

รายงานการประมวลองค์ความรู้
เกี่ยวกับวัณโรคและโรคติดเชื้อ
Non-tuberculous Mycobacterium

สนับสนุนโดย
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

วัตถุประสงค์.....	3
ผู้ดำเนินการ	3
การดำเนินการ	5
สรุปประเด็นการวิจัยที่สำคัญเกี่ยวกับวัณโรคและโรคติดเชื้อ MYCOBACTERIUM อื่นๆ	6
รายงานประมวลงค์ความรู้บางหัวข้อ	11
การวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ.....	11
TUBERCULOSIS : COMPLIANCE AND DOTS.....	49
สาเหตุของการรักษาวัณโรคล้มเหลว	57
แนวโน้มของการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MULTIDRUG RESISTANT TUBERCULOSIS: MDR-TB)	62
การแสวงหายารักษาวัณโรคใหม่ๆ.....	75
พันธุศาสตร์ของเชื้อวัณโรคและ MYCOBACTERIUM อื่นๆ	78
SPECIFICITY AND FUNCTION OF T-AND B-CELL RECOGNITION IN TUBERCULOSIS.....	83
ผลกระทบของโรคเอดส์และการใช้สารเสพติดต่อการแพร่กระจายของวัณโรคและโรคติดเชื้อ NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA	91
มาตรการในการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อวัณโรคในสถานพยาบาล	100
NOSOCOMIAL TRANSMISSION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	117
การใช้วิธีการทางอณูพันธุศาสตร์ในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อวัณโรค	124
บททวนองค์ความรู้และเสนอประเด็นการวิจัยทางเศรษฐศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับวัณโรคและการติดเชื้อ MYCOBACTERIUM อื่นๆ	129
SOCIAL SCIENCE RESEARCH IN TUBERCULOSIS	133
รายการปัญหาการวิจัยที่อาจจะต้องมีการดำเนินการในประเทศไทย.....	135
รายนามเอกสารการวิจัยที่มีการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติซึ่งคนไทยมีส่วนร่วมทำการศึกษา หรือทำในประเทศไทย หรือทำกับตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย เท่าที่มีการอ้างอิงในฐานข้อมูล PUBMED นับตั้งแต่พ.ศ. จนถึงพ.ศ. 2541	138
1998	138
1997	141
1996	145
1995	151
1994	154
1993	156

1992	158
1991	160
1990	163
1989	167
1988	169
1987	170
1986	170
1985	171
1984	172
1983	172
1982	172
1981	173
1980	173
1979	174
1978	174
1977	174
1976	174
1975	174
1974	174
1973	175
1972	175
1971	175
1970	175
1967	175
1965	175

การดำเนินการโครงการประมวลองค์ความรู้เกี่ยวกับวัณโรค และโรคติดเชื้อ Non-tuberculous mycobacteria

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสถานภาพปัญหาด้านการแพร่ระบาด การป้องกันและรักษาในประเทศไทย
2. ประมวลผลการวิจัยในด้านต่าง ๆ ที่จะนำไปสู่การควบคุมวัณโรคตั้งแต่ทางด้านสังคมวิทยา พฤติกรรมศาสตร์ ระบาดวิทยา อายุรศาสตร์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ตลอดจนถึงวิทยาศาสตร์พื้นฐานและเทคโนโลยีชีวภาพ
3. สังเคราะห์และเสนอแนะแนวทางการวิจัยที่จะนำไปสู่การควบคุมวัณโรคและการดูแลผู้ป่วยวัณโรคและผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTM ที่สำคัญอย่างเหมาะสม

ผู้ดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ

นายประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้ร่วมโครงการ

นายยุทธชัย เกษตรเจริญ ผู้อำนวยการศูนย์วัณโรคเขต 12 จังหวัดยะลา
นางอังคณา ฉายประเสริฐ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล
นายเจริญ ชูโชติถาวร ฝ่ายอายุรกรรม โรงพยาบาลโรคทรวงอก กรมควบคุมโรคติดต่อ
กระทรวงสาธารณสุข
นางบุษบัน เชื้ออินทร์ กองโรคเรื้อน กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข

ที่ปรึกษา

นายแพทย์นัดดา ศรียาภัย ที่ปรึกษากองการอนามัยโลก
ศาสตราจารย์บัญญัติ ปริญญานนท์ ประธานกรรมการกลางสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ใน
พระบรมราชูปถัมภ์
นายแพทย์วัลลภ ปายะนันท์ ผู้อำนวยการกองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสา
ธารณสุข
ศาสตราจารย์ชัยเวช นุชประยูร ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย

ผู้เชี่ยวชาญอื่นที่ร่วมประชุมให้ความคิดเห็น

ดร. กัญญลักษณ์ ชัยคำภา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง
จ.ขอนแก่น
รศ.นพ.ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ สงขลา

นพ.ครรชิต ลิ้มปกาณัญจนรัตน์	ศูนย์ความร่วมมือวิจัยโรคเอดส์ ชั้น 2 อาคารกรมการแพทย์ 6 ถนนติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
คุณจินตนา งามวิทยาพงศ์-ยาโน	TB/HIV Research Project, 1050 บ้านบุญทอง อ.เมือง เชียงราย 57000
นพ.รूपนก รัตนติลล ฌ ภูเก็ต คุณธนิดา เจริญทอง นพ.นิธิพัฒน์ เจียรกุล	กองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ ถนนเจริญกรุง กรุงเทพฯ กองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ ถนนเจริญกรุง กรุงเทพฯ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ
รศ.พญ.บุญมี สถาปัตยวงศ์	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
นพ.ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ	สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000-30/3 ถนนนครเขื่อนขันธ์ ต.ตลาด อ.พระประแดง จ.สมุทรปราการ 10130
ศ.พญ.ประคอง วิทยาศัย	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
อ.พูนพิลาศ หงษ์มณี	ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
พญ.เพชรวรรณ พึ่งรัศมี นพ.ภิรมย์ กมลรัตนกุล รศ.นพ.มงคล คุณากร	หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หน่วยระบาดวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
รศ. มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล สพญ.มนยา เอกทัตร์	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
นพ.บุญญ ลีเชวงวงศ์ ศ. ยอดหทัย เทพธรานนท์ อ.รุ่งนภา ประจักษ์ธรรม	รพ.วิชัยยุทธ ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ 10400 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล ถ.พระราม 6 กทม. 10400 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
รศ.วรชาติ สิริวารภรณ์	ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
ศ.นพ.วิจารณ์ พานิช นพ.วิทยา ตันสุวรรณนนท์	ผู้อำนวยการสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สุขุมวิทซอย 23 กรุงเทพฯ
รศ.วีระพงษ์ ลูรัตนานนท์	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น
นพ.วีระศักดิ์ จงสู่วิวัฒน์วงศ์	หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อาจารย์ศุภร พุ่งลัดดา	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พรมานก กรุงเทพฯ
ศ.สนิท มกรแก้วเกียร	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
คุณสมศักดิ์ เจริญทอง	กองวินโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ ถนนเจริญกรุง กรุงเทพฯ
นพ.สมศักดิ์ อรรถศิลป์	สำนักงานควบคุมโรคติดต่อเขต 7 อ.เมือง จังหวัดอุบลราชธานี
รศ.สมหญิง อัมวาสร	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถ.พระราม 4 กรุงเทพฯ
รศ.พญ.สยามพร ศิรินาวิน	ภาควิชาภูมิเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์รามธิบดี ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
ศ.นพ.สุชัย เจริญรัตนกุล	ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พรมานก กรุงเทพฯ
รศ.สุชาดา ชินะจิตร	ผอ.ฝ่ายสนับสนุนการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการจัดการทรัพยากรธรรมชาติ ดุลยภาพสิ่งแวดล้อมและสวัสดิการสาธารณะ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
น.สพ.สุพงษ์ วงษ์เกษมจิตต์	สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ผศ.เสาวคนธ์ ภคอัศรเลิศกุล	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.พระราม 6 กรุงเทพฯ 10400
นพ.อนุชา จิตตินันท์	กองวินโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ ถนนเจริญกรุง กรุงเทพฯ

การดำเนินการ

กลุ่มผู้ดำเนินการได้จัดทำรายนามเอกสารการวิจัยที่มีการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติซึ่งคนไทยมีส่วนร่วมทำการศึกษา หรือทำในประเทศไทย หรือทำกับตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทย เท่าที่มีการอ้างอิงในฐานข้อมูล PubMed นับตั้งแต่พ.ศ. 2508 จนถึงพ.ศ. 2541 ดังหน้า 138-175

ได้มีการจัดทำรายการหัวข้อปัญหาทางด้านการวิจัยที่อาจจะต้องมีการดำเนินการในประเทศไทย ดังหน้า 135-137 และได้ดำเนินการประมวลองค์ความรู้ในบางหัวข้อที่เห็นว่า น่าจะมีความสำคัญสูงหรือมีกลุ่มผู้วิจัยในประเทศไทยที่จะสามารถดำเนินการได้ ดังหน้า 11-134 จากนั้นได้จัดประชุมระดมความคิดเห็นจากผู้ที่มีความรู้ความชำนาญเกี่ยวกับวินโรค ในวันที่ 21-22 มกราคม 2542 ณ ห้องประชุมของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โดยมีผู้เข้าร่วมประชุม 40 ท่าน ได้ดำเนินการสรุปลำดับความสำคัญของการวิจัยและคำแนะนำจากที่ประชุม ดังปรากฏในหน้า 6-9

สรุปประเด็นการวิจัยที่สำคัญเกี่ยวกับวัณโรคและโรคติดเชื้อ *Mycobacterium* อื่นๆ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญมาแต่โบราณ เป็นสาเหตุการเสียชีวิตหนึ่งในห้าอันดับแรกของคนไทย คนไทยได้เริ่มเล็งเห็นความสำคัญของโรคนี้เมื่อมียารักษาวัณโรคที่ได้ผลดีขึ้นได้แก่ยา rifampin ทำให้ความสนใจและทรัพยากรที่ทุ่มเทให้การควบคุมโรคนี้ลดลงอย่างมากนับเป็นเวลามากกว่าสิบปี ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกยังคงจัดประเทศไทยเป็นหนึ่งใน 16 ประเทศที่ยังไม่สามารถควบคุมวัณโรคได้ดีเท่าที่ควร

การแพร่กระจายของโรคเอดส์ทำให้จำนวนผู้ป่วยเป็นวัณโรคเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อผู้ป่วยเอดส์ติดเชื้อวัณโรคแล้วจะมีโอกาสป่วยสูงกว่าคนที่ไม่ติดเชื้อโรคเอดส์มาก ข้ามนักรักษาหายแล้วยังสามารถติดเชื้อวัณโรคซ้ำป่วยได้อีก แม้ว่าผู้ป่วยโรคเอดส์จะมีโรคติดเชื้อแทรกซ้อนได้หลายอย่าง วัณโรคเกือบเป็นโรคเดียวที่สามารถแพร่เข้าสู่คนปกติรอบข้างได้ สถานการณ์ยิ่งเลวร้ายขึ้นเมื่อวัณโรคที่ดื้อยาโดยเฉพาะอย่างยิ่งยา rifampin มีจำนวนมากขึ้น ผู้ป่วยจากเชื้อเหล่านี้อาจไม่มียารักษาเลย หากเป็นติดเชื้อโรคเอดส์ด้วยผู้ป่วยอาจจะเสียชีวิตภายในไม่กี่สัปดาห์ ซึ่งนับว่ารุนแรงเหมือนเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวและไม่ได้ยารักษา หากไม่ติดเชื้อโรคเอดส์ผู้ป่วยอาจต้องทนทุกข์ทรมานจากวัณโรคที่รักษาไม่ได้นี้เป็นเวลาหลายปีก่อนสิ้นชีวิตไป

การต่อสู้กับโรคร้ายนี้ได้จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือต่างๆ ซึ่งบางอย่างยังไม่มีอยู่ บางอย่างมีแล้วแต่ก็ไม่ทราบแน่ชัดว่า ควรใช้อย่างไร บางอย่างทราบวิธีใช้แล้วแต่กลับไม่มีการใช้แพร่หลายเท่าที่ควร

กองทุนสนับสนุนการวิจัยได้จัดให้มีการประมวลและประเมินสถานะขององค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับวัณโรคและโรคติดเชื้อ *Mycobacterium* อื่นๆพร้อมกับได้มีการจัดประชุมระดมความคิดเห็นจากผู้เชี่ยวชาญในด้านต่างๆ ว่า ยังมีความต้องการการวิจัยใดที่จะนำไปสู่การควบคุมวัณโรคที่ดีขึ้น

ในแง่ของการวินิจฉัย ปัญหาที่สำคัญที่สุดได้แก่การขาดการควบคุมคุณภาพของห้องปฏิบัติการในระดับต่างๆ และแนวโน้มทางเวชปฏิบัติที่แพทย์ไม่นิยมใช้วิธีการทางจุลชีววิทยา(ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน)เพื่อการวินิจฉัยวัณโรค ปัญหาทั้งสองเป็นปัจจัยเสริมกันทำให้ปัญหารุนแรงยิ่งขึ้น แนวทางแก้ปัญหาที่สำคัญที่สุดในเบื้องต้นได้แก่ การจัดระบบประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการวัณโรคให้เป็นที่เชื่อถือได้ทั่วทั้งประเทศโดยเฉพาะอย่างยิ่งการประกันคุณภาพการตรวจย้อมเสมหะ และการจัดตั้งห้องปฏิบัติการวัณโรคอ้างอิงซึ่งจะมีบทบาทช่วยในการประกันคุณภาพและการประเมินความเหมาะสมของวิธีการวินิจฉัยใหม่ๆ ที่ได้มีการพัฒนาขึ้น และจะมีส่วนช่วยในการเฝ้าระวังเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน ซึ่งน่าจะมีการจัดตั้งเป็นโครงการระยะยาว ต่อเนื่องจากการสำรวจที่ได้ทำเสร็จไปเร็วๆ นี้ อาจต้องมีการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยบางอย่างขึ้นใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การทดสอบความไวต่อยาต่างๆ และ วิธีการวินิจฉัยในสถานการณ์พิเศษเช่นผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบ หรือวัณโรคในเด็ก เป็นต้น นอกจากนั้นน่าจะมีการศึกษาถึงสาเหตุและแนวทางแก้ไขเวชปฏิบัติที่ไม่เป็นมาตรฐานของแพทย์ในการวินิจฉัยวัณโรคด้วย

ในแง่ของการรักษา กลยุทธ์ในการรักษาที่เชื่อกันว่าได้ผลดีได้แก่ การใช้วิธี Directly Observed Therapy, Short course (DOTS) มีการใช้วิธีการดังกล่าวบ้างในประเทศไทย แต่ยังไม่แพร่หลายมากนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมืองใหญ่และกรุงเทพมหานคร นอกจากนั้นยังได้มีการดัดแปลงวิธีการดั้งเดิมจากการใช้บุคลากรทางสาธารณสุขเป็นผู้สังเกต มาใช้ญาติหรืออื่นๆเป็นผู้สังเกตแทน การวิจัยที่มีลำดับความสำคัญสูงมากคือ การวิจัยที่จะนำไปสู่การนำวิธีการ DOTS ไปใช้ในเมืองใหญ่และกรุงเทพมหานครอย่างกว้างขวาง และการประเมินยืนยันสัมฤทธิ์ผลของการใช้บุคคลที่ไม่ใช่บุคลากรทางสาธารณสุขเป็นผู้สังเกต

การรับประทานยา การศึกษาปัจจัยต่างๆที่ทำให้แพทย์ เจ้าหน้าที่สาธารณสุขและผู้ป่วยยอมรับวิธีการนี้ในการรักษา ซึ่งรวมทั้งปัจจัยทางด้านการศึกษา สังคม วัฒนธรรมและจิตวิทยาต่างๆ เช่น การให้ยาแบบ intermittent การให้รางวัล การยอมรับวิธีการนี้ในวัฒนธรรมต่างๆ การผสมผสานงาน DOTS เข้าเป็นส่วนหนึ่งของระบบสาธารณสุข เป็นต้น

แม้ว่า การใช้ DOTS จะช่วยให้ควบคุมวัณโรคส่วนใหญ่ได้ เชื้อวัณโรคที่ดื้อยาย่อมไม่สามารถควบคุมโดยวิธีการ DOTS และจะเป็นปัญหาต่อไปในอนาคต การพัฒนายาใหม่และการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานที่จะนำไปสู่การพัฒนายาใหม่จึงมีความสำคัญสูง การพัฒนาเหล่านี้ต้องใช้เวลานานนับสิบปีจึงจะสำเร็จ จึงจำเป็นต้องเริ่มทำโดยทันทีควบคู่ไปกับการใช้กลยุทธ์ DOTS นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นที่จะแสวงหาวิธีการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนานโดยยาที่พอจะหาได้ในปัจจุบัน หรือวิธีการอื่นเช่นการผ่าตัด หรือ immunomodulation เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่ายาบางชนิดที่พอใช้ได้ไม่มีจำหน่ายในประเทศไทย เช่น cycloserine, ethionamide แม้แต่ thiacetazone ซึ่งเคยมีใช้แพร่หลายก็หาได้ยาก

