นทุนจะเห็นได้ว่าการเพาะเชื้อ 40 ตัวอย่าง ต้นทุนน้ำยา HS-SH จะถูกกว่าน้ำยา NALC-NaOH ถึง 68.71 บาท

เมื่อพิจารณาต้นทุนน้ำยา HS-SH ที่เตรียมเอง และ NALC-NaOH ที่เตรียมเองต่อ 1 ตัวอย่าง โดยคิดปริมาตร 1 ตัวอย่างเท่ากับ 5 มิลลิลิตร จะพบว่าน้ำยา HS-SH มีต้นทุนที่ถูกกว่า น้ำยา NALC-NaOH ที่เตรียมเองประมาณ 6.5 เท่า และถูกกว่าน้ำยา NALC-NaOH ที่ซื้อสำเร็จรูป ประมาณ 123 เท่า รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4.26 ซึ่งถ้าคำนวณจากตัวอย่างเสมหะที่ ห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ เพาะเชื้อในแต่ละปี ประมาณ 1,500 ตัวอย่าง ซึ่งถ้าใช้น้ำยา HS-SH จะมีต้นทุนประมาณ 465 บาท ถ้าใช้น้ำยา NALC-NaOH ที่เตรียมเอง มีต้นทุน 3,045 บาท แต่ถ้าซื้อน้ำยา NALC-NaOH สำเร็จรูปของบริษัท จะมีต้นทุนถึง 57,000 บาท ซึ่งจะเห็นได้ว่าหากเปลี่ยนมาใช้น้ำยา HS-SH จะลดต้นทุนน้ำยาเพาะเชื้อ ได้ 2,580 บาท เมื่อเทียบกับราคาน้ำยา NALC-NaOH ที่เตรียมเอง และลดต้นทุนน้ำยาเพาะเชื้อได้ถึง 56,535 บาท เมื่อเทียบกับราคาน้ำยา NALC-NaOH สำเร็จรูปที่ซื้อจากบริษัท

ตารางที่ 4.26 ต้นทุนน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH ที่ใช้ต่อตัวอย่างเสมหะ 1 ตัวอย่าง

น้ำยา	ราคาต่อการทดสอบ 1 ตัวอย่าง (บาท)
HS-SH (เตรียมใช้เอง)	0.31
NALC-NaOH (เตรียมใช้เอง)	2.03
NALC-NaOH (ซื้อสำเร็จรูป)	38

4.5 ข้อดีและข้อด้อยของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH

ตารางที่ 4.27 เปรียบเทียบข้อดีข้อด้อยของน้ำยา HS-SH และ NALC-NaOH

ข้อเปรียบเทียบ	น้ำยา HS-SH	น้ำยา NALC-NaOH
การเตรียมสาร	เตรียมไม่ยุ่งยาก ใช้ชนิดของสารเคมี น้อย ไม่ต้องระวังการปนเปื้อน ขณะเตรียม เพราะเมื่อเตรียมเสร็จ สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้	ค่อนข้างยุ่งยากในการเตรียม ใช้ชนิดของสารมากกว่า และต้องระวัง การปนเปื้อนเนื่องจากสาร NALC ไม่สามารถนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้
การทำสเมียร์ เสมหะเข้มข้น	ให้ผลสเมียร์ AFB เป็นบวกที่สูงกว่า วิธีตรวจโดยตรง	ให้ผลสเมียร์ AFB เป็นบวกที่สูงกว่าวิธี ตรวจโดยตรง
การเพาะเชื้อ	ขณะผสมน้ำยากับตัวอย่างสามารถ Vortex ได้นานจนตัวอย่างเมื่อกล ลายเป็นเนื้อเดียวกัน	ขณะผสมน้ำยากับตัวอย่างต้อง ระมัดระวังการ Vortex ไม่ควรเกิน 20 วินาที เพราะจะทำให้สาร NALC เกิดปฏิกิริยา Oxidation และสูญเสีย คุณสมบัติการย่อยเสมหะได้
อายุของน้ำยา	น้ำยาที่เตรียมพร้อมใช้งานสามารถ เก็บได้นาน 1 เดือน	น้ำยาที่เตรียมพร้อมใช้งานเก็บไว้ได้ ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เนื่องจากสาร NALC จะสูญเสียคุณสมบัติการย่อยเสมหะ
ต้นทุนราคา น้ำยา	ราคาถูก	ราคาแพงกว่าน้ำยา HS-SH