ในแง่ของระบาดวิทยา ปัจจุบันมีการขึ้นทะเบียนผู้ป่วยวัณโรคเฉพาะสถานพยาบาลสังกัดกระทรวงสาธารณสุข สภาพสังคมที่เปลี่ยนไปทำให้สถานบริการของเอกชนมีส่วนร่วมในการดูแลสุขภาพของประชาชนในอัตราส่วนที่สูงขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้โรงพยาบาลบางโรงในสังกัดมหาวิทยาลัย ในสังกัดกรุงเทพมหานคร และในสังกัดเหล่าทัพต่างๆ ยังไม่มีการรายงานจำนวนผู้ป่วยในความดูแลไปยังกองวัณโรค ไม่มีผู้ใดทราบแน่ชัดว่า สถานบริการของเอกชนมีส่วนร่วมในการดูแลผู้ป่วยวัณโรคเท่าใด อย่างไรก็ตาม การจัดตั้งระบบการขึ้นทะเบียนผู้ป่วยวัณโรคให้ครอบคลุมกว้างขวางทั่วทั้งประเทศจะทำให้การวางแผนการควบคุมวัณโรคมีความถูกต้องมากขึ้น การจัดตั้งระบบนี้จะทำได้อย่างไร จะใช้เทคโนโลยีทางสารสนเทศใหม่ๆมาช่วยได้อย่างไร จะได้รับความร่วมมืออย่างไร หรือสามารถกำหนดเป็นกฎข้อบังคับหรือไม่อย่างไร ล้วนเป็นประเด็นที่อาจต้องการการวิจัยเพิ่มเติมทั้งสิ้น

การหาอัตราป่วย (incidence rate) จากวัณโรคสามารถคำนวณได้จาก Annual risk of infection (ARI) ซึ่งมีการสำรวจในประเทศไทยครั้งสุดท้ายเมื่อปี พ.ศ. 2528 หลังจากนั้นไม่สามารถสำรวจได้อีก เนื่องจากการคำนวณดัชนีดังกล่าวจำเป็นต้องใช้การทดสอบ tuberculin ซึ่งไม่สามารถแยกระหว่างภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการติดเชื้อวัณโรคและการฉีดวัคซีน BCG ได้ การวิจัยเพื่อแยกระหว่างภูมิคุ้มกันทั้งสองนี้น่าจะทำได้ด้วยขีดความสามารถทางวิทยาศาสตร์ในปัจจุบัน

แม้ว่าการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่จะเกิดในชุมชน การแพร่กระจายของเชื้อในสถานที่บางแห่งเช่นสถานกักกัน ยานพาหนะสาธารณะโดยเฉพาะอย่างยิ่งแท็กซี่ โรงพยาบาล และวัดต่างๆที่ดูแลผู้ป่วยเอดส์ในระยะสุดท้ายน่าจะมีการศึกษาเป็นพิเศษ เนื่องจากอยู่ในวิสัยที่อาจหามาตรการป้องกันได้ และสถานที่ 2 แห่งหลังอาจเป็นจุดสำคัญที่มีการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคดื้อยา การศึกษาดูควรเป็นส่วนหนึ่งของโครงการระยะยาว ควรเน้นไปที่การหามาตรการป้องกันพร้อมๆกับการประเมินความสำคัญการแพร่กระจายในเชื้อสถานที่เหล่านั้น ควรคำนึงถึงปัจจัยและผลทางสังคมและความพอใจของผู้ที่ถูกศึกษาร่วมด้วย และถ้าเป็นไปได้ ควรคำนวณอัตราการเกิดโรคและพิสูจน์การแพร่กระจายด้วยวิธีการทางอนุพันธุศาสตร์ด้วย ซึ่งให้ผลน่าเชื่อถือมากกว่าการใช้ผลการทดสอบ tuberculin เพียงอย่างเดียว

การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อในผู้ป่วยเอดส์อาจจะรวมถึงการติดเชื้อ non-tuberculous *Mycobacterium* ด้วย

ในด้านการป้องกัน เนื่องจากวัณโรคเป็นโรคที่สามารถติดต่อได้ทางการหายใจโดยฝอยละออง (droplet nuclei) ผู้ที่ได้รับเชื้อจึงมักไม่สามารถป้องกันตัวเองได้ ทำให้เกิดคำถามทางจริยธรรมว่า ผู้ป่วยวัณโรคควรมีสิทธิที่จะทำการอันเป็นการเสี่ยงต่อการแพร่เชื้อให้ผู้อื่น เช่น มีสิทธิปฏิเสธการรักษาและยังคงโดยสภาพทางสาธารณะได้หรือไม่ ควรมีการศึกษาประเด็นเหล่านี้ทางจริยธรรม ผลกระทบทางสังคม ข้อกฎหมายต่าง ๆ และความยอมรับของประชาชนเกี่ยวกับการมาตรการต่าง ๆ ที่อาจจะนำมาใช้ในการควบคุมการแพร่กระจายของวัณโรค

เนื่องจากการพัฒนาวัคซีนวัณโรคใหม่เป็นงานที่ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายมาก และมีผู้พยายามทำอยู่แล้วในต่างประเทศ จึงไม่น่าจะพยายามพัฒนาวัคซีนวัณโรคขึ้นมาใหม่โดยสิ้นเชิงในประเทศไทย แต่น่าจะมุ่งเน้นไปในการศึกษาพยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกันต่อวัณโรค และอาจจะดำเนินการวิจัยในการพัฒนาวัคซีนเพียงบางส่วนเท่านั้น

การใช้ยาป้องกันในการควบคุมวัณโรคน่าจะยังไม่เหมาะสมที่จะกำหนดเป็นมาตรการหนึ่งในการควบคุมวัณโรคโดยทั่วไป แต่อาจศึกษาการใช้ยาป้องกันวัณโรคในประชากรบางกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเด็ก และผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ ในกรณีหลังนี้ควรทำเป็นส่วนหนึ่งของการดูแลรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์โดยรวม

ข้อเสนอแนะจากที่ประชุมเกี่ยวกับมาตรการเพื่อการควบคุมวัณโรค ซึ่งอาจเริ่มดำเนินการได้โดยไม่ต้องรอผลการวิจัย

1. ควรดำเนินการให้มีการนำกลยุทธ์ DOTS มาใช้ควบคุมวัณโรคทั่วประเทศ
2. ควรเร่งดำเนินการประกันคุณภาพของสถานพยาบาลโดยนำจะถือการใช้กลยุทธ์ DOTS เป็นส่วนหนึ่งของดัชนีประกันคุณภาพด้วย
3. ควรพัฒนาหลักสูตรและการฝึกอบรมของบุคลากรทางสาธารณสุขให้มีความเข้าใจถึงการนำ DOTS ในการควบคุมวัณโรค
4. ควรมีการจัดตั้งระบบประกันคุณภาพของห้องปฏิบัติการที่ให้การวินิจฉัยวัณโรคอย่างครอบคลุมและทั่วถึง
5. ควรมีการสร้างระบบขึ้นทะเบียนผู้ป่วยวัณโรคที่ครอบคลุมถึงสถานบริการทุกประเภท
6. ควรมีการจัดสร้างห้องปฏิบัติการอ้างอิงทางด้าน Mycobacteriology
7. ควรมีการดำเนินการเพื่อป้องกันการติดต่อของวัณโรคในสถานที่สาธารณะ ที่มีความเสี่ยงสูง อันได้แก่สถานพยาบาลโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีผู้ป่วยเอดส์อยู่เป็นจำนวนมาก สถานักกักกัน และพาหนะสาธารณะ โดยการให้การศึกษาแก่บุคลากรที่เกี่ยวข้อง และดำเนินมาตรการตามความเหมาะสมสอดคล้องกับวัฒนธรรมและการยอมรับของประชาชน
8. ควรมีการตรวจสอบและปรับปรุงระบบกฎหมายและกฎระเบียบอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการแพร่กระจายของวัณโรค
9. ควรมีการจัดหายารักษาวัณโรคชนิด second line drugs เช่น cycloserine, ethionamide หรือ thiacetazone เพื่อใช้ในการรักษาวัณโรคดื้อยา

ตารางสรุปหัวข้อการวิจัยที่สำคัญ หัวข้อที่เป็นตัวอักษรหนาคือหัวข้อที่มีความสำคัญสูง

	การวิจัยพื้นฐาน	การวิจัยและพัฒนา	การวิจัยเชิงระบบ
การวินิจฉัย		- การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบความไวต่อยา - การเปรียบเทียบผลของการทดสอบความไวต่อยาในหลอดทดลองกับผลการรักษา - การพัฒนาวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่จะใช้ในการทำ Quality Assurance	- การจัดตั้งห้องปฏิบัติการอ้างอิงด้าน Mycobacteriology - การจัดสร้างระบบ Quality Assurance ของห้องปฏิบัติการทางด้าน Mycobacteriology - การศึกษาคความเหมาะสมของการใช้การวินิจฉัยแบบต่างๆ ที่มีอยู่เดิมและที่พัฒนาขึ้นใหม่ในสถานการณ์ต่างๆ - เวชปฏิบัติของการสังตรวจเพื่อการวินิจฉัยวัณโรค
การรักษา	- การศึกษาทางพันธุศาสตร์ ชีวเคมี จุลชีววิทยา ที่จะทำให้เข้าใจโมเลกุลหรือกลไกที่เป็น target ของยาใหม่ - เภสัชวิทยาของยารักษาวัณโรค	- การพัฒนายาใหม่ - การรักษาวัณโรคด้วยยาหลายขนาน	- การ implementation ของ DOTS โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเมืองใหญ่และกรุงเทพมหานคร และ การใช้ DOTS โดยมีผู้ที่ไม่ใช่เจ้าหน้าที่ทางสาธารณสุขเป็นผู้สังเกตการณ์ - การดูแลผู้ป่วยโรคเอดส์ระยะสุดท้ายที่เป็นวัณโรคด้วย
การป้องกัน	พยาธิกำเนิดและภูมิคุ้มกันต่อวัณโรค	การพัฒนาวัคซีนป้องกันวัณโรค	ระบบกฎหมายและวัณโรค
ระบาดวิทยา	- การถ่ายทอดเชื้อวัณโรคในสถานการณ์ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรงพยาบาล สถานักักัน และ พาหนะสาธารณะ - การติดเชื้อ Nontuberculous mycobacteria ในผู้ป่วยเอดส์	การจำแนกกระหว่างการติดเชื้อวัณโรคและการได้รับวัคซีน BCG	- การจัดตั้ง Central Registration Unit ของผู้ป่วยวัณโรค - การสร้างระบบติดตามสถานการณ์วัณโรคต่อหลายหลายขนาน - บทบาทของหน่วยงานเอกชนในการควบคุมวัณโรค

รายงานประมวณองค์ความรู้บางหัวข้อ

การวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ

รศ. ดร. อังคณา ฉายประเสริฐ

วัณโรค เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน องค์การอนามัยโลกได้ประมาณการว่าประชากรโลกจำนวนกว่า 1 พันล้านจาก 5 พันล้านคน ติดเชื้อวัณโรค โดยแต่ละปีมีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 8 ล้านคน และผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิตปีละประมาณ 3 ล้านคน⁽¹⁾ สำหรับประเทศไทยไม่มีบันทึกในประวัติศาสตร์ว่าวัณโรคเกิดขึ้นในยุคสมัยใด เข้าใจว่าวัณโรคระบาดในหมู่คนไทยตลอดมาทุกยุคทุกสมัย⁽²⁾ และเป็นโรคที่ทำให้ประชากรไทยเสียชีวิตมากเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาโรคติดต่อทั้งหมด สถานการณ์ล่าสุดรวบรวมโดยคณะทำงานด้านวัณโรคของกระทรวงสาธารณสุขและองค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2538 สรุปว่าในปี พ.ศ. 2537 มีรายงานผู้ป่วยวัณโรคใหม่ทั่วประเทศประมาณ 47,767 ราย (อัตราผู้ป่วย 79 คนต่อประชากรแสนคน) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อก่อโรคในปริมาณมาก จึงคาดว่าจำนวนผู้ป่วยจริงจะมีมากกว่าที่รายงาน โดยจะมีจำนวนระหว่าง 75,000-100,000 คนต่อปี นอกจากนี้ได้ประเมินต่อไปอีกว่าในปี พ.ศ. 2543 จะมีผู้ป่วยมากกว่า 120,000 คนต่อปี โดยเป็นผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อ human immunodeficiency virus (HIV) ประมาณ 20,000 คน และผู้ป่วยมากกว่าครึ่งจะเป็นผู้ที่มียาอยู่ในวัยกำลังทำงาน⁽³⁾

การเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์วัณโรคในประเทศอุตสาหกรรม และรายงานการระบาดของเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายชนิด (multiple drug resistant *M. tuberculosis* or MDR-TB) รวมทั้งการติดเชื้อไวรัส HIV ในประชากรโลก ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้ ประมาณ 10-50% จะเป็นวัณโรคและเสียชีวิตในที่สุด⁽⁴⁾ ทำให้มีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องตรวจวินิจฉัยวัณโรคให้ได้ผลรวดเร็วและถูกต้อง เพราะเป็นมาตรการสำคัญหนึ่งในแผนการควบคุมวัณโรค

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ได้แก่การตรวจหาตัวเชื้อ ตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อ ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของเชื้อ และตรวจหาเอนไซม์หรือเมตาบอไลต์บางชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญและจำนวนเชื้อวัณโรค ในบรรดาวิธีต่างๆเหล่านี้ การตรวจหาเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานับว่าสำคัญที่สุด เพราะการพบเชื้อวัณโรคในเสมหะหรือสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นจากผู้ป่วย นอกจากจะเป็นหลักฐานยืนยันว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรคแล้ว ยังบ่งชี้ว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะแพร่เชื้อ (active disease) ต้องได้รับการรักษาทันที การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาศัยการนำสิ่งส่งตรวจมาป้ายสไลด์และย้อมสีทึนกรด และการเพาะแยกเชื้อเพื่อจำแนกสปีชีส์เชื้อก่อโรค พร้อมทั้งทดสอบความไวของเชื้อก่อโรคต่อยา

ด้วยเหตุที่ห้องปฏิบัติการที่ทำการวินิจฉัยวัณโรคจำเป็นต้องใช้สารพิเศษ และอาศัยประสบการณ์ความชำนาญแตกต่างจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป สมาคมอูเรวเซอร์อเมริกันจึงได้เสนอให้

แบ่งระดับห้องปฏิบัติการที่ทำการวินิจฉัยวัณโรคออกเป็น 3 ระดับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2518⁽⁵⁾ เพื่อให้บริการตามความจำเป็นและความชำนาญ ดังนี้

- ระดับที่ 1 เหมาะสำหรับคลินิกแพทย์ ห้องตรวจผู้ป่วยนอกและโรงพยาบาลขนาดเล็ก โดยทำการเก็บสิ่งส่งตรวจที่มีคุณภาพส่งไปยังห้องปฏิบัติการระดับที่ 2 และ 3 โดยห้องปฏิบัติการระดับที่ 1 จะตรวจหาเชื้อก่อโรคด้วยวิธีย้อม และตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์
- ระดับที่ 2 เหมาะสำหรับสถานรักษาโรค หรือห้องปฏิบัติการเฉพาะของโรงพยาบาลที่ได้รับการคัดเลือก ห้องปฏิบัติการระดับนี้ทำหน้าที่เก็บสิ่งส่งตรวจ ตรวจหาเชื้อก่อโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพาะแยกเชื้อก่อโรค จำแนกสปีชีส์ *M. tuberculosis* และทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาหลักที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วย (first line drugs) ส่งเชื้อสปีชีส์อื่น ๆ ไปจำแนกที่ห้องปฏิบัติการระดับที่ 3
- ระดับที่ 3 ห้องปฏิบัติการมาตรฐาน ทำหน้าที่ทุกอย่างเช่นเดียวกับระดับ 2 พร้อมทั้งจำแนกสปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรีย และทดสอบความไวของเชื้อก่อโรคต่อยาทุกชนิด ทำวิจัยและจัดการฝึกอบรมในเรื่องที่เกี่ยวข้อง

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาไม่ว่าจะเป็นห้องปฏิบัติการระดับใดก็ตาม จะได้ผลถูกต้องเพียงใดขึ้นอยู่กับคุณภาพและปริมาณของสิ่งส่งตรวจในเบื้องต้น นอกจากสิ่งส่งตรวจแล้ว คุณภาพของสาร วิธีการที่เลือกใช้ ชนิดของอาหารเพาะเชื้อ เครื่องมือ และความรู้ความสามารถของบุคลากร ล้วนแต่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการวินิจฉัยทั้งสิ้น ดังนั้นในบทนี้จะกล่าวถึงการตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาตามลำดับหัวข้อดังต่อไปนี้

1. การเก็บตัวอย่างส่งตรวจที่มีคุณภาพ
2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์
3. การเพาะแยกเชื้อ
4. การจำแนกสปีชีส์มัยโคแบคทีเรีย
5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา
6. การตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

1. การเก็บตัวอย่างส่งตรวจที่มีคุณภาพ^(6, 7, 8)

สิ่งส่งตรวจทุกชนิดควรเก็บในภาชนะปลอดเชื้อ สะอาด มีฝาปิดมิดชิด และส่งไปห้องปฏิบัติการโดยเร็ว โดยเก็บให้ได้ปริมาณเพียงพอพร้อมติดฉลากชื่อถูกต้อง การส่งซ้ำ ปริมาณสิ่งส่งตรวจน้อยหรือปิดฉลากผิด จะทำให้ห้องปฏิบัติการเสียเวลาโดยไม่จำเป็น และผลการตรวจก็ไม่มีความหมายต่อแพทย์และผู้ป่วยเท่าที่ควร **เสมหะ** เป็นสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจวินิจฉัยโรคที่ปอด ควรเก็บประมาณ 2-5 มล. ในตอนเช้าหลังตื่นนอน ก่อนแปรงฟัน ใส่น้ำขวดโลหะ แก้ว หรือพลาสติกปากกว้างมีฝาปิดเป็นฝาเกลียว ควรเก็บก่อนผู้ป่วยได้รับยารักษาโรค และเก็บ 3 วันติดต่อกันซึ่งจะทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยสูงถึงร้อยละ 95⁽⁸⁾ เสมหะที่ไม่สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการได้

ทันที หรือต้องรอรวมส่ง แนะนำให้เก็บใส่ตู้เย็น (4°C) เก็บได้นานไม่เกิน 1 สัปดาห์ หรือในช่วงส่งไปยังห้องปฏิบัติการที่ห่างไกลและไม่สามารถส่งเย็นได้ ให้เติมสารละลาย 1% cetyl pyridinium chloride ใน 2% w/v saline ปริมาตรเท่ากับเสมหะ⁽⁶⁾ น้ำจากกระเพาะ (gastric aspirate) นิยมเก็บตอนเช้า ก่อนการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำ หรือหลังอาหารมื้อสุดท้ายอย่างน้อย 8 ชั่วโมง⁽⁷⁾ โดยพยายาม ดูดให้ได้ประมาณ 10-50 มล.⁽⁷⁾ ใส่หลอดสะอาดปราศจากเชื้อมีฝาเกลียวปิด และรีบส่งห้องปฏิบัติการทันที เพราะกรดในกระเพาะอาจฆ่ามัยโคแบคทีเรียได้ หรือปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็นกลาง โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไบคาร์บอเนต น้ำล้างหลอดลม (bronchoalveolar lavage) และน้ำล้างปอด (bronchial wash) ควรเก็บอย่างน้อย 10 มล. ใส่หลอดสะอาดปราศจากเชื้อส่งห้องปฏิบัติการทันที ปัสสาวะ นิยมเก็บเฉพาะปัสสาวะตอนเช้าเป็น midstream specimen ประมาณ 20-40 มล. เก็บ 3 วันติดต่อกัน ใส่ขวดแก้วหรือพลาสติกสะอาดปราศจากเชื้อมีฝาเกลียวปิด ส่งห้องปฏิบัติการทันที หรือถ้าช้ากว่า 1 ชั่วโมงต้องแช่เย็น 4°C หนองและ aspirate fluids ต่างๆ ให้ใส่ขวดแก้วหรือพลาสติกสะอาดปลอดเชื้อมีฝาเกลียว ปริมาตรตั้งแต่ 1 มล. ขึ้นไปสำหรับหนอง สำหรับน้ำ เจาะจากไขสันหลังปริมาตร 2-4 มล. น้ำเจาะจากช่องเยื่อหุ้มปอด หรือเยื่อหุ้มหัวใจ หรือช่องท้องซึ่ง อาจมี fibrinogen ทำให้น้ำต่างๆ ตกกล่าวเกิดแข็งตัวเป็นก้อนได้ ให้ป้องกันการแข็งตัวโดยเติมสารละลายโซเดียมซิเตรทผสมลงไป หรือผสมลงในอาหารเหลวสูตรต่างๆ เช่น Middlebrook 7H9 (M7H9) หรือ Kirchner^(8, 9) ปริมาณน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มหัวใจ และช่องท้องควรเก็บ ประมาณ 40 มล. (หรือเก็บมากที่สุดเท่าที่จะเก็บได้) เนื้อเยื่อ ชิ้นเนื้อควรตัดโดยวิธีปราศจากเชื้อ ขนาด 0.5 ลบ.ซม. หรือใหญ่กว่า ใส่ในภาชนะสะอาดปลอดเชื้อ ส่งทันทีไปยังห้องปฏิบัติการ (ชิ้นเนื้อ ห้ามแช่ฟอร์มาลิน) เลือดและไขกระดูก โดยทั่วไปนิยมเจาะเลือดประมาณ 5 มล. จากเส้นเลือดดำ แล้วเพาะแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยใส่ลงอาหารเพาะเชื้อชนิดเหลวทันที ไขกระดูกก็นิยมทำเช่นเดียวกันกับเลือด การเพาะเชื้อจากเลือด นิยมทำเฉพาะในผู้ป่วย HIV เป็นส่วนใหญ่ อุจจาระ นิยมเก็บ ประมาณ 1-2 กรัม จากผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ใส่ในภาชนะสะอาดปลอดเชื้อเพื่อเพาะแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์นับว่ามีความสำคัญ เพราะเป็นวิธีที่ประหยัดและทำได้รวดเร็วที่สุดในปัจจุบัน รวมทั้งการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจยังเป็นเครื่องบ่งชี้ว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะแพร่เชื้อ ควรให้การรักษาทันที จึงนับได้ว่าวิธีย้อมและวิธีตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เป็น "corner stone" ของการควบคุมการติดเชื้อ⁽⁹⁾ และติดตามผลการรักษา⁽⁸⁾

Paul Ehrlich เป็นผู้ค้นพบคุณสมบัติ acid-fastness ของเชื้อวัณโรคซึ่งเป็นมัยโคแบคทีเรีย สปีชีส์ที่ 2 ที่ Robert Koch ค้นพบหลังจาก Armauer Hansen พบเชื้อโรคเรื้อน (*M. leprae*) นานถึง 8 ปี Ehrlich ได้เสนอวิธีการย้อมพิเศษซึ่งถูกดัดแปลงต่อมาโดย Ziehl และ Neelsen จนกระทั่งเป็นชื่อของวิธีย้อมที่ใช้กันมาจนถึงปัจจุบัน⁽⁶⁾ วิธีย้อมและตรวจหาเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ถึงแม้จะเป็นวิธีที่ประหยัดและให้ผลรวดเร็วมาก ก็มีข้อด้อยในเรื่องความไวเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ เพราะวิธีนี้จะตรวจพบเชื้อ acid fast bacilli (AFB) ได้ ต้องมีเชื้อในสิ่งส่งตรวจประมาณ

5,000-10,000 เซลล์/มล.⁽¹⁰⁻¹²⁾ ซึ่งได้มีการคำนวณเพื่อสนับสนุนดังนี้ โดยทั่วไปปริมาณเสมหะที่ป้ายสไลด์เพื่อย้อมหา AFB จะใช้ปริมาณ 0.01 มล. โดยป้ายได้เนื้อที่ประมาณ 200 ตร.มม. (10 มม. x 20 มม.) ซึ่งจะต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ทั้งหมด 10,000 fields จึงจะดูทั่วทั้งรอย smear (พื้นที่ที่ดูได้ในแต่ละ field เท่ากับ 0.02 ตร.มม.) ถ้าสมมติว่ามี AFB อยู่ 5,000 เซลล์/มล. ทั้งรอย smear จะมีเชื้ออยู่ 50 เซลล์ ซึ่งถ้าเชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอใน 10,000 fields นี้ จะตรวจพบเชื้อ 1 เซลล์ได้ต้องตรวจดู smear ถึง 200 fields ถ้าตรวจดูเพียง 100 fields โอกาสตรวจพบเชื้อจะมีเพียงร้อยละ 50 ตามที่ได้ตกลงโดย Center for Disease Control (CDC), International Union Against Tuberculosis (IUAT) และ American Thoracic society (ATS) การรายงานผล AFB positive จะต้องตรวจพบเชื้อจำนวน 3 เซลล์ขึ้นไป นั่นคือต้องดู smear ถึง 600 fields ในทางปฏิบัติกำหนดให้ดู 300 fields ต่อสไลด์ นั่นก็คือจะมีโอกาสรายงานพบ AFB 3 เซลล์ได้เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น⁽¹³⁾ หลักการนี้สามารถประเมินต่อไปได้ว่าถ้าตรวจพบ AFB โดยเฉลี่ยจาก 1 เซลล์ต่อ 1 field เสมหะนั้นจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 1 ล้านเซลล์/มล. ของเสมหะ จึงมีการสรุปว่าโดยทั่วไป เสมหะที่ถูกรายงานพบ AFB มักจะมีเชื้อประมาณ 10^5 - 10^6 เซลล์/มล. หรือมากกว่าเป็นส่วนใหญ่⁽¹³⁾

วิธีย้อมสีทนกรด (acid fast staining) ในปัจจุบันย้อมตามวิธี Ziehl-Neelsen หรือวิธีของ Kinyoun โดยใช้สีย้อมดา เช่น basic fuchsin (เชื้อ AFB ที่ถูกย้อมจะเห็นเป็นเซลล์รูปแท่ง ติดสีแดง) หรือใช้สีเรืองแสง เช่น auramine O และ rhodamine (เชื้อ AFB จะเห็นเป็นเซลล์รูปแท่ง ติดสีเหลืองอมเขียวบนพื้นแดง เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง) ข้อแตกต่างของวิธี Ziehl-Neelsen กับวิธี Kinyoun คือ วิธีแรกใช้ความร้อนช่วยให้ carbol fuchsin (a phenol/water solution of basic fuchsin) ซึมแทรกเข้าผนังเซลล์ของ AFB และทำปฏิกิริยาเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ mycolic acid ได้ดี ในขณะที่วิธีหลังไม่อาศัยความร้อน แต่ใช้สี carbol fuchsin ความเข้มข้นสูงกว่า วิธี Ziehl-Neelsen ได้รับความนิยมมากกว่า เพราะประหยัดและให้ผลดี ในขณะที่วิธี Kinyoun สะดวกกว่าแต่ราคาสูงเพราะใช้สีปริมาณมากกว่า สำหรับการตรวจหา AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงได้รับความนิยมในแง่ตรวจ smear ได้รวดเร็วเพราะดูด้วยกำลังขยายต่ำ แต่บางคนจะไม่นิยม โดยให้เหตุผลว่าความจำเพาะต่ำกว่าการย้อมด้วยสีย้อมดา และแนะนำให้ย้อมสไลด์ที่ตรวจพบ AFB ด้วยสีเรืองแสงอีกครั้งด้วย Ziehl-Neelsen⁽⁶⁾

การรายงานผลการตรวจ smear เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า นิยมรายงานตามแบบของ ATS ซึ่งใช้กันมาตั้งแต่พ.ศ. 2491 จนถึงปี พ.ศ. 2523 จึงเปลี่ยนมาใช้ตามแบบของ CDC ทั้งสองระบบจะรายงานหา AFB positive เมื่อพบเชื้ออย่างน้อย 3 เซลล์หรือมากกว่าขึ้นไป แบบของ National Tuberculosis Association USA (NTA) มี 4 ชั้น ส่วนของ CDC มี 6 ชั้น ดังเปรียบเทียบในตารางที่ 1 ^(6-8, 12)

ตารางที่ 1 การรายงานผลตรวจ smear ตามระบบ NTA และ CDC⁽⁷⁾

NTA		CDC	
การรายงาน	จำนวน AFB ที่พบ	จำนวน AFB ที่พบ	การรายงาน
Negative	<3 cells/slide	0 cell	Negative
		1-2 cells/300 fields	Doubtful
Rare (1+)	3-10 cells/slide	1-9 cells/100 fields	1+
Few (2+)	>10 cells/slide	1-9 cells/10 fields	2+
		1-9 cells/field	3+
Numerous (3+)	≥10 cells/field	>9 cells/field	4+

ปัจจุบัน WHO แนะนำให้รายงานตามแบบ NTA โดยรายงาน 4 ชั้น คือ Negative เมื่อไม่พบเชื้อเลย หรือพบ AFB 1-2 เซลล์/สไลด์ จะรายงานเป็น 1+ เมื่อพบ AFB จำนวน 3 เซลล์หรือมากกว่าขึ้นไป และรายงานเป็น 2+ เมื่อพบ AFB มากกว่า 10 เซลล์/สไลด์ ส่วนการรายงาน 3+ ใช้เมื่อตรวจพบ AFB ตั้งแต่ 10 เซลล์หรือมากกว่า/field การรายงานผล smear ให้ข้อมูลที่มีความสำคัญมาก เพราะบอกให้ทราบถึงระดับการติดเชื้อและความรุนแรงของโรคในผู้ป่วย จึงจำเป็นต้องกำหนดมาตรฐานการรายงาน โดยทั่วไปให้ใช้เวลาในการดูต่อสไลด์ประมาณ 5 นาที และดูอย่างเป็นระบบโดยตรวจจากซ้ายไปขวาและเคลื่อนตามแนวยาว^(8, 16)

นอกจากข้อเสียในเรื่องความไวของการตรวจหา AFB ด้วยการย้อมและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้ว วิธีย้อมสีทนกรดใช้บอกผลเพียงว่าเชื้อ AFB ที่เห็นเป็นมัยโคแบคทีเรีย แต่ไม่สามารถบอกสปีชีส์ของมัยโคแบคทีเรียได้ ในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา มีพัฒนาการใหม่ในเรื่อง peptide nucleic acids (PNAs) เกิดขึ้น PNA มีคุณสมบัติเป็น pseudo peptide ซึ่งสามารถจับกับได้แบบ DNA โดยอาศัยลำดับเบสที่จำเพาะ โดยโมเลกุลของ PNA จะมี polyamide เป็น backbone ในสาย แทนที่น้ำตาลและphosphate ในสายของ DNA ซึ่งไม่มีผลทำให้ระยะระหว่าง nucleotide bases เปลี่ยนแปลงไปจากที่พบใน DNA หรือ RNA การจับกันของสาย PNA กับ DNA จะเป็นไปตามลักษณะของ base pairing ของ Watson and Crick อีกทั้งจับได้แน่น และจำเพาะกว่าเพราะ PNA ไม่มีประจุ และมี flexibility สูงในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation) มีความคงทนสูงเพราะไม่ถูกย่อยสลายด้วย DNase, RNase, หรือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนต่าง ๆ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีความพยายามที่จะนำ PNA มาใช้ประโยชน์ทางด้านการตรวจวินิจฉัยและการรักษา⁽¹⁴⁾ โดยมีความพยายามที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจย้อมหาเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจ และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยตรง ซึ่งสามารถบอกสปีชีส์ได้จากลำดับเบสที่จำเพาะของ PNA งานนี้กำลังอยู่ในระยะวิจัยและพัฒนาาร่วมกันระหว่างบริษัท DAKO ประเทศเดนมาร์ก และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ร.พ. รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

3. การเพาะแยกเชื้อ

วิธีเพาะแยกเชื้อถือเป็น "mainstay" ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพราะเป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำและถือเป็นข้อยุติการโต้แย้งในปัญหาการวินิจฉัยโรค โดยเฉพาะวัณโรค การเพาะได้เชื้อ *M. tuberculosis* ถือเป็น "Gold standard" นอกจากวิธีนี้จะทำให้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อก่อโรคได้แล้ว ก็ยังมีความสำคัญในด้านการทดสอบความไวของเชื้อก่อโรคต่อยาที่จะใช้ในการรักษาแบบ *in vitro* ด้วย