จากตารางที่ 4.27 จะเห็นได้ว่าน้ำยา HS-SH มีข้อดีหลายประการที่เหนือกว่าน้ำยา NALC-NaOH อีกทั้งจากผลการประเมินประสิทธิภาพก็พบว่าน้ำยา HS-SH ให้ผลการตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB และให้ผลการเพาะเชื้อที่ไม่แตกต่างกับน้ำยา NALC-NaOH ดังนั้นน้ำยา HS-SH จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้แทนน้ำยา NALC-NaOH สำหรับห้องปฏิบัติการ ในการเตรียมตัวอย่างแบบเข้มข้นสำหรับตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อ Mycobacteria

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เชื้อ Mycobacteria เป็นเชื้อแบคทีเรียสำคัญที่ก่อโรคในคน โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคที่ยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขของหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีปัญหาของวัณโรคดื้อยาร่วมด้วย นอกจากเชื้อวัณโรคแล้วยังพบว่ามีเชื้อ Mycobacteria กลุ่ม NTM ที่พบสามารถก่อโรคได้ในคน และพบอัตราเพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศ รวมถึงประเทศไทย^(13,58) โดยในการวินิจฉัยจำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งวิธีการตรวจเบื้องต้น คือ การตรวจหาเชื้อ AFB เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว แต่ไม่สามารถแยกแยะระหว่างเชื้อวัณโรค และ NTM ได้ ส่วนวิธีมาตรฐานในปัจจุบันยังคงเป็นวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งมีความไวสูง สามารถแยกเชื้อวัณโรคและ NTM ได้ และที่สำคัญคือบ่งบอกการมีชีวิตของเชื้อ AFB ที่ตรวจพบได้ จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ตรวจติดตามการรักษา แม้ปัจจุบันจะมีการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคและ NTM แต่วิธีนี้ยังมีปัญหาเรื่องอุปกรณ์ และน้ำยาที่มีราคาแพง และไม่สามารถแยกเชื้อที่มีชีวิตและเชื้อตายได้ ดังนั้นวิธีการตรวจหาเชื้อ AFB และการเพาะเชื้อจึงยังคงมีความสำคัญต่อวินิจัยเชื้อ Mycobacteria

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบน้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ AFB ในตัวอย่างเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และในการเพาะเชื้อ Mycobacteria นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วย ได้แก่ Re-treatment, On-treatment, Pre-treatment และ New case กับผลการตรวจหาเชื้อ AFB ในตัวอย่างเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ และผลการเพาะเชื้อ โดยใช้น้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเตรียมตัวอย่าง และศึกษาความสัมพันธ์ของคุณภาพเสมหะกับผลการตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และผลการเพาะเชื้อ โดยใช้น้ำยา HS-SH และน้ำยา NALC-NaOH ในการเตรียมตัวอย่าง การศึกษาวิจัยนี้เป็นวิจัยเชิงทดลองทดลอง ใช้กลุ่มตัวอย่างเสมหะของโรงพยาบาลในเขตพื้นที่รับผิดชอบของ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์ ซึ่งรับผิดชอบ 5 จังหวัด ได้แก่ นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท กำแพงเพชร และพิจิตร การศึกษาทำโดยนำตัวอย่างเสมหะมาตรวจ AFB โดยตรง และประเมินคุณภาพเสมหะไปพร้อมกัน จากนั้นแบ่งตัวอย่างเสมหะออกเป็นสองส่วนเท่ากันเพื่อนำไปเตรียมตัวอย่างแบบเข้มข้นด้วยน้ำยา HS-SH กับน้ำยา NALC-NaOH สำหรับการตรวจเสมหะแบบเข้มข้น และการเพาะเชื้อด้วยอาหารแข็งและอาหารเหลว นอกจากนี้ยังทำการทดสอบความคงตัวของน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใหม่กับน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือน โดยประเมินจากผลการตรวจเสมหะแบบเข้มข้น และผลการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง และ

อาหารเหลว และในการศึกษานี้ยังได้คำนวณราคาต้นทุนของน้ำยา HS-SH เทียบกับน้ำยา NALC-NaOH เพื่อประเมินความคุ้มค่าของน้ำยา HS-SH ที่จะนำมาใช้งานจริง