อาหารที่ใช้ในการเพาะเชื้อวัณโรคมีวิวัฒนาการตั้งแต่ พ.ศ. 2425 โดย Robert Koch ใช้ serum ของวัวหรือแกะมาทำให้ร้อนขนาด 58°C นาน 1 ชม. ติดต่อกัน 6 วัน จากนั้นใช้ความร้อนขนาด 65-75°C ทำให้ serum แข็งลักษณะแบบเจล เพื่อใช้เพาะแยกเชื้อ 5 ปีต่อมา Roux และ Nocard ได้ปรับปรุงโดยการเติม glycerol ผสมลงไป ร้อยละ 6-8 และปีถัดมา Pawlowski เริ่มใช้มันฝรั่งสำหรับการเพาะเชื้อวัณโรค อาหารไข่ (egg-base medium) คิดค้นครั้งแรกโดย Dorset ในปี พ.ศ. 2445 หลังจากนั้นมาอีกราว 16-17 ปี Lockermann ได้ศึกษาและสรุปว่าสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค ได้แก่ asparagine, phosphoric acid, potassium และ magnesium จนกระทั่งปี พ.ศ. 2464 Besredka จึงได้เสนอแนะอาหารเหลวเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ และอาหารไข่สูตร Löwenstein-Jensen (LJ) ถูกตีพิมพ์เผยแพร่เป็นครั้งแรกในปีพ.ศ. 2475⁽¹⁵⁾ พร้อมทั้งปรับปรุงสูตรอีกครั้งในปีพ.ศ. 2498 พร้อมกับอาหารไข่สูตร Ogawa⁽¹⁶⁾ ส่วนอาหารเหลวสูตรที่ได้รับความนิยมและยังคงใช้กัน ได้แก่สูตร Sauton (พ.ศ. 2455) Kirchner (พ.ศ. 2475) Dubos (พ.ศ. 2488) และสูตร Middlebrook 7H9 (M7H9) ซึ่งพัฒนาขึ้นในราวพ.ศ. 2501 การเพาะแยกเชื้อวัณโรคหรือมัยโคแบคทีเรีย เมื่อลงในอาหารที่เหมาะสมแล้ว ต้องนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°C แล้วจึงจำแนกชนิดของมัยโคแบคทีเรียตามคุณสมบัติทางชีวเคมีหรือโดยวิธีทางอนุชีววิทยาต่อไป การศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าอาหารเหลวกระตุ้นให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารแข็ง^(5-9, 12, 15, 17, 18) การเพาะเชื้อมีข้อดีในเรื่องความไว เพราะสามารถเพาะแยกเชื้อได้แม้จะมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตเพียง 10-100 เซลล์ต่อสิ่งส่งตรวจ 1 มล.^(12, 19) ข้อเสียของวิธีนี้คือใช้เวลานาน 4-6 สัปดาห์สำหรับเชื้อกลุ่มโตช้า และบางครั้งก็อาจใช้เวลาจนถึง 3 เดือน ในการรายงานว่ามีเชื้อขึ้น การรายงานผลการเพาะเชื้อวัณโรค นิยมรายงานตามแบบของ CDC ดังนี้^(7, 16)

จำนวนโคโลนี	การรายงาน
0	Negative
<50	นับจำนวนตามจริง
50-100	1+
100-200	2+
200-500	3+
>500	4+

จากที่กล่าวมาข้างต้นวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการอาศัยวิธีย้อมสีทึบกรดและวิธีเพาะแยกเชื้อ ซึ่งวิธีแรกนั้นเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความจำเพาะกับเชื้อมัยโคแบคทีเรีย แต่ขาด

ความไวรวมทั้งไม่สามารถบอกลำดับของเชื้อได้ ส่วนวิธีหลังมีความไวและความจำเพาะสูง แต่ใช้เวลานานมาก กว่าที่จะทราบผล ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคโดยใช้ความรู้และเทคโนโลยีสมัยใหม่มาประกอบ เพื่อให้วิธีการเพาะเชื้อและวิธีจำแนกลำดับของเชื้อทำได้รวดเร็วแม่นยำยิ่งขึ้น

ในด้านการเพาะแยกเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียก่อโรคพัฒนาการส่วนใหญ่มุ่งเน้นในด้านช่วยให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโตโดยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ ที่อาจปะปนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ เช่น การใช้กรด หรือต่างทำลายเชื้ออื่น ๆ ในตัวอย่างส่งตรวจก่อนการเพาะ^(8, 12, 16-18) ได้แก่ การใช้ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide (NALC-NaOH), zephiran-trisodium phosphate (Z-TSP), sodium hydroxide 4% (Petroff's method) และ oxalic acid⁽¹²⁾ โดยสารที่ทดสอบแล้วว่าทำลายแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ดีและมีผลเสียต่อมัยโคแบคทีเรียน้อยที่สุด จนยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานและใช้กันทั่วโลกคือ NALC-NaOH^(7, 8, 12, 15-18) โดย NALC ทำหน้าที่เป็น mucolytic agent ช่วยย่อยเสมหะ และ NaOH ช่วยทำลายเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ โดยใช้ความเข้มข้นของ NALC 0.5% w/v ใน 2% NaOH-1.45% Na-citrate NALC สลายตัวง่าย ดังนั้นจึงต้องเตรียมเพื่อใช้ทันทีที่ไม่สามารถเก็บข้ามคืนได้ จากการศึกษาของ Rüscher-Gerdes และคณะ⁽¹⁷⁾ เปรียบเทียบการเพาะแยกเชื้อวัณโรคจากเสมหะจำนวน 1,570 ตัวอย่างโดยใช้อาหาร 4 ชนิด และใช้วิธีทำลายเชื้อปนเปื้อนก่อนด้วย NALC-NaOH เทียบกับ 4% NaOH พบว่าสามารถแยกเชื้อวัณโรคได้จากเสมหะกลุ่มดังกล่าวร้อยละ 81.6 และ 71.1 ตามลำดับ ซึ่งสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ ที่ decontaminate โดยวิธีที่ใช้ NALC-NaOH นี้ เมื่อนำไปเพาะเชื้อในอาหารเหลวหรือในระบบเพาะเชื้ออัตโนมัติต่าง ๆ ก็พบว่าได้ผลดี^(18, 20-26) หรือนำตะกอนที่ผ่านจากการทำลายเชื้อปนเปื้อนด้วย NALC-NaOH ไปศึกษาต่อด้วยวิธีทางอนุพัณธุศาสตร์ เช่น ตรวจหา DNA ก็สามารถทำได้ดี แต่ไม่เหมาะที่จะนำไปตรวจหา mRNA ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)⁽²⁷⁾ โดย Desjardin และคณะได้ทดลองเตรียม DNA และ mRNA จากเสมหะผู้ป่วยวัณโรคที่ยังไม่ได้รับการรักษา 19 ตัวอย่าง แล้วตรวจส่วน 16S rRNA gene โดยวิธี PCR เปรียบเทียบกับ RT-PCR ส่วนของ 85B mRNA พบว่าเมื่อเทียบปริมาณ DNA กับ mRNA ระหว่างเสมหะที่ขจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยน้ำยาดังกล่าว และที่ไม่ได้ใช้สาร พบว่าระดับ DNA ตรวจได้พอ ๆ กันในทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่ 85B mRNA ที่ตรวจโดยวิธี RT-PCR ลดลงอย่างมาก เขาจึงสรุปว่า ปริมาณ 85B mRNA ที่ลดลงนั้นเป็นเพราะการใช้ NALC-NaOH

Thornton และคณะ⁽²⁸⁻³⁰⁾ ได้เสนอวิธี process เสมหะและสิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจเพื่อตรวจหาและเพาะแยกเชื้อวัณโรควิธีใหม่ โดยใช้ N, N-dimethyl-N-(n-octadecyl)-N-(3-carboxypropyl) ammonium inner salt หรือ C₁₈-carboxypropylbetaine (CB-18) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น zwitterionic detergent และมี bouyant density ที่ส่งเสริมให้เซลล์ของมัยโคแบคทีเรียตกตะกอนได้ดี โดยทำลายเซลล์ได้น้อยกว่า NaOH คือไม่มีผลต่อ viability ของ *M. avium* และ *M. fortuitum* ที่ระดับความเข้มข้น 5 µg/ml แต่ลด viability ของ *M. tuberculosis* ลงประมาณร้อยละ 20-30 เมื่อแช่อยู่ในสารละลาย CB-18 ที่ความเข้มข้นดังกล่าวนาน 30 นาที จากการเปรียบเทียบที่ทำในห้องปฏิบัติการ 5 แห่งโดย process สิ่งส่งตรวจ 573 ตัวอย่างโดยวิธี blind ระหว่างวิธีใช้

NALC-NaOH กับวิธีใช้ CB-18 พบว่าการใช้ CB-18 ในการ process สิ่งส่งตรวจ ช่วยให้ตรวจพบ มัยโคแบคทีเรียทั้งโดยวิธีตรวจ smear และการเพาะเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือเพิ่มขึ้นประมาณ ร้อยละ 58 และ 43 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังช่วยให้ตรวจพบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวเร็วขึ้น 7.3 วัน บนอาหารแข็งเร็วขึ้น 5.3 วัน ข้อด้อยกว่าวิธีใช้ NALC-NaOH คือ พบการปนเปื้อนสูงถึงร้อยละ 20.8 ในขณะที่วิธีมาตรฐานพบเพียงร้อยละ 7.5⁽²⁸⁾ คณะผู้วิจัยได้ปรับปรุงขั้นตอนการใช้ CB-18 เพื่อแก้ไขปัญหการปนเปื้อนโดยการเติม lytic enzymes เช่น lysozyme, zymolyase และสารสกัด จาก *Cytophaga* และ *Trichoderma* พบว่าช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนลงเหลือน้อยกว่าร้อยละ 5 นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้เติม lecithin เพื่อช่วยลดพิษของ CB-18 ด้วย⁽²⁹⁾ และเสนอสมมติฐานว่า มัยโคแบคทีเรียสามารถนำ CB-18 เข้าเซลล์และสร้างเป็น lipid body ซึ่งทำให้ความหนาแน่นของเซลล์เพิ่มขึ้น จึงตกตะกอนได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกัน CB-18 ก็มีผลต่อ viability ของเชื้อด้วย Thornton และคณะจึงเสนอให้ตัดขั้นตอนการ incubate โดยให้เลือกใช้ CB-18 ความเข้มข้นระดับต่ำประมาณ 0.1 mM เมื่อต้องการเพาะแยกเชื้อ และใช้ความเข้มข้นได้สูงถึง 4 mM หรือความเข้มข้นต่ำแต่ incubate นาน เมื่อต้องการดูเพียงผล AFB smear หรือนำตะกอนไปสกัดดีเอ็นเอต่อ⁽³⁰⁾

ในเรื่องการเพาะเชื้อเป็นที่ยอมรับกันว่าอาหารเหลวให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง และข้อเสนอในตำราต่างๆ สนับสนุนให้ส่งตัวอย่างตรวจอย่างน้อย 3 วันติดต่อกันเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB โดยการ smear และการเพาะเชื้อ แต่ก็มีกรณีพิพาทเรื่องการวิเคราะห์ความคุ้มของข้อเสนอแนะนี้ค่อนข้างน้อย ในปีพ.ศ. 2541 นี้เอง Nelson และคณะจึงได้วิเคราะห์ความคุ้มในแง่การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการตรวจสิ่งส่งตรวจจำนวนมากจากผู้ป่วยแต่ละคน ว่าสามารถชดเชยกับค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ โดยผู้วิจัยได้ศึกษาแบบ retrospective ผู้ป่วยทุกรายที่วินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคปอดเนื่องจากเพาะแยกเชื้อวัณโรคได้ ที่ศูนย์การแพทย์ Hennepin รัฐ Minnesota สหรัฐอเมริกา ระหว่างปี พ.ศ. 2529-2539 มีจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งสิ้น 17,723 ตัวอย่าง พบ AFB จากการ smear จำนวน 2545 ตัวอย่าง และเพาะได้เชื้อ *M. tuberculosis* จำนวน 706 ตัวอย่าง เป็นผู้ป่วยที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคทั้งสิ้น 246 คน 229 คนเป็นผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อจากเสมหะ ที่เหลือพบจากสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ในผู้ป่วย 229 คน ร้อยละ 25 ส่งเสมหะเพียงครั้งเดียว ร้อยละ 22 ส่งเสมหะ 2 ครั้ง และร้อยละ 53 ส่งเสมหะ 3 ครั้ง หรือมากกว่า ซึ่งยอมพบ AFB ร้อยละ 46 60 และ 45 ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม smear positive และ smear negative ในแง่การตรวจวินิจฉัยโรคจากตัวอย่างตรวจครั้งที่ 3 ส่วนการเพาะเชื้อพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ส่งเสมหะสามครั้งหรือมากกว่า สามารถเพาะเชื้อขึ้นจากตัวอย่างตรวจครั้งที่หนึ่งหรือที่สองถึงร้อยละ 95 จากผลนี้ทำให้กลุ่มผู้วิจัยสรุปว่าตัวอย่างตรวจที่ส่ง 2 ครั้งเพียงพอสำหรับการวินิจฉัยโรค การส่งถึง 3 ครั้งเป็นการใช้ทรัพยากรทางห้องปฏิบัติการที่ฟุ่มเฟือยเกินไป⁽³¹⁾

ปัจจุบันมีบริษัทเอกชนหลายแห่งลงทุนพัฒนาสูตรอาหารเหลว^(15, 17, 18, 21, 33) และระบบการเพาะแยกเชื้อที่มีการตรวจแบบอัตโนมัติ^(20, 22, 25, 26, 35) ทั้งนี้เพื่อให้สามารถเพาะแยกเชื้อมัยโคแบคทีเรียก่อโรคได้รวดเร็วขึ้น และลดภาระงานของห้องปฏิบัติการในด้านการตรวจการเจริญเติบโต ซึ่งพัฒนาการเริ่มแรกในปีพ.ศ. 2520 มีการเสนอระบบการเพาะแยกเชื้อแบบ BACTEC 460 TB

system⁽³²⁾ โดยอาศัยการเพาะเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว BACTEC 12B ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี ^{14}C อยู่ในรูปเกลือ palmitate เมื่อส่งตรวจจะมีเชื้อมัคโคแบคทีเรีย เชื้อจะใช้สารประกอบ palmitate ในการเจริญเติบโตและปล่อย $^{14}\text{CO}_2$ ออกมา ซึ่งตรวจวัดได้โดยใช้เครื่องวัด แปลงค่าเป็นดัชนีการเติบโต (growth index = GI) โดยทั่วไปสรุปว่ามีการเจริญเติบโตของจุลชีพในขวด BACTEC 12B เมื่อค่า GI > 10 โดยวิธีนี้สามารถลดระยะเวลาในการเพาะเชื้อลงเหลือประมาณ 12-18 วัน^(17, 20-26, 32-34) และสามารถใช้หลักการเดียวกันในการจำแนกสปีชีส์ว่าใช้ *M. tuberculosis* complex และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคได้ โดยทราบผลภายในเวลาอีก 1-2 สัปดาห์ ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง รวมทั้งในปัจจุบันสามารถเลือกใช้ระบบอื่นที่ปลอดภัยกว่าได้ เช่น BACTEC 9000 MB^(21, 22) MB/BacT^(25, 26) ESP MYCO II⁽²⁰⁾ และ BACTEC MGIT 960⁽³⁵⁾

อย่างไรก็ตามวิธีเพาะเชื้อโดยระบบ BACTEC 460 ให้ผลรวดเร็วและดีกว่าการเพาะบนอาหารไข่สูตร Löwenstein-Jensen มาก จึงได้รับความนิยมและใช้กันแพร่หลายทั่วโลกจนยอมรับกันว่าเป็น “Gold standard” ของการเพาะเชื้อวัณโรคและมัคโคแบคทีเรียก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจมาเป็นเวลานานกว่า 20 ปี ไม่ว่าจะเป็นอาหารสูตรใหม่ๆ หรือระบบอัตโนมัติอื่นๆ ที่ผลิตขึ้นในภายหลังโดยเลี่ยงจากการใช้สารกัมมันตภาพรังสี มาเป็นการตรวจการเจริญโดยหลักการอื่นๆ จำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบผลในการเพาะแยกเชื้อ และเวลาที่ใช้ในการเพาะแยกเชื้อกับระบบ BACTEC 460 ทั้งสิ้น^(17, 18, 20-26, 33-35)

BACTEC 9000 MB^(21, 22) เป็นระบบตรวจการเจริญของเชื้อวัณโรคและมัคโคแบคทีเรียก่อโรคแบบอัตโนมัติ โดยเพาะแยกเชื้อในอาหารเหลวสูตร M7H9 ปรับปรุง ที่เรียกว่า MYCO/F ก่อนใช้จะต้องเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพอื่นคือ PANTA (P = polymyxin B, A = azlocillin, N = nalidixic acid, T = trimethoprim, A = amphotericin B) และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต OADC (O = oleic acid, A = albumin, D = dextrose, C = catalase) ในแต่ละขวดจะมี silicone rubber ติดอยู่บริเวณก้นด้านใน ซึ่งผสมด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของ ruthenium ทำหน้าที่เป็น oxygen-specific sensor เมื่อมีจุลชีพเจริญเติบโตในอาหาร จุลชีพจะใช้ O_2 ทำให้ปริมาณลดลง O_2 จาก ruthenium compound จะถูกปล่อยออกมาในอาหาร จนเหลืออยู่น้อย ทำให้สารนี้เรืองแสงเมื่อตรวจวัดด้วย UV detector ซึ่งจะอยู่บริเวณใต้ขวดในเครื่อง (เครื่องมีความจุขนาด 240 ขวด) และเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อรายงานผล เครื่องจะตรวจผลอัตโนมัติทุกๆ 10 นาที เมื่อมีการแสดงผลบวก เจ้าหน้าที่จะต้องนำขวดเพาะเชื้อออกมาทำการย้อมดูเซลล์และจำแนกชนิดของเชื้อต่อไป ซึ่งการศึกษาของ Griethuysen และคณะ และ Zanetti กับทีม พบว่าตัวอย่างส่งตรวจทั้งจากระบบทางเดินหายใจและนอกกระบบทางเดินหายใจ 2,784 ตัวอย่าง BACTEC 9000 MB รายงานผลการเพาะเชื้อได้ดีเท่ากับ BACTEC 460 และดีกว่าการใช้ LJ หรือ Septi-Chek AFB อย่างมีนัยสำคัญ คือ recovery rate สูงกว่า (ประมาณ 91-95%) และ เวลาเฉลี่ยที่ใช้ในการ detect สั้นกว่า (ประมาณ 10.3-17.6 วัน) Septi-Chek AFB ใช้เวลาประมาณ 26 วัน ส่วน LJ ใช้เวลาประมาณ 30 วัน

BACTEC MGIT 960⁽³⁵⁾ เป็นระบบการเพาะแยกเชื้อวัณโรคแบบอัตโนมัติ หลักการคล้าย BACTEC 9000 MB คือเพาะแยกเชื้อในอาหารเหลวในหลอด Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT)^(23, 24) ลักษณะเป็นหลอดแก้วฝาเกลียว บรรจุอาหารสูตร M7H9 ที่ปรับปรุงแล้ว 4 มล. ที่กันหลอดเป็น oxygen-sensor เช่นเดียวกับ 9000 MB ใช้เพาะแยกเชื้อจากเสมหะและสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ โดยจำเป็นต้องปั่นและนำตะกอนเซลล์มาเพาะตรวจวัดผลการเจริญของเชื้อทุก 10 นาที และรายงานผลผ่านระบบคอมพิวเตอร์ การตรวจการเจริญเติบโตวัดจากระดับ O_2 ที่ลดลง ลักษณะและการใช้งานมีข้อดีคือเป็นตู้ขนาดกระทัดรัดไม่เปลืองเนื้อที่ ประกอบด้วยช่องใส่หลอด 3 ล้นชัก แต่ละล้นชักจุ 320 หลอด ไม่จำเป็นต้องใช้เข็มในการ inoculate สิ่งส่งตรวจ ทำให้ปลอดภัยมากกว่าระบบอื่นขณะทำงาน เช่นเดียวกับ 9000 MB MGIT 960 จำเป็นต้องเติม OADC และ PANTA จากการศึกษาเปรียบเทียบผลการเพาะแยกเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียจากตัวอย่างส่งตรวจรวม 2,010 ตัวอย่าง^(23, 24) พบว่า MGIT ให้ผลดีกว่า LJ แต่ด้อยกว่า BACTEC 460 ในอัตรา การตรวจพบเชื้อ แต่สามารถตรวจพบได้เร็วใกล้เคียงกัน คือประมาณ 10 วัน ในขณะที่บน LJ ใช้เวลานานกว่า 20 วัน จากการศึกษาทั้ง 3 รายงาน^(23, 24, 35) พบอัตราการปนเปื้อนสูงกว่าร้อยละ 5 (ค่าที่ยอมรับได้ทั่วไป) ซึ่งเป็นข้อเสียที่มาจากอาหารที่ใช้เพาะเชื้ออุดมสมบูรณ์มากจึงกระตุ้นการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ดี ล่าสุดมีรายงานว่าสามารถใช้ MGIT ทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาได้⁽³⁶⁾ โดยมีการเปรียบเทียบผลการทดสอบของเชื้อวัณโรคจำนวน 441 สายพันธุ์ กับยา 4 ชนิดคือ isoniazid (INH), rifampin (RMP), ethambutol (EMB) และ streptomycin (SM) ระหว่างการใช้ MGIT และตรวจผลการเจริญหรือไม่โดยการนำหลอดมาส่องด้วย UV เทียบกับ BACTEC 460 พบว่าให้ผลตรงกัน สำหรับ INH, RMP, EMB และ SM เท่ากับร้อยละ 99.3 99.1 98.1 และ 99.1ตาม ลำดับ โดยใช้เวลาเฉลี่ยในการอ่านผลจาก MGIT 8.8 วัน และจาก BACTEC 460 7.8 วัน

MB/BacT system^(25,26) ระบบอัตโนมัติในการตรวจหาเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียก่อโรดจากการเพาะเลี้ยง โดยเพาะแยกเชื้อในอาหารเหลวสูตร M7H9 ปริมาตร 10 มล. สำหรับเสมหะ และตัวอย่างส่งตรวจชนิดอื่นๆ และปริมาตร 30 มล. สำหรับเพาะเชื้อจากเลือด ที่กันขวดอาหารเพาะเชื้อเป็น solid-state CO_2 sensor ทำหน้าที่ตรวจวัดปริมาณ CO_2 ที่เพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในขวด ซึ่งควบคุมการทำงานโดยระบบคอมพิวเตอร์ ทำการตรวจวัดทุก 10 นาที เมื่อปริมาณ CO_2 เพิ่มขึ้น indicator กันขวดจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง เครื่องจะบอกเป็นสัญญาณบอก เจ้าหน้าที่ต้องนำขวดไปตรวจหาเชื้อโดยวิธีย้อมเพื่อยืนยันผล และเพาะเชื้อบนอาหารแข็งเพื่อจำแนกสปีชีส์ต่อไป จากการเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียในสิ่งส่งตรวจ 1,078 ตัวอย่างโดย MB/BacT และ BACTEC 460 สามารถแยกเชื้อได้ 73 ตัวอย่าง โดยพบผลบวก 86.3% เมื่อใช้ MB/BacT 91.8% เมื่อใช้ BACTEC 460 และ 79.5% เมื่อเพาะบนอาหารไข่ ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจพบการเจริญนาน 17.5 (± 6.4) วัน, 14.3 (± 8.2) วัน และ 24.2 (± 7.5) วัน ตามลำดับ โดยสรุป MB-BacT system เหมาะสมสำหรับใช้เพาะแยกเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจ⁽²⁵⁾ โดยสามารถลด ปัญหาของเชื้อปนเปื้อนเจริญคลุมมัยโคแบคทีเรียลงได้โดยเปลี่ยน azlocillin เป็น vancomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Gram positive cocci และกระตุ้นการเจริญเพื่อเพิ่มอัตราการตรวจพบโดยใส่ oleic acid แทน Tween80⁽²⁶⁾

ESP MYCO II⁽²⁰⁾ เป็นระบบการตรวจการเจริญของเชื้อมัคโคแบคทีเรียในอาหารเหลว M7H9 สูตรปรับปรุง เติม OADC และ PVNA (polymyxin B, vancomycin, nalidixic acid, amphotericin B) เพื่อกระตุ้นการเจริญของมัคโคแบคทีเรีย และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั่วไป ทั้งพวกที่สร้างสปอร์และพวกที่ดื้อต่อยา methicillin ด้วย วิธีตรวจวัดการเจริญเติบโตอาศัยหลักการเปลี่ยนความดันซึ่งเกิดจากการใช้ O₂ และสร้าง CO₂ ในขวด โดยระบบนี้ค่าความดันที่บอกว่ามีเชื้อเจริญเติบโตจะให้สัญญาณบวกเมื่อมีเชื้อเจริญประมาณ 10⁶ เซลล์ต่อมล. จากการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจ 1,562 ตัวอย่าง เปรียบเทียบผลการเพาะแยกเชื้อมัคโคแบคทีเรีย โดยระบบ ESP MYCO II กับ BACTEC 460 พบว่าสามารถแยก *M. tuberculosis* ได้ 98/106 และ 81/106 ตามลำดับ โดยใช้เวลาเฉลี่ย 16 และ 17 วัน มีอัตราการปนเปื้อนเท่าๆกัน คือร้อยละ 6 ในทั้งสองระบบ

การเพาะแยกเชื้อโดยระบบอัตโนมัติดังกล่าวข้างต้น เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ หรือห้องปฏิบัติการที่มีภาระงานมากเพราะไม่ต้องเสียเวลาอ่านผล แต่ก็จะมีค่าใช้จ่ายสูง ทั้งค่าเครื่องมือ และค่าอาหารเพาะเชื้อสำเร็จรูป ทางเลือกสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กอีกแบบคือ ใช้อาหารสำเร็จรูปที่มีจำหน่าย เช่น MGIT^(20, 23, 24) MB-Redox⁽²⁰⁾ และ Septi-Chek AFB^(33, 37) แล้วบ่มเพาะเชื้อใน incubator ธรรมดาที่ใช้กันอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

MB-Redox medium⁽²⁰⁾ เป็นอาหารเหลวสูตร Kirchner เติม OADC และสารยับยั้งการเจริญของจุลชีพปนเปื้อนอื่น ๆ ซึ่งชนิดคือ polymyxin B, amphotericin B, carbenicillin และ trimethoprim (PACT) โดยมี tetrazolium violet มีสีเหลืองอ่อนเป็น indicator เมื่อจุลชีพเจริญเติบโต indicator จะถูก reduce ไปเป็น formazan เปลี่ยนเป็นสีม่วง⁽³⁸⁾ ถ้าจุลชีพที่ขึ้น เป็นมัคโคแบคทีเรียจะเห็นเชื้อเป็นตะกอนสีม่วงที่ก้นหลอด จากการทดลองใช้แยกเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจพบว่าได้ผลดีใกล้เคียงกับ BACTEC 460 ทั้งอัตราการพบเชื้อและระยะเวลาที่ใช้

Septi-Chek AFB^(33, 37) เป็น biphasic medium ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ ชนิดแข็งและชนิดเหลว โดยในขวดปิดฝามีอาหารเหลวสูตร M7H9 จำนวน 30 มล. และ enhance ด้วย CO₂ ร้อยละ 5-8 ขวดนี้จะมีการต่ออยู่กับหลอดพลาสติกฝาเกลียว ภายในหลอดมีอาหารแข็งอยู่ด้านข้างหลอด 2 ชนิด คือ Middlebrook 7H11 เติม NAP (nitroacetylaminohydroxypropylphenone) และ chocolate agar จากการศึกษาพบว่า Septi-Chek AFB สามารถใช้เพาะแยกเชื้อวัณโรคได้รวดเร็วกว่าการใช้ LJ แต่ช้ากว่า BACTEC 460 โดยใช้เวลาประมาณ 19-27 วัน อัตราการตรวจพบเชื้อใกล้เคียงกับ BACTEC 460 เสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ข้อเสียคือต้องหมั่นกลับขวดเพื่อให้เกิด reinoculation สัปดาห์ละ 4 ครั้งใน 2 สัปดาห์แรก

โดยสรุปสำหรับการเพาะมัคโคแบคทีเรียก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจ อาหารเหลวจะให้ผลดีกว่าอาหารแข็ง ทั้งในแง่อัตราการตรวจพบเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ ประเทศในยุโรปและอเมริกากำหนดมาตรฐานการเพาะแยกเชื้อว่าควรใช้อาหารทั้งสองชนิด และพัฒนาการในเรื่องอาหารเพาะเชื้อ ควบคู่กับระบบการตรวจแบบอัตโนมัติที่มีผลิตรอกจำหน่ายหลายชนิด ทุกชนิดใช้อาหารเหลวซึ่งทดสอบแล้วว่าให้ผลดีเท่าเทียมกับระบบ BACTEC 460 และมีความปลอดภัยกว่าเนื่องจากไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี การใช้งานสะดวกกว่า แต่ราคายังแพง อีกทั้งส่วนใหญ่เป็นแต่เพียงการตรวจว่ามีการ

เจริญของมัคโคแบคทีเรียซึ่งเทียบเท่ากับ AFB positive การจะบอกว่าเป็นเชื้อสปีชีส์ใด ต้อง subculture ลงบน LJ และทดสอบคุณสมบัติต่างๆทางชีวเคมีอีกครั้งทำให้เสียเวลากว่าที่จะทราบผล หรืออาจนำวิธีทางอนุชีววิทยา มาเสริมต่อเพื่อช่วยให้การจำแนกสปีชีส์ทำได้รวดเร็วขึ้น สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาของระบบอัตโนมัติส่วนใหญ่กำลังอยู่ระหว่างการวิจัย

ระบบการเพาะเชื้อมัคโคแบคทีเรียอัตโนมัติคงจะเป็น gold standard ต่อไป และเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ในกรณีที่มีการติดเชื้อในเลือด⁽³⁹⁾ ในเยื่อหุ้มปอด ในช่องท้อง และในน้ำไขสันหลัง โดยใช้วิธีทางอนุชีววิทยาร่วมในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อจะทำให้ทราบผลได้รวดเร็วขึ้น

4. การจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรีย

การจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรียตามมาตรฐาน นิยมจำแนกตามวิธีของ Runyon โดยอาศัยอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ความสามารถในการสร้างสี carotenoid ในที่มืดหรือที่สว่าง และคุณสมบัติทางชีวเคมีเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ สารโนอะซิน การย่อยสลายสารบางชนิด ความทนทานต่อสารบางอย่าง รวมประมาณ 15-18 ชนิด^(5-8, 12) และใช้เวลาในการจำแนกประมาณ 2-8 สัปดาห์ เมื่อเริ่มจาก pure culture ปัญหาจากความล่าช้าและความยุ่งยากในการจำแนกสปีชีส์นี้ ทำให้เกิดการศึกษาวิจัยเพื่อพยายามหาวิธีอื่นที่จะให้ผลรวดเร็ว ถูกต้องและทำได้สะดวกมาแทน วิธีต่างๆที่มีการศึกษาและรายงาน ได้แก่ ความสามารถในการทนทานต่อ NAP⁽⁴⁰⁾ การใช้ DNA probe⁽⁴¹⁻⁴³⁾ การตรวจหา mycolic acids⁽⁴³⁻⁴⁶⁾ โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) หรือ วิธี thin layer chromatography (TLC) การใช้วิธีทางอนุชีววิทยา เช่น polymerase chain reaction (PCR) และ restriction analysis (REA) ของ 65 kDa heat shock protein^(47, 48) ของ 16S rRNA gene⁽⁴⁹⁾ ของ 16S-23S rDNA spacer region^(50, 51) การใช้วิธี PCR-ELISA⁽⁵²⁾ และการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA gene⁽⁵³⁾

NAP test ใช้ในการแยกเชื้อกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ออกจาก non-tuberculous mycobacteria (NTM) โดยยับยั้งการเจริญของ *M. tuberculosis* complex ในขนาดความเข้มข้นของ NAP 5 µg/ml เมื่อใช้ใน BACTEC 460 จะทราบผลภายใน 5 วัน⁽⁴⁰⁾

สำหรับ DNA probe มี 2 ชนิด คือ Accuprobe (Gen-Probe) ใช้ acridinium ester เป็นตัวติดฉลาก^(41, 42) และ SNAP probe (Syngene) ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase⁽⁴³⁾ DNA probes ทั้งสองชนิดมีความจำเพาะต่อมัคโคแบคทีเรียประมาณ 5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* หรือ *M. avium-intracellulare* complex (MAC), *M. kansasii* และ *M. gordonae* โดยจะจับกับ 16S rRNA ของแต่ละสปีชีส์อย่างจำเพาะ Accuprobe ได้รับความนิยมนมากกว่า ตรวจทราบผลภายใน 4 ชั่วโมง จำเป็นต้องใช้เครื่อง luminometer ในการวัดความเรืองแสง (ค่ามากกว่า 30,000 RLU เป็นค่าบวก) probe มีราคาแพง ปัจจุบันเป็นวิธีที่ยอมรับเป็น gold standard ในการจำแนกสปีชีส์ *M. tuberculosis* complex และ MAC