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าน้ำยา HS-SH มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐาน NALC-NaOH ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ในด้านการเตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB นั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติของการตรวจเสมหะแบบเข้มข้นของทั้งสองวิธี อีกทั้งสองวิธียังให้ผลบวกสูงกว่าการตรวจเสมหะโดยตรง ซึ่งผลทดสอบทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นสำหรับห้องปฏิบัติการทางด้าน Mycobacteria ที่มีความพร้อมของสถานที่และอุปกรณ์ควรทำการตรวจเสมหะแบบเข้มข้นด้วยเพราะเป็นวิธีที่มีความค่าไและความถูกต้องสูงกว่าวิธีการตรวจโดยตรง สำหรับผลการเพาะเชื้อ Mycobacteria ในอาหารแข็งและอาหารเหลว เมื่อเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อ ระยะเวลาที่ตรวจพบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และค่า GU ของเชื้อที่เพาะในอาหารเหลว ด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลเพาะเชื้อของทั้งสองวิธีกับคุณภาพเสมหะทั้งดีและไม่ดี พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน ในการประเมินค่าความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลลบ และค่าพยากรณ์ผลบวกของทั้งการตรวจเสมหะแบบเข้มข้น และการเพาะเชื้อ ด้วยวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH ก็พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าที่ใกล้เคียงกันมาก สำหรับการแยกวิเคราะห์ตัวอย่างตามกลุ่มผู้ป่วย พบว่าทั้งผลการตรวจเสมหะด้วยวิธีเข้มข้นและผลการเพาะเชื้อ ระหว่างวิธี HS-SH และวิธี NALC-NaOH ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธี HS-SH สามารถนำไปใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะเข้มข้นสำหรับการตรวจ AFB และการเพาะเชื้อได้กับผู้ป่วยทั้ง 4 กลุ่ม ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

สำหรับในด้านความคงตัวของน้ำยา HS-SH นั้น พบว่าน้ำยา HS-SH ที่มีอายุ 1 เดือนนั้น มีประสิทธิภาพเทียบเท่าน้ำยาที่เตรียมใหม่ทั้งในด้านการเตรียมเสมหะเข้มข้นเพื่อตรวจ AFB และการเพาะเชื้อ Mycobacteria ในส่วนของต้นทุนน้ำยานั้นพบว่าน้ำยา HS-SH ที่เตรียมใช้เองมีต้นทุนเพียง 0.31 บาทต่อหนึ่งการทดสอบ เมื่อคิดปริมาณเสมหะที่หนึ่งการทดสอบเท่ากับ 5 มิลลิกรัม โดยน้ำยา HS-SH มีต้นทุนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับน้ำยา NALC-NaOH ที่เตรียมเองและที่ซื้อสำเร็จรูป ดังนั้นน้ำยา HS-SH จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะแบบเข้มข้นเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ AFB และ เพาะเชื้อ Mycobacteria ซึ่งจะช่วยลดภาระงานเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องเตรียมน้ำยาบ่อยครั้ง อีกทั้งมีขั้นตอนการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากและไม่เสื่อมสภาพเร็วเหมือนน้ำยามาตรฐาน NALC-NaOH ที่มีอายุเพียงแค่ 24 ชั่วโมง ที่สำคัญคือช่วยลดต้นทุนการตรวจลงได้

ข้อค้นพบอื่นของการศึกษานี้คือ ในด้านของคุณภาพเสมหะ ทั้งผลการตรวจ AFB และผลการเพาะเชื้อ พบว่าเสมหะคุณภาพดีให้ผลการตรวจเป็นบวกในสัดส่วนที่สูงกว่าเสมหะคุณภาพ

ไม่ดี ดังนั้นการเก็บเสมหะ ซึ่งเป็นกระบวนการก่อนการวิเคราะห์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการตรวจหาเชื้อ Mycobacteria ทางห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเจ้าหน้าที่ผู้รับผิดชอบให้คำแนะนำผู้ป่วยในการเก็บเสมหะจะต้องอธิบายขั้นตอนการเก็บที่ถูกต้องให้ผู้ป่วยเข้าใจ เพื่อให้ได้เสมหะที่มีคุณภาพ ซึ่งการเก็บเสมหะควรเก็บทันทีเมื่อตื่นนอนตอนเช้า (Early morning sputum) จะได้เสมหะที่มีคุณภาพดีกว่าการเก็บในช่วงเวลาอื่น สำหรับข้อค้นพบอีกประการหนึ่งในการศึกษานี้ คือ จากผลการเพาะเชื้อ พบสัดส่วนของเชื้อ NTM อยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 14-20 ของเชื้อ Mycobacteria ทั้งหมด ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญ ที่ชี้ให้เห็นว่าผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจติดเชื้อ NTM ซึ่งไม่ใช่วัณโรค ทั้งนี้เพราะการวินิจฉัยและรักษาวัณโรคในประเทศไทยยังคงใช้การตรวจเสมหะหาเชื้อ AFB เป็นหลัก เนื่องจากมีความรวดเร็ว ทำได้ง่าย สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการของทุกโรงพยาบาล แต่อย่างไรก็ตามการตรวจ AFB ไม่สามารถแยกระหว่างเชื้อวัณโรคและเชื้อ NTM ได้ จึงจำเป็นต้องส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่เสมหะยังคงพบเชื้อ AFB หลังจากรับการรักษาด้วยยาวัณโรคครบ 3 เดือน หรือ ผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นวัณโรคซ้ำจากการตรวจ AFB ทั้งนี้เพราะหากวินิจฉัยผิดพลาดจะส่งผลต่อการรักษาผู้ป่วย เนื่องจากโดยธรรมชาติเชื้อ NTM จะดื้อต่อยารักษาวัณโรค⁽⁵⁹⁾ ดังนั้นหากทำการวินิจฉัยวัณโรคจาก AFB เพียงอย่างเดียวจะทำให้มีผู้ป่วยบางส่วนซึ่งติดเชื้อ NTM ได้รับการรักษาด้วยยาวัณโรค ซึ่งจะส่งผลเสียต่อผู้ป่วยโดยตรง เพราะได้รับการรักษาที่ไม่ถูกต้อง

รายการอ้างอิง

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. Geneva: WHO; 2016.
2. สำนักงานหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ. คู่มือบริหารกองทุนหลักประกันสุขภาพแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2560: การบริหารงบบริการผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์และการบริหารงบผู้ป่วยวัณโรค. กรุงเทพฯ: ห้างหุ้นส่วนจำกัดแสงจันทร์การพิมพ์; 2559.
3. สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค. แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ. 2556. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2556.
4. Sribenjalux P, Rukket P, Abdullah M, Tavichakorntrakool R, Saisud P, Charoensri N. Comparison of direct smear and concentrated sputum samples for AFB staining in Thamod and Klonghoykong hospital. J Med Tech Phy Ther. 2011;23:259-64.
5. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:1376-95.
6. Asiimwe B. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Kampala, Uganda: Karolinska Institutet and Makerere University; 2008.
7. Emmanuel FX, Seagar AL, Doig C, Rayner A, Claxton P, Laurenson I. Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis. 2007;13:1924-7.
8. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:1305-14.
9. Kriz P, Kralik P, Slany M. *Mycobacterium pinnipedii* in a captive southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. Vet Med. 2011;56:307-13.
10. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. 2002; 99:3684-9.
11. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, Helden PDV, Warren RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerg Infect Dis. 2010;16:1296-9.

12. American Thoracic Society. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367-416.
13. Gopinath K, Singh S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: Are we neglecting the danger? *PloS Negl Trop Dis.* 2010;4:e615.
14. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* 2006;77:5-24.
15. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2001;20:21-54.
16. Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis.* 2014;6:210-20.
17. Stout JE, Koh W, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis.* 2016;45:123-34.
18. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: CDC; 1985.
19. Sribenjalux P, Rukket P, Abdullah M, Tavichakorntrakool R, Saisud P, Charoensri N. Comparison of direct smear and concentrated sputum samples for AFB staining in Thamod and Klonghoykong hospital. *J Med Tech Phy Ther.* 2011; 23:259-64.
20. World Health Organization. TB diagnostics and laboratory strengthening-WHO policy: the use of liquid medium for culture and DST. Geneva, Switzerland: WHO; 2007.
21. Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev.* 2006;86:245-78.
22. Rogers DF. Mucoactive agents for airway mucus hypersecretory diseases. *Respir Care.* 2007;52:1176-97.
23. Hopkinscf.org. Science of CF: Lung problems: Bacteria [Internet]. Johns Hopkins Cystic Fibrosis Center; 2017 [cited 2017 Aug 14]. Available from: <http://www.hopkinscf.org/what-is-cf-teen/science-of-cf-teen/lung-problems-teen/bacteria-teen/>