การจำแนกสปีชีส์โดยตรวจหาชนิดของ mycolic acid ด้วยวิธี TLC⁽⁴⁶⁾ และ HPLC⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ เป็นวิธีที่จำแนกสปีชีส์มัคโคแบคทีเรียได้หลายชนิด แต่ค่อนข้างยุ่งยากในเรื่องเครื่องมือและวิธีการเตรียมเซลล์ เพราะองค์ประกอบของ mycolic acid ของเชื้อสปีชีส์เดียวกัน อาจแตกต่างกันเมื่อมีอายุต่างกันหรือเพาะเลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน นอกจากนี้จำเป็นต้องมี standard chromatogram ของเชื้อทุกสปีชีส์ไว้เปรียบเทียบ จึงจะจำแนกสปีชีส์ได้ วิธีนี้มีใช้เฉพาะห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้น เช่นที่ CDC, Atlanta

วิธี PCR/REA⁽⁴⁷⁻⁵¹⁾ และ PCR/ELISA⁽⁵²⁾ เป็นวิธีที่อาศัยการเพิ่มจำนวน DNA ก่อนโดย PCR จากนั้นนำมาตัดด้วย RE แล้วตรวจดู band pattern⁽⁴⁷⁻⁵¹⁾ หรือตรวจ PCR product โดยใช้ specific oligonucleotide probe⁽⁵²⁾ โดยเทคนิคนี้จะจำแนกสปีชีส์มัคโคแบคทีเรียก่อโรค และที่ตรวจพบได้บ่อยได้ประมาณ 20 สปีชีส์ วิธีการไม่ยุ่งยาก ทราบผลภายใน 1-2 วัน และราคาปานกลาง แต่ยังไม่มีการใช้ในงาน routine คาดว่าถ้าผลการศึกษายืนยันความจำเพาะที่ดี และมีการพัฒนารูปแบบให้ใช้ได้ง่าย น่าจะมีโอกาสยอมรับเป็นวิธีมาตรฐานและใช้ในงาน routine ต่อไป

การจำแนกสปีชีส์โดยการอ่านลำดับเบส⁽⁵³⁾ เช่นลำดับเบสของยีน 16S rRNA ใช้เวลาประมาณ 2 วัน สามารถจำแนกมัคโคแบคทีเรียได้ทุกสปีชีส์ รวมทั้งใช้ยืนยันว่าพบสปีชีส์ใหม่ๆ ได้ ปัจจุบันการศึกษาลำดับเบสทำได้ง่ายเพราะมีเครื่องอ่านอัตโนมัติ (automate DNA sequencer) ในอนาคตน่าจะเป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งแต่โอกาสที่จะใช้ในงาน routine คงน้อย เพราะเครื่องมือราคาแพง

วิธี immunochromatography ก็กำลังถูกนำมาใช้เป็นวิธีจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *M. tuberculosis* (Dr. Chiyoji Abe, personal communication) โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ MPB64 ตรึงบน nitrocellulose membrane เป็น capture reagent และ monoclonal antibody ต่อ MPB64 ที่ conjugate ด้วย colloidal gold particle จะใช้เป็นตัวจับกับ antigen แล้วตรวจหาใน sandwich-type assay วิธีใช้ในการจำแนกสปีชีส์ จะใช้ทดสอบจาก culture broth 100 μ l ถ้าเป็นเชื้อวัณโรค จะเกิดแถบสีม่วงแดงตรงบริเวณที่มี antibody ตรึงอยู่ สามารถทราบผลภายใน 15 นาที วิธีนี้ ถ้าทดสอบความจำเพาะว่าดีมากแล้ว น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมกับงาน routine ในห้องปฏิบัติการระดับ 2 ได้เป็นอย่างดี และจะได้รับความนิยมมากกว่า Accuprobe หรือวิธีอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น เพราะทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็วและไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษใดๆเลย

วิวัฒนาการในเรื่อง DNA Chip หรือ Gene Chip^(54, 55) ซึ่งใช้ในการประเมินความหลากหลายของสารพันธุกรรมในจำนวนมากๆชนิดได้เป็นอย่างดี ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรีย และตรวจหา point mutation ของ *rpoB* gene⁽⁵⁵⁾ โดย Troesch และคณะได้ทดลองนำ DNA sequence ส่วน 16S rRNA ของเชื้อมัคโคแบคทีเรีย ที่คัดเลือกให้มีความจำเพาะต่อมัคโคแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ ทั้งหมด 54 สปีชีส์ ใช้ 82 sequences และตรวจหา point mutation ของ *rpoB* gene อีกจำนวน 51 sequences (ครอบคลุม mutation 61 แบบ) ใส่ sequence ทั้งหมดลงใน probe array แต่ละ array มีขนาด 1.28 x 1.28 cm สามารถบรรจุ DNA sequence (โดยวิธี tiling) ได้ 65,000 sequences ภายใน array แบ่งเป็น unit หรือ cell ขนาด 50 x 50 μ m เต็มทั้งบริเวณ

Troesch และคณะ เตรียมดีเอ็นเอจาก pure culture ของเชื้อที่ทราบสปีชีส์แล้ว 70 สายพันธุ์ 27 สปีชีส์ นำดีเอ็นเอไปทำ PCR โดยใช้ common primer สำหรับยีน 16S rRNA ของมัยโคแบคทีเรีย ต่อทางด้าน 5' ของ primer เส้นหนึ่งด้วย T3 promoter sequence และด้าน 5' ของ primer อีกเส้นหนึ่งด้วย T7 promoter sequence เมื่อได้ PCR product ขนาด 202 bp จึงนำไปสร้างเป็น single strand RNA ซึ่ง labeled ด้วย fluorescein จากนั้นทำให้ RNA เป็นท่อนสั้นๆโดยใช้สารเคมี แล้วจึงนำไป hybridize กับ probe บน array โดยอาศัย Gene Chip Fluidics Station (Affymetrix) ตรวจหา fluorescence signal บน array โดยใช้ Gene-Array scanner แล้ววิเคราะห์ signal เพื่อแปลผลด้วย Gene Chip software โดยวิธีนี้ Troesch และคณะ สามารถจำแนกมัยโคแบคทีเรีย 70 สายพันธุ์ ได้ถูกต้อง 26 ใน 27 สปีชีส์ ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 5 ชั่วโมง ด้วยหลักการเดียวกันสามารถตรวจหา point mutation ของ *rpoB* และ *katG* ได้

วิธีนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการจำแนกสปีชีส์ และตรวจ point mutation ต่างๆได้จำนวนมากในเวลาสั้น แต่ยังเป็นเทคโนโลยีใหม่ ต้องใช้เครื่องมือและการฝึกอบรมเฉพาะ มีขั้นตอนยุ่งยากหลายขั้นตอน ในขณะนี้คงยังไม่เหมาะสำหรับงาน routine

5. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา

การทดสอบความไวของเชื้อมัยโคแบคทีเรียต่อยา ตั้งแต่อดีตมาจะเน้นไปที่เชื้อวัณโรค ต่อมาจึงมีการทดสอบในสปีชีส์อื่นๆ การทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาโดยปกติ ไม่ได้ทำกับเชื้อวัณโรคทุกสายพันธุ์ ข้อเสนอแนะว่าเมื่อใดควรจะทดสอบได้แก่

1. เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศที่มี primary drug resistance สูงเกินกว่าร้อยละ 5
2. ผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคชนิดรุนแรง เช่น วัณโรคเยื่อหุ้มสมอง
3. ผู้ป่วยรักษาวัณโรคซ้ำ
4. ผู้ป่วยใหม่ที่มีข้อบ่งชี้ว่าการรักษาล้มเหลว เช่น ยัง smear พบ AFB หลังจากรักษาด้วย INH และ RMP นานเกิน 3 เดือน หรือยาสูตรอื่นเกิน 5 เดือน

เหตุผลที่ไม่ได้ทดสอบทุกสายพันธุ์ เป็นเพราะเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยใหม่มักมีอัตราการดื้อยาต่ำ⁽⁷⁾ และถ้าทดสอบทุกสายพันธุ์เป็นงาน routine จะเพิ่มภาระและค่าใช้จ่ายให้แก่ห้องปฏิบัติการมาก นอกจากนี้วิธีการทดสอบก็มีความยุ่งยากที่จะปรับปรุงให้ได้มาตรฐาน เพราะผู้ทำจะต้องเข้าใจถึงที่มาของการดื้อยา ความเสถียรของยาเมื่อถูกความร้อน หรือเมื่อเก็บรักษาที่เย็น action ของยาที่เปลี่ยนไปเมื่อผสมลงอาหาร วิธีการทำ การอ่านผล การรายงานผล รวมทั้งการตัดสินใจว่าเชื้อดื้อยา⁽¹²⁾

อีกสาเหตุหนึ่งที่มีการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา ไม่ได้ทำกันแพร่หลาย มาจากการศึกษาเรื่อง reliability ของการทดสอบในช่วงก่อนปีพ.ศ. 2523⁽¹³⁾ ในประเทศอังกฤษและสหรัฐอเมริกา โดย reference laboratory ในทั้งสองประเทศได้ทำการทดสอบ ความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาจำนวน 234 สายพันธุ์ (ในอังกฤษ) พบว่า เชื้อวัณโรคร้อยละ 50-70 ที่ถูกรายงานว่าเชื้อดื้อต่อยา SM PAS หรือ INH กลับกลายเป็นเชื้อที่ไวต่อยาเมื่อทดสอบซ้ำ จึงมีการสรุปว่าการรายงานผลว่าเชื้อ

วัณโรคตื้อยานั้นส่วนใหญ่ผิดมากกว่าถูก อีกการศึกษาหนึ่ง ทำในสหรัฐอเมริกา โดยมีการคัดเลือกห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลที่มีเกณฑ์สูงกว่ามาตรฐานเฉลี่ยของประเทศมา 43 แห่ง ทั้ง 43 แห่งได้รับเชื้อจากห้องปฏิบัติการมาตรฐานไปทดสอบ ผลปรากฏว่ามีเพียงร้อยละ 53.5 เท่านั้น ของห้องปฏิบัติการเหล่านี้ที่รายงานผลสอดคล้องถูกต้อง ทำให้เกิดข้อสรุปว่าห้องปฏิบัติการที่แม้จะมีมาตรฐานสูงกว่าเกณฑ์เฉลี่ย ก็ไม่ได้รายงานผลการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาถูกต้องตรงกันแบบที่น่าเชื่อถือได้เสมอไป จนกระทั่งมีคำกล่าวว่า “คงจะมีหรืออาจจะมีห้องปฏิบัติการในโลกนี้จำนวนน้อยมาก ที่สามารถทดสอบผลความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา และได้ผลที่ consistently reliable”

เชื้อวัณโรคตื้อยาส่วนใหญ่เกิดจากขบวนการ random spontaneous mutation ระหว่างเชื้อสัมผัสกับยา ซึ่งโดยทั่วไปจะเกิดในอัตรา 10^{-8} ต่อ generation ซึ่ง mutant นี้จะมีชีวิตเพิ่มจำนวนต่อไปได้ ถ้ามีการรักษาด้วยยาเพียงชนิดเดียวก็จะส่งผลให้ mutant เหล่านี้ถูกคัดเลือกจนกลายเป็นเชื้อส่วนใหญ่ที่ตื้อยาในที่สุด (acquired resistance) ส่วน primary drug resistance จะหมายถึงเชื้อตื้อยาที่ตรวจพบในผู้ป่วยวัณโรคเป็นใหม่ ซึ่งไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคมามาก่อน จากการศึกษาและวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ พบว่า ในอัตราส่วนที่พบเชื้อตื้อยาดังแต่ร้อยละ 1 การรักษาด้วยยาชนิดนั้น ๆ ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีเชื้อตื้อตื้อยานี้จะไม่ประสบผลสำเร็จ⁽¹²⁾ จึงได้ตกลงว่า ถ้าทดสอบพบว่าเชื้อตื้อต่อยาใดเท่ากับหรือมากกว่าร้อยละ 1 ขึ้นไป ให้รายงานว่าเป็นเชื้อตื้อต่อยา ความเข้มข้นของยาที่จะใช้ในการทดสอบจึงมีความสำคัญมาก ระดับความเข้มข้นของยาที่ควรใช้มักอาศัยระดับยาในเลือดและค่าของ MIC (minimal inhibitory concentration) ที่ได้จากการทดสอบ ดูได้จากเอกสารอ้างอิง 12 และ 54

การทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยามี 4 วิธี ได้แก่ วิธี resistance ratio วิธี absolute concentration วิธี proportion และวิธี radiometry (ใช้ BACTEC 460) ซึ่งสามารถทดสอบได้ทั้งจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง (direct test) หรือทดสอบจากเชื้อที่เพาะขึ้นแล้ว (indirect test) โดย 3 วิธี แรกให้ผลที่คล้ายคลึงกัน วิธี resistance ratio นิยมใช้ในประเทศอังกฤษ ในขณะที่วิธี proportion นิยมใช้ในสหรัฐอเมริกา ส่วนวิธี radiometry เป็นวิธีที่รวดเร็ว และให้ผลน่าเชื่อถือ ใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการทดสอบยาหลักที่ใช้รักษาวัณโรค (first-line drug) ยกเว้น pyrazinamide เนื่องจากปัญหาการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบกับยาชนิดนี้ ต้องพยายามให้อาหารมีสภาพเป็นกรด pH ประมาณ 5.2 ซึ่งจะเป็นสถานะที่เหมาะสมที่ยาจะออกฤทธิ์ วิธีที่ยอมรับว่าใช้แทนกันได้สำหรับการทดสอบยานี้ คือ การตรวจหาเอนไซม์ pyrazinamidase โดยเชื้อวัณโรคที่ตื้อต่อยาจะขาดเอนไซม์นี้ แต่วิธีนี้ยังไม่ได้มีการศึกษามากพอที่จะสรุปว่าจะใช้เป็นวิธีทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาแทนวิธีทั้ง 4 ที่กล่าวข้างต้นได้⁽⁶⁾

ความสัมพันธ์ระหว่าง ผลการทดสอบการต้านยา กับผลการรักษาที่สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย (พ.ศ. 2527) แสดงในตารางที่ 2⁽⁷⁾

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา กับผลการรักษา

ผลการทดสอบ ความไวของเชื้อ วัณโรคต่อยา	ร้อยละของการรักษาหายในผู้ป่วย		
	กลุ่ม minimal lesion	กลุ่ม moderately advanced	กลุ่ม far advanced
เชื้อไวต่อยา	98.05	93.51	83.08
เชื้อดื้อต่อยา	94.44	65.38	42.86

วิธีทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาในปัจจุบันซึ่งองค์การอนามัยโลกเสนอให้ประเทศต่างๆ ที่เป็น endemic area ของวัณโรคใช้ เพื่อการทำ Antituberculous susceptibility surveillance ทั่วโลก คือวิธี proportion โดยใช้ LJ เป็นอาหารเพาะเชื้อและทดสอบกับยาหลักที่ใช้รักษาวัณโรคทั้ง 4 ชนิดคือ INH, RMP, SM และ EMB (คุณสมบัติที่ เหยื้อหนอง, กองวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข)

ความพยายามในเรื่องการพัฒนาวิธีการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยา ส่วนใหญ่ต้องการทำให้ทราบผลรวดเร็วขึ้นและมีความถูกต้องโดย correlate กับวิธี proportion หรือวิธี radiometry เพื่อรักษาผู้ป่วยและป้องกันการแพร่ระบาดของ MDR-TB หรือลดค่าใช้จ่ายของการต้องอยู่ในโรงพยาบาลเมื่อถูกสงสัยว่าติดเชื้อ MDR-TB เช่นในสหรัฐอเมริกา หรือต้องการพัฒนาวิธีทดสอบความไวใหม่ๆ เพื่อใช้ในการตรวจกรองหาสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทำลายมัยโคแบคทีเรียซึ่งอาจพัฒนาเป็นยาต่อไปได้ วิธีต่างๆ ดังกล่าวได้แก่ วิธี bioluminescence assay^(57, 58) วิธี microplate alamar blue assay⁽⁵⁹⁾ Green fluorescent protein reporter⁽⁶⁰⁾ วิธีเปลี่ยนสีของสารบางชนิดเช่น tetracycline เมื่อถูก reduce^(61, 62) โดยใช้ flow cytometry^(63, 64) และวิธีทางอณูชีววิทยา⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾

วิธี bioluminescence assay (Bio-Siv)^(57, 58) อาศัยหลักการวัด metabolic activity ของเซลล์จากระดับ ATP โดย clone gene luciferase ของหิ่งห้อย (*Photinus pyralis*) หรือ American firefly เข้าใน DNA vector จากนั้นนำเข้าเซลล์ของมัยโคแบคทีเรียโดยวิธี electroporation คัดเลือกโคโลนีที่มี plasmid DNA vector โดยดูความสามารถในการเจริญบนอาหารที่เติม 20 µg/ml ของ Kanamycin vector ที่นิยมใช้ คือ pMV361 และ pMH46⁽⁵⁸⁾ นำ transformants ที่ได้ ไปทดสอบกับยารักษาผู้ป่วยวัณโรคความเข้มข้นต่างๆ กัน จากนั้นก็นำไปตรวจวัด fluorescence ด้วยเครื่อง luminometer หลังจากเติม substrate luciferin โดยจากการศึกษาของ Nilsson และคณะ พบว่าเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* H37Rv และเชื้อจากผู้ป่วย 25 สายพันธุ์ เมื่อ treat กับ EMB, INH, RMP และ SM ความเข้มข้นระดับต่างๆ สามารถตรวจพบ ATP suppression หรือพบว่าเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ในเวลา 5-7 วัน เมื่อพิจารณาค่า breakpoint ที่ตัดสินว่าเชื้อดื้อ หรือไวต่อยา เปรียบเทียบกับผลที่ได้จาก BACTEC 460 มีค่าถูกต้องตรงกันร้อยละ 99 ในขณะที่สอดคล้องกับวิธี resistance ratio บน LJ ร้อยละ 98 วิธี bioluminescence จึงมีข้อดีที่ได้ผลเร็วเท่าๆ radiometry method แต่ราคาถูกกว่า⁽⁶⁷⁾ ต่อมา Arain และคณะ⁽⁶⁸⁾ ได้พัฒนาวิธีการนี้ให้สามารถใช้ในการ screen หา antimycobacterial substances จำนวนมาก ในเวลาสั้น โดยทำใน microtiterplate ได้ โดยให้ชื่อว่า

Bioluminescence Screening *in vitro* assay (Bio-Siv) Arain และคณะได้สร้าง recombinant *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. avium* และ *M. intracellulare* และทดสอบคัดเลือก condition ที่เหมาะสมในการบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อมีชีวิตกับเชื้อที่ตาย พบว่าสามารถใช้ค่า MIC ของยาหลายชนิดต่อเชื้อทั้ง 4 ได้ในเวลา 5-7 วัน วิธีการทำงาน ราคาถูก และเหมาะสำหรับใช้ในการทดสอบกับสารใหม่ๆ ที่ต้องการหา antimycobacterial activity⁽⁵⁸⁾ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ยุ่งยาก และจำเป็นต้องใช้ luminometer ในการวัด fluorescence อีกทั้งในด้านงาน routine คงไม่สะดวกเพราะจะต้องเตรียม recombinant *M. tuberculosis* ของผู้ป่วยทุกรายที่ต้องการทดสอบ

วิธีดูการเปลี่ยนสีของสารบางชนิดเมื่อถูก reduce เช่น alamar blue⁽⁵⁹⁾, green fluorescence protein (GFP)⁽⁶⁰⁾, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)^(61, 62) วิธีต่างๆ เหล่านี้จะช่วยให้ตรวจพบความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ตาย (เช่น ไวต่อยา) กับเชื้อที่มีชีวิต (เช่น เชื้อดื้อยา) ได้รวดเร็วขึ้น จากการวัด fluorescence^(59, 60) หรือวัด optical density^(61, 62) หรือสามารถดูการเปลี่ยนสีได้ด้วยตาเปล่า^(59, 61, 62)

สำหรับ Alamar blue⁽⁵⁹⁾ ในรูป oxidize เป็นสารประกอบสีฟ้า ไม่เรืองแสง ใช้เป็น indicator บอกว่ามีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นในเซลล์หรือเซลล์ยังมีชีวิต สารนี้ ในเซลล์ที่มีชีวิตจะถูก reduce เปลี่ยนเป็นสีชมพู และเรืองแสง ทำให้ตรวจวัดปริมาณได้โดยวัดความเข้มของการเรืองแสง วัด optical density หรือดูด้วยตาเปล่า Collins และ Franzblau ได้พัฒนาวิธีตรวจกรองสารใหม่ๆ ในธรรมชาติ หรือที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อหา antimycobacterial activity เมื่อทดสอบกับ *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra และ *M. avium* ใน microtiter plate โดยใช้ alamar blue เป็น indicator (MABA) เปรียบเทียบกับ BACTEC 460 พบว่าค่า MIC ที่ได้ ไม่ว่าจะเป็นจากผลที่อ่านด้วยตาเปล่า หรือวัดค่า fluorescence ได้ สอดคล้องอย่างสูงกับค่าที่ได้จาก BACTEC จึงสรุปว่าวิธีนี้มีความไว ทราบผลได้รวดเร็วเท่ากับ BACTEC ราคาถูก อีกทั้งสะดวก เพราะไม่ต้องอาศัยเครื่องมือที่ราคาแพง

Green fluorescent protein (GFP)⁽⁶⁰⁾ เป็นสารประกอบที่พบในแมงกะพรุน (jellyfish) ที่ชื่อ *Aequorea victoria* นำมาใช้เป็น indicator หรือ reporter molecule ที่จะบอกว่าเซลล์มีชีวิตหรือตายแล้ว คล้ายๆ กับ luciferase assay แต่มีข้อดีกว่าคือ ไม่จำเป็นต้องอาศัย substrate หรือ cofactor ใดๆ ในการทำให้เรืองแสง เพราะเป็นสารเรืองแสงในตัวเอง Collins และคณะ ได้ใช้ pFPV2 expression vector ซึ่งมีชิ้นส่วนของยีนสร้าง GFP electroporate เข้าเซลล์ของ *M. tuberculosis* H37Rv และ H37Ra แล้วนำ recombinant strain ที่ได้มาตรวจหาค่า MIC ของยา 10 ชนิดรวมทั้ง INH, RMP, SM, และ EMB ต่อเชื้อใน microtiter plate เรียกว่าวิธี GFPMA เปรียบเทียบกับ BACTEC 460 พบว่าได้ผลสอดคล้องกันดีมาก และทราบผลภายในเวลา 7 วัน นอกจากวิธีนี้ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และ ราคาไม่แพง แล้วยังสามารถหาค่า dynamic response ของเชื้อวัณโรคต่อยาได้ด้วย

สารประกอบ MTT^(61, 62) ใน oxidize form เป็นสารมีสีเหลือง จะถูก reduce โดยเอนไซม์ dehydrogenase ที่อยู่ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต กลายเป็นผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่งมีสีม่วง มีการนำ MTT มาใช้ประโยชน์ในการตรวจ viability ของเชื้อวัณโรคหลังจากสัมผัสกับ RMP พบว่าเชื้อวัณโรค

ที่ถูกทำลายด้วยยาจะไม่สามารถ reduce MTT ให้เป็น formazan ได้ ในขณะที่เชื้อที่มีชีวิตสามารถทำได้ และเห็นเชื้อเจริญเป็นตะกอนสีม่วง หรือสามารถ lyse เซลล์ ด้วย 20% sodium dodecyl sulfate ใน 50% N, N-dimethylformamide (pH 4.7) นำไปวัดค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 570 nm เพื่อบอกเป็นปริมาณการดื้อ หรือ ทนต่อสารที่ทดสอบได้⁽⁶¹⁾ โดยวิธีนี้สามารถตรวจว่าเชื้อวัณโรคดื้อ ต่อยา RMP ได้ แม้จะมีเชื้อดื้อยาเพียงร้อยละ 1 ใน population ที่ทำการทดสอบ วิธีทดสอบทำได้ง่าย ราคาถูก และทราบผลในเวลาน้อยกว่า 3 วัน วิธีนี้ ถ้าใช้ทดสอบ RMP และ INH จะเป็นวิธี screen หา MDR-TB ที่มีราคาถูกเหมาะสำหรับการใช้งานในประเทศยากจน ซึ่งผลจะเหมือนกับที่ทำด้วยวิธี proportion หรือวิธีมาตรฐานอื่นๆ ที่ทำบนอาหารแข็ง⁽⁶²⁾ แต่จะประหยัดกว่าเพราะทำใน microtube ได้ ไม่เปลืองเนื้อที่เก็บ

วิธีต่างๆ ดังกล่าวมาข้างต้น อาศัยปฏิกิริยา reduction และการเปลี่ยนสีของ indicator ที่ใช้ การดูด้วยตาเปล่า หรือ วัดด้วย spectrophotometer หรือ ด้วย luminometer ทำให้อ่านผลได้ในเวลา เพียง 3-7 วัน ซึ่งดีกว่าหรือดีเท่าเทียมกับการใช้วิธี radiometry ในการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรค ต่อยา วิธีใช้ fluorescein diacetate (FDA) และ flow cytometry สามารถนำมาตรวจหาเชื้อวัณโรคดื้อ ยา หรือไวต่อยาได้⁽⁶³⁾ รวมทั้งใช้ทดสอบความไวของเชื้อกลุ่ม NTM ต่อยาได้ด้วย⁽⁶⁴⁾ สาร FDA เป็น สารประกอบ nonpolar, nonfluorescence ซึ่ง diffuse ผ่านผนังเซลล์และ cell membrane ของมัยโค แบคทีเรียได้ทั้งโดยวิธี active และ passive เมื่อเข้าไปใน cytoplasm แล้ว FDA จะถูก hydrolyse ด้วย esterase ให้กลายเป็น fluorescein เมื่อเซลล์ตาย ปฏิกิริยาดังกล่าวจะไม่เกิดขึ้น ทำให้ตรวจวัด fluorescence ได้น้อยหรือไม่ได้เลย Norden และคณะ ได้อาศัยหลักการนี้ทดสอบความไวของเชื้อวัณ โรคและ NTM เช่น *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. goodii*, หรือ *M. marinum* กับยาหลักและยา รอง (second line drugs) 9 ชนิด พบว่าได้ผลดี สามารถทราบผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาได้ ภายในเวลาเพียง 1 วัน หลังจากที่เราเริ่มให้เชื้อสัมผัสกับยา^(63, 64) ถึงวิธีนี้จะทราบผลเร็ว ผล reproducible และทำได้ แต่ก็ต้องใช้เครื่อง flow cytometry ที่ราคาแพง รวมทั้งต้องการ P3-laboratory facility เมื่อใช้ทดสอบความไวของเชื้อวัณโรค เพราะอาจมีเชื้อ MDR-TB หรือแม้แต่จะ ฆ่าเซลล์ด้วย formalin ก่อนเข้าเครื่องวัดได้ก็ยังคงไม่เหมาะในประเทศยากจนที่จะใช้ในงาน routine แต่น่าจะเหมาะสำหรับงานวิจัย เช่น screen หา antimycobacterial substances

สำหรับการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาโดยใช้วิธีอณูชีววิทยา⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾ แนวโน้มที่จะนำ มาใช้ในงาน routine ได้ ยังมีค่อนข้างน้อยถึงแม้ว่าจะให้ผลที่มีความไวและความจำเพาะสูงก็ตาม เพราะส่วนหนึ่งมีราคาแพง และต้องใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น การใช้ DNA probe^(65, 66) ส่วนการตรวจดู ความเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีผลต่อการดื้อยา ที่สามารถพัฒนาจนเป็น screening test สำหรับตรวจหา เชื้อวัณโรคที่ดื้อยาได้ ปัจจุบันมีเฉพาะตรวจหาเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อ RMP^(67, 69) คือ การใช้ Line probe assay Rif TB (LiPA Rif TB) ของ Innogenetics สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคดื้อยา RMP จาก stock culture เทียบกับวิธี resistance ratio 16/16 สายพันธุ์ และเมื่อทดสอบกับเชื้อของผู้ป่วยที่เพาะแยก ได้ใหม่อีก 38 สายพันธุ์ พบว่าได้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 94.7 การใช้วิธีอณูชีววิทยาเพื่อทดสอบ

ความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาชนิดอื่น ๆ เช่น INH, SM, EMB หรือ kanamycin⁽⁶⁸⁾ ยังไม่สามารถใช้ในงาน routine ได้ในปัจจุบัน

6. การตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วิธีทางอณูชีววิทยาที่ได้รับความสนใจและใช้ในเรื่องการวินิจฉัยวัณโรคก็คือวิธี PCR หลักการของการวินิจฉัยโดยใช้วิธี PCR เป็นการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ ส่วนที่มีความจำเพาะต่อจุลชีพที่ต้องการตรวจหา ถ้าตรวจพบก็เป็นตัวแทนที่จะบอกว่าพบจุลชีพนั้น ทางทฤษฎีโดยใช้วิธีนี้จะทำให้สามารถตรวจพบจุลชีพก่อโรคเพียง 1 เซลล์ในสิ่งส่งตรวจต่างๆ เช่น เสมหะ น้ำไขสันหลัง น้ำเจาะจากช่องเยื่อหุ้มปอด หรือเลือดได้ ขั้นตอนของการทำ PCR เป็นการเลียนแบบการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA replication) ในหลอดทดลองโดยให้เกิดซ้ำกันหลายๆ รอบและอาศัยเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยในตอนแรกจะใช้ความร้อนขนาด 90°-95°ซ. ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว ขั้นนี้เรียกว่า denaturation ต่อไปเป็นขั้นตอนที่เรียกว่า primer annealing คือ จะลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 40°-60° ซ. เพื่อให้สายนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ขนาดยาว 20-30 เบส ที่เรียกว่าไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรคเข้าไปจับคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบ (template) จากนั้นจะเป็นขั้นตอนที่เอนไซม์ Taq polymerase จะสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ทางด้าน 3-OH จนได้เป็นสายดีเอ็นเอขนาดยาวตามต้องการ ขั้นตอนนี้เรียกว่า primer extension โดยจะให้เอนไซม์ทำงานได้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 72°ซ. เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนจะอยู่ระหว่าง 30 วินาทีถึง 2 นาที รวม 3 ขั้นตอน จะเรียกว่า 1 รอบของ PCR เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะจากเดิมได้อย่าง exponential โดยคำนวณผลผลิต PCR ได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของ PCR)⁽⁷⁰⁾

การพัฒนานำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจนั้นสามารถแบ่งเป้าหมายที่ใช้อย่างได้เป็น 2 ประเภท คือ เป้าหมายที่เป็นอาร์เอ็นเอ และเป้าหมายที่เป็นดีเอ็นเอ เชื้อวัณโรคมีขนาดจีโนม 4,411,529 bp ประกอบด้วยเบส guanine, cytosine สูงถึงร้อยละ 65.6⁽⁷¹⁾ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคที่มีกลุ่มผู้วิจัยเลือกมาเป็นเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท^(72,73) ได้แก่

ดีเอ็นเอส่วนยีนที่ทำหน้าที่เฉพาะและสร้างผลผลิตที่มีการศึกษารายละเอียดมาแล้ว เช่น

- ยีน *gro EL* ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนฮีทช็อกที่มีขนาดโมเลกุล 65 kD
- ยีน *MPB64* ควบคุมการสร้างโปรตีน MPB 64
- ยีน *Pab* ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนแอนติเจน b ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 38 kD
- ยีน *MPB 70* ควบคุมการสร้างโปรตีน MPB 70
- ยีนควบคุมการสร้างโปรตีนของมัยโคแบคทีเรียขนาด 32 kD
- และยีนสำหรับการสังเคราะห์ 16S rRNA

เป้าหมายประเภทที่สองเป็นดีเอ็นเอที่ยังไม่ทราบหน้าที่มีเพียงผลการทดลองที่แสดงว่าเป็นดีเอ็นเอที่จำเพาะที่พบในเชื้อวัณโรคหรือพบในมัยโคแบคทีเรียกลุ่มก่อวัณโรค มีทั้งที่มีเพียง 1 ชุดใน 1

จีโนม เช่น *mtp* 40, pT7T3 18U, pPH7311, ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Mt308 และมีหลายชุดต่อหนึ่งจีโนม เช่น ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ p36T, pCM3, pMTbsk2 และ M13KE39 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอใน M13KE39 จากการศึกษาลำดับเบสต่อมาพบว่าจัดเป็นดีเอ็นเอกลุ่ม insertion sequence (IS) มีชื่อว่า IS6110 หรือ IS986

ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค ส่วนใหญ่จะจำเพาะต่อมัคโคแบคทีเรียกลุ่มก่อวัณโรค ส่วนความไวของไพรเมอร์ชุดต่างๆ ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR มีค่าต่างๆ กัน จำนวนดีเอ็นเอเริ่มต้นที่จะทำให้ตรวจพบผลผลิต PCR ได้มีปริมาณแปรผันระหว่าง 50 พิโคกรัม (pg) ถึง 1 fg ไพรเมอร์ของดีเอ็นเอที่มีจำนวนหลายชุดในจีโนม จะมีความไวสูงกว่าไพรเมอร์จากยีนที่มีเพียง 1 ชุด ในจีโนมประมาณ 10-20 เท่า และดีเอ็นเอเป้าหมายที่จะใช้เริ่มในการทำ PCR เพื่อให้ผลบวกเมื่อตรวจจากการดูแถบดีเอ็นเอเรืองแสงมีปริมาณต่ำสุดประมาณ 100-10 fg หรือจากการทำ autoradiography หลังการทำ DNA hybridization จะมีปริมาณต่ำสุดถึง 10-1 fg.