24. Cukic V. The most common detected bacteria in sputum of patients with the acute exacerbation of COPD. *Mater Sociomed.* 2013;25:226-9.
25. Chihota VN, Grant AD, Fielding K, Ndibongo B, van Zyl A, Muirhead D, et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14:1024–31.
26. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4167-70.
27. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control part III: culture. Geneva: WHO; 1998.
28. Maciel ELN, do Prado TN, Peres RL, Palaci M, Johnson JL, Dietze R. Guided sputum sample collection and culture contamination rates in the diagnosis of pulmonary TB. *J Bras Pneumol.* 2009;35:460-3.
29. Pardini M, Varaine F, Iona E, Arzumanyan E, Checchi F, Oggioni MR, et al. Cetylpyridinium chloride is useful for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from sputa subjected to long-term storage. *J Clin Microbiol.* 2005;43:442-4.
30. Sankar MM, Kumar P, Munawwar A, Singh J, Parashar D, Singh S. Recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum treated with cetyl pyridinium chloride. *J Clin Microbiol.* 2009;47:4189-90.
31. Gautam G, Singh TSK, Sharma TD, Ghimire M, Regmi SM. Decontamination of sputum sample for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *J GMC-Nepal.* 2010;3:32-5.
32. Ricaldi JN, Guerra H. A simple and improved method for diagnosis of tuberculosis using hypertonic saline and sodium hydroxide (HS-SH) to concentrate and decontaminate sputum. *Trop Doct.* 2008;38:97-9.
33. Elkins MR, Bye PTP. Mechanisms and applications of hypertonic saline. *J R Soc Med.* 2011;104:S2-S5.
34. Ganoza CA, Ricaldi JN, Chauca J, Rojas G, Munayco C, Agapito J, et al. Novel hypertonic saline-sodium hydroxide (HS-SH) method for decontamination and

concentration of sputum samples for *Mycobacterium tuberculosis* microscopy and culture. J Med Microbiol. 2008;57:1094-8.

35. Morcillo N, Imperiale B, Palomino JC. New simple decontamination method improves microscopic detection and culture of mycobacteria in clinical practice. Infect Drug Resist. 2008;1:21-6.

36. Chaudhary SK, Mishra B. Comparison of hypertonic saline-sodium hydroxide method with modified Petroff's method for the decontamination and concentration of sputum samples. Int J Infect Microbiol. 2013;2:78-81.

37. Someshwaran R, Deshpande SA, Gnanaprakash K. Evaluation of sputum decontamination methods to facilitate the *Mycobacterium tuberculosis* detection in a tertiary care hospital. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016;5:889-94.

38. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค. แนวทางการดำเนินงานด้านชันสูตรวัณโรคแห่งชาติ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2546.

39. World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control part II: microscopy. Geneva: WHO; 1998.

40. Umesh H, Nitin S. Correlation of various criteria for sputum quality with AFB smears positivity. Pak J Med Sci. 2013;3:30-34.

41. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide: sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. 5th ed. Paris: IUATLD; 2000.

42. Gordis L. Epidemiology. 5th ed. Philadelphia (PA): Elsevier Saunders; 2013.

43. Banda HT, Harries AD, Boeree MJ, Nyirenda TE, Banerjee A, Salaniponi FML. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture. Int J Tuberc Lung Dis. 2000;4:272-4.

44. Rashid I, Mabuza LH, Ovender I, Pretorius D. Volume of sputum to detect acid-fast *bacilli* as a measure of quality for the diagnosis of pulmonary tuberculosis at the Dr George Mukhari Hospital, South Africa. Afr J Prim Health Care Fam Med. 2011;3:240.

45. Uddin MKM, Chowdhury MR, Ahmed S, Rahman MT, Khatun R, van Leth F, et al. Comparison of direct versus concentrated smear microscopy in detection of pulmonary tuberculosis. *BMC Res Notes*. 2013;6:291.
46. Kumar JAJU, Dhar C, Srinivasa H. Revisiting acid-fast bacilli microscopy of concentrated sputum smears as an efficient tool for the diagnosis of tuberculosis: a study from a tertiary care centre in Southern India. *J Tuberc Res*. 2017;5:146-54.
47. Lee YJ, Shin S, Roh EY, Yoon JH, Kim DK, Chung HS, et al. Acceptability of sputum specimens for diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci*. 2015;30:733-6.
48. Hasan M, Munshi SK, Momi MSB, Rahman F, Noor R. Evaluation of the effectiveness of BACTEC MGIT 960 for the detection of mycobacteria in Bangladesh. *Int J Mycobacteriol*. 2013;2:214-9.
49. Jain S, Sankar MM, Sharma N, Sarman Singh S, Chugh TD. High prevalence of non-tuberculous mycobacterial disease among non-HIV infected individuals in a TB endemic country - experience from a tertiary center in Delhi, India. *Pathog Glob Health*. 2014;108:118-22.
50. Yoo J, Jo K, Kim MN, Lee SD, Kim WS, Kim DS, Shim TS. Increasing trend of isolation of non-tuberculous mycobacteria in a tertiary university hospital in South Korea. *Tuberc Respir Dis*. 2012;72:409-15.
51. Bodle EE, Cunningham JA, Della-Latta P, Schluger NW, Saiman L. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria in patients without HIV infection, New York City. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:390-6.
52. Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, McNelly E, Winthrop K. Nontuberculous mycobacteria disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*. 2009;49:124-9.
53. McCarter YS, ROBINSON A. Quality evaluation of sputum specimens for mycobacterial culture. *Clin Microbiol Infect Dis*. 1996;105:769-73.
54. Curione CJ, JR, Kaneko GS, Voss JL, Hesse F, Smith RF. Gram stain evaluation of the quality of sputum specimens for mycobacterial culture. *J Clin Microbiol*. 1977;5:381-2.

55. Satti L, Ikram A, Abbasi S, Butt T, Malik N, Mirza IA. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Pakistan. Malays J Microbiol. 2010;6:203-8.
56. Lim CS, Lee CH, Chien YJ, Wang JY, Lee LN, Yu CJ, Yang PC. Culture result of smear-positive sputum samples after 2 months of antituberculous treatment. Eur Respir J. 2010;35:218-20.
57. Kang HK, Jeong BH, Lee H, Park HY, Jeon K, Huh HJ, , et al. Clinical significance of smear positivity for acid-fast bacilli after ≥ 5 months of treatment in patients with drug-susceptible pulmonary tuberculosis. Medicine. 2016; 95:31.e4540.
58. Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Mootsikapun P, Assanasen S, Chaiwarith R, Anunnatsiri S. Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. Clin Infect Dis. 2007;45:421-7.
59. Wang X, Li H, Jiang G, Zhao L, Ma Y, Javid B, et al. Prevalence and drug resistance of nontuberculous mycobacteria, Northern China, 2008–2011. Emerg Infect Dis. 2014;20:1252-3.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายอนุกุล บุญคง
วันเดือนปีเกิด	20 กุมภาพันธ์ 2527
วุฒิการศึกษา	ปีการศึกษา 2548: วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีการศึกษา 2554: นิติศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช
ตำแหน่ง	นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์
ทุนการศึกษา	ปีงบประมาณ 2559: ทุนสนับสนุนการวิจัยประเภททุน วิจัยทั่วไปสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลงานทางวิชาการ

อนุกุล บุญคง. การใช้ชุดทดสอบ Immunochromatography พิสูจน์ชนิดของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex ในห้องปฏิบัติการวัณโรค สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 8 จังหวัดนครสวรรค์. วารสารโรคและภัยสุขภาพ สคร. 8. มิ.ย.-ก.ย. 2557;8(3):20-7.

อนุกุล บุญคง. การพิสูจน์ชนิดของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex แบบเร็ว ในตัวอย่างเพาะเชื้อจากเลือด. วารสารโรคและภัยสุขภาพ สคร. 8. ต.ค. 2557-ม.ค. 2558;9(1):18-25.

อนุกุล บุญคง. ประสิทธิภาพของเครื่อง MGIT 960 system ในการทดสอบความไวต่อยาวัณโรค แนวที่ 1. วารสารโรคและภัยสุขภาพ สคร. 3. ก.พ.-พ.ค. 2559;10(2):30-7.

อนุกุล บุญคง. ความไม่น่าเชื่อถือในการใช้การเกิด Cord พิสูจน์ชนิดเบื้องต้นของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex. วารสารโรคและภัยสุขภาพ สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์. ต.ค. 2559-ม.ค. 2560;11(1):11-9.

อนุกุล บุญคง. สถานการณ์และแนวโน้มของเชื้อมัยโคแบคทีเรียก่อโรค ที่ตรวจพบจากตัวอย่างเพาะเชื้อจากเลือด ในเขตพื้นที่ภาคกลางตอนบนของประเทศไทย. การสัมมนาโรคระบาดวิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 23; วันที่ 7-11 ส.ค. 2560; เชียงใหม่. น.113.

ประสบการณ์ทำงาน

2550-ปัจจุบัน: นักเทคนิคการแพทย์ชำนาญการ
สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 3 จังหวัดนครสวรรค์
2549-2550: นักเทคนิคการแพทย์
โรงพยาบาลบ้านไร่ จังหวัดอุทัยธานี