การใช้วิธี PCR ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจโดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อวัณโรค ค่าความไวและความจำเพาะของไพรเมอร์ชุดต่างๆ ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าความไวและความจำเพาะของการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อวัณโรค จากสิ่งส่งตรวจชนิดต่างๆ เทียบกับการย้อมสีทึบกรด (acid fast staining) และ/หรือ การเพาะแยกเชื้อ

ผู้วิจัย	ลำดับเบสของ primer มาจาก	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไวของวิธี (จำนวน + PCR/ จำนวนทั้งหมด)	ความจำเพาะของวิธี (จำนวน-PCR/ จำนวนทั้งหมด)
Brisson-Noel A. et al 1989 ⁽⁷⁴⁾	<i>gro EL</i> gene (gene for 65kD heat shock protein)	เสมหะ, น้ำล้างกระเพาะ, ชิ้นเนื้อ, หนองจากแผล	100% (12/12)	100% (20/20)
Pao CC. et al 1990 ⁽⁷⁵⁾	<i>gro EL</i>	เสมหะ, น้ำเจาะจากปอด	100% (49/49)	62.6% (166/235)
Brisson-Noel A. et al 1991 ⁽⁷⁶⁾	<i>gro EL</i> gene (gene for 65 kD heat shock protein) และ IS6110	น้ำล้างกระเพาะ, เสมหะ, น้ำล้างปอด, น้ำเจาะจากปอด, ปัสสาวะ, น้ำไขสันหลัง, เลือด, ชิ้นเนื้อ, หนอง และอื่นๆ	98.2% (108/110)	78.8% (156/198)
Pierre C. et al 1991 ⁽⁷⁶⁾	<i>gro EL</i>	เสมหะ, น้ำล้างกระเพาะ	100% (24/24) เทียบกับผลเพาะเชื้อ 63% (35/59) เทียบกับผลเพาะเชื้อ และอาการทางคลินิก	91% (21/23)
Seelig R et al 1991 ⁽⁷⁷⁾	<i>gro EL</i>	เสมหะ, น้ำล้างปอด, น้ำล้างกระเพาะ, น้ำเจาะจากปอด, ปัสสาวะ, น้ำไขสันหลัง, เลือด, ชิ้นเนื้อ, ไช กระดูก, อูจจาระ	93.8%	-
Thierry D et al 1990 ⁽⁷⁹⁾	IS6110 <i>gro EL</i> gene	เซรัม, เสมหะ, น้ำล้างกระเพาะ, น้ำไขสันหลัง, น้ำเจาะจากปอด	100% (30/30)	90.9%(50/55)
Walker DA et al 1992 ⁽⁸¹⁾	IS6110 <i>gro EL</i> gene	เสมหะ, น้ำล้างปอด	80% (4/5) (ผู้ป่วยกำลังเป็นโรค) 80% (16/20) 62.5% (5/8) (ผู้ที่เคยป่วยเป็นวัณโรค) 55.6% (5/9) 66.7% (4/6) (ผู้ที่สัมผัสกับผู้ป่วยวัณโรค)	89.3% (50/56) 65.1% (28/43)
De Lassence A. et al 1992 ⁽⁸⁰⁾	IS6110 <i>gro EL</i> gene	น้ำจากเจาะปอด	60% (9/15) 20% (3/15)	- -

ผู้วิจัย	ลำดับเบสของ primer มาจาก	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไวของวิธี (จำนวน + PCR/จำนวนทั้งหมด)	ความจำเพาะของวิธี (จำนวน-PCR/จำนวนทั้งหมด)
Saboor SA et al 1992 ⁽⁸²⁾	IS6110 & <i>gro EL gene</i>	น้ำล้างปอด, น้ำล้างหลอดลม และอื่นๆ	61.5% (8/13) (ผู้ป่วยกำลังป่วยด้วยวัณโรค) โดยดูอาการและหรือผล การเพาะเชื้อ 32.7% (16/49) (ผู้ที่เคยป่วยเป็นวัณโรค)	90.9 (20/22)
Eisenach KD et al 1991 ⁽⁸³⁾	IS6110	เสมหะ	97.7% (43/44) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	91.5% (108/118)
Buck GE et al 1991 ⁽⁸⁴⁾	IS6110	ไม่บอกชนิด	92% (24/26) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	100% (17/17)
Shawar RM et al 1993 ⁽⁸⁵⁾	IS6110	ไม่บอกชนิด	66% (24/36) ย้อมดูแถบตีเอ็นเอด้วย ethidium bromide 77% (28/36) ตรวจแถบตีเอ็นเอด้วย DIG system 75% (26/34) ตรวจแถบตีเอ็นเอด้วย AP system	100% (40/40) 95% (38/40) 100% (40/40)
Folgueira L et al 1993 ⁽⁸⁶⁾	IS6110	เสมหะ, น้ำเจาะจากปอด ปัสสาวะ, หน่อง, น้ำเจาะจากข้อ, ต่อมไทรอยด์	100% (71/71)	81.8% (18/22)
Kolk AHJ et al 1992 ⁽⁸⁷⁾	IS986	น้ำไขสันหลัง, เสมหะ, น้ำเจาะจากปอด, เลือด, หน่อง, ไชกระดูก, ปัสสาวะ, ชี้นเนื้อ	95.6% (43/45)	80.2% (142/177)
Shankar P et al 1991 ⁽⁸⁸⁾	gene <i>MPB64</i>	เสมหะและน้ำไขสันหลัง	(8/8) เสมหะ (22/34) น้ำไขสันหลัง	88.2 (45/51)
Kaneko K et al 1990 ⁽⁸⁹⁾	gene <i>MPB64</i>	น้ำไขสันหลัง	83.3% (5/6)	-
Soini H et al 1992 ⁽⁹⁰⁾	gene coding for the 32 kD antigen	เสมหะ	55.9% (19/34)	93.5% (87/93)
Cousins DV et al 1992 ⁽⁹¹⁾	gene <i>MPB70</i>	เสมหะ, ปัสสาวะ, น้ำล้างปอด, อุจจาระ เนื้อปอดและอื่นๆ	97.0% (65/67) เทียบกับผลการย้อมสี ทึบ กรดและการเพาะเชื้อ	75.5% (83/110)

ผู้วิจัย	ลำดับเบสของ primer มาจาก	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไวของวิธี (จำนวน + PCR/ จำนวนทั้งหมด)	ความจำเพาะของวิธี (จำนวน-PCR/ จำนวนทั้งหมด)
Portillo PD <i>et al</i> 1991 ⁽⁹²⁾	mtp40	เสมหะ, น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ	100% (14/14) เพาะเชื้อชั้น 11 และ ย้อมสีทึบกรดให้ผลบวก 3	71.4% (10/14)
De Wit D <i>et al</i> 1990 ⁽⁹³⁾	p36	น้ำไขสันหลัง, น้ำเจาะจากปอด, น้ำเจาะจากหัวใจ, ชิ้นเนื้อปอด	100% (14/14) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	-
Sritharan V and Barker Jr. RH. 1991 ⁽⁹⁴⁾	pMTb4	สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ	100% (74/74) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	36.4% (14/22)
Altamirano M <i>et al</i> 1992 ⁽⁹⁵⁾	pT7T8 18U	เสมหะ	98% (43/44) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	100% (156/156)
Thierry D <i>et al</i> 1992 ⁽⁹⁶⁾	Mt308	เสมหะ, น้ำเจาะจากปอด, ชิ้นเนื้อ, น้ำล้างปอด, น้ำล้างกระเพาะ, ปัสสาวะ	92.9% (13/14) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ และ/หรือการย้อมสีทึบกรด	93.8% (15/16)
Charoenratanakul <i>et al</i> 1996 ⁽⁹⁷⁾	16 S rRNA gene	น้ำล้างหลอดลม	77% (10/13) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ และ/หรือการย้อมสีทึบกรด	83% (5/6)
Chaiprasert <i>et al</i> 1996 ⁽⁹⁸⁾	16 S rRNA gene	เสมหะ	91.9% (57/62) เทียบกับผลการเพาะเชื้อ	95.4% (42/44)

วิธีที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณ nucleic acid ในหลอดทดลอง ที่มีการผลิตออกมาจำหน่าย เพื่อให้ใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงในปัจจุบันแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดง commercial kit และ automate system ที่ใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจโดยตรง โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณ nucleic acid

ชื่อ kit หรือเครื่อง	หลักการ
1. Amplified <i>Mycobacterium</i> Direct Test (AMTDT หรือ MTD) ของ Gen Probe	เพิ่มปริมาณ ribosomal RNA ของ เชื้อวัณโรคในตัวอย่างส่งตรวจ จากนั้นใช้ specific sequence จากส่วน 16S rRNA gene เป็น probe โดยติดฉลากด้วยสารเคมีเรืองแสง ถ้ามีเชื้อวัณโรคอยู่ และมีการเพิ่มปริมาณ rRNA จะวัดค่าความเรืองแสงได้มากกว่า 30,000 RLU ซึ่งรายงานเป็นผลบวก วิธีนี้ทำการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงได้ผลภายใน 1 วัน จำเป็นต้องมี Sonicator bath และ Luminometer จากการประเมินวิธี MTD เพื่อวินิจฉัยวัณโรคปอดเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อพบว่าได้ค่าความไวสูงถึง 82-93.8% ส่วนค่าความจำเพาะมีค่าเท่ากับ 85.3-97.8% ⁽⁹⁹⁻¹⁰³⁾ MTD ได้รับอนุมัติจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา ให้สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค (rapid diagnosis of tuberculosis) โดยทำกับเสมหะที่ให้ผล AFB บวก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 จากการศึกษาล่าสุดของ Jorgensen และคณะ ⁽¹⁰³⁾ พบว่าพบผลบวกปลอมได้ถ้าในสิ่งส่งตรวจมี <i>M. kansasii</i> หรือ <i>M. avium</i> ปริมาณประมาณ 10^5 - 10^7 cfu/ml โดยสามารถให้ค่า RLU ระหว่าง 30,000-50,000 ได้ ขณะนี้ทางบริษัทกำลังพัฒนาเป็น MTD2 ซึ่งคาดว่าจะมีความจำเพาะสูงขึ้น
2. Amplicor PCR [™] for <i>Mycobacterium</i> ของ Roche	เพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene โดยวิธี PCR จากนั้นตรวจหา product โดยใช้ probe ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ coat ติดกับ microtiter plate หลังทำปฏิกิริยาจะเห็นสีเหลืองเกิดขึ้นถ้ามี DNA ของเชื้อวัณโรค และสีไม่มีสี เมื่อไม่มีเชื้อวัณโรค บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้วัด optical density ของสารละลาย โดยถ้าได้ค่า O.D. 450 nm >0.3 จึงถือว่าเป็นผลบวก ใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 1 วันครึ่ง จำเป็นต้องมี DNA-Thermal cycler และ ELISA reader Ichiyama และคณะ ⁽¹⁰⁴⁾ ได้ศึกษาผลของการใช้วิธี strand displacement amplification (SDA) method เปรียบเทียบกับ Amplicor PCR และการเพาะแยกเชื้อเพื่อตรวจ

2. Amplicor PCR[™] for <i>Mycobacterium</i> ของ Roche (ต่อ)	หา mycobacteria จากเสมหะ พบว่า SDA มีความไว 94.7% ในขณะที่ Amplicor PCR มีความไว 89.5% โดยเปรียบเทียบกับผลการเพาะเชื้อ ส่วนความจำเพาะของทั้งสองระบบเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยโรคทางคลินิกมีค่าเท่ากับ 99.8% สำหรับ SDA และ 100% สำหรับ PCR ตามลำดับ Bennedsen และคณะได้ทดลองใช้ Amplicor ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจ 7,194 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 3,738 คน พบผู้ป่วยที่เพาะแยกเชื้อได้ 204 คน ในกลุ่มตัวอย่างที่เพาะเชื้อขึ้น ความไวของวิธี PCR คิดเป็น 91.4% เมื่อเป็นตัวอย่างที่ให้ผล smear บวก และ 60.9% สำหรับตัวอย่าง smear ลบ โดยมีค่าความจำเพาะ 96.1%⁽¹⁰⁵⁾ ปัจจุบันบริษัทผู้ผลิตได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยหลักการเดียวกันนี้ให้อยู่ในรูปแบบอัตโนมัติ ทำได้โดยใช้เครื่องมือและวัสดุต่างๆที่ supply ให้พร้อม ในรูปที่ชื่อว่า COBAS AMPLICOR PCR⁽¹⁰⁶⁾ เพื่อให้ใช้งานได้สะดวกขึ้น
3. TB FAST ของ Pharmagen	เพิ่มปริมาณส่วน DNA ของ IS6110 ตรวจหา product โดยเทคนิคคล้ายกับ Amplicor TB FAST จะมี internal control สำหรับตรวจ inhibitor ต่อ Taq polymerase ด้วยเครื่องมือที่ จำเป็นคล้ายของ Amplicor และเวลาที่ใช้ในการทดสอบจนทราบผลประมาณ 1 วันครึ่ง
4. LCx <i>Mycobacterium tuberculosis</i> assay ของ Abbott	ใช้เทคนิค ligase chain reaction (LCR) โดยเพิ่มปริมาณ DNA จากส่วน gene Pab ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนแอนติเจน B (PAB) ตรวจ product โดย microparticle enzyme immunoassay วัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น เครื่องมือที่จำเป็นประกอบด้วย Dry bath, thermal cycler for LCx, Lysor และ Detector ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง การศึกษาในประเทศนอร์เวย์โดยการใช้วิธี LCR เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ โดยตรงเปรียบเทียบกับผลการเพาะแยกเชื้อพบว่าวิธีนี้มีความไว 96.7% สำหรับสิ่งส่งตรวจที่ย้อมพบเชื้อ AFB และมีความไว 72.0% ในสิ่งส่งตรวจที่ย้อมไม่พบเชื้อโดยเมื่อรวมสิ่งส่งตรวจทุกประเภทวิธี LCR มีค่าความไวความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 90.2, 99.2,

	97.4 และ 96.7% ตามลำดับ^(107, 108) ในการตรวจหา <i>M. tuberculosis</i> ในสิ่งส่งตรวจจากกลุ่ม extrapulmonary disease^(110, 112) จะได้ค่าความไว ความจำเพาะ 77 และ 98.7% ตามลำดับ ส่วนกลุ่มสิ่งส่งตรวจที่ให้ผล smear ลบ ค่าความไวจะลดลงและแปรผันค่อนข้างมากจาก 17.4%⁽¹⁰⁹⁾ 27%⁽¹¹³⁾ และ 72%⁽¹⁰⁸⁾ ข้อสรุปของผู้ศึกษาส่วนใหญ่เห็นว่า LCR ให้ข้อมูลที่สำคัญที่จะช่วยวินิจฉัยโรคทั้งชนิดในปอด และนอกปอดได้รวดเร็ว แต่ยังมีราคาแพง
5. Amplified VIDAS test for <i>M. tuberculosis</i> ของ bio Merieux Vitek	ใช้หลักการของ Gen Probe คือ isothermal transcription mediated amplification system amplified 16S rRNA แล้วตรวจ product โดยวิธี enzyme-linked fluorescent detection ในเครื่อง VIDAS immunoassay instrument
6. BD Probe Tec Strand Displacement Amplification Assay ของ Becton-Dickinson	ใช้หลักการ strand displacement amplification (SDA) เพิ่มปริมาณ DNA จาก 2 target คือ จาก 16S rRNA gene และ IS6110 โดยเลือกให้มีความจำเพาะต่อมัยโคแบคทีเรียและต่อ <i>M. tuberculosis</i> complex ตามลำดับ หลังจากนำสิ่งส่งตรวจล้างหลาย ๆ ครั้งเพื่อขจัด inhibitor จะนำตะกอนละลายในบัฟเฟอร์ heat inactivation lyse เซลล์ด้วย mechanical agitation จากนั้นนำ sample ใส่ลงในเครื่อง decontamination-amplification devices (DADs) ซึ่งจะมีการทำลาย amplicon ด้วยน้ำยา แล้วจึงถูกส่งต่อเข้าเครื่องทำ amplification (โดยวิธี SDA) เพื่อ amplify target โดยมี internal amplification control ด้วย product จะถูกตรวจโดยหลักการ target-specific sandwich hybridization ซึ่งทำในเครื่อง single-use assay devices (ADs) แล้วจึงตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงด้วยเครื่อง luminometer^(114, 115) จากการเปรียบเทียบการใช้ BDProbe Tec MTB test ตรวจหาเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจได้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 95.8, 96.2, 54.8 และ 99.8% ตามลำดับ โดยเทียบกับการเพาะเชื้อด้วยเครื่อง BACTEC 460⁽¹¹⁴⁾ และให้ค่าความไวสูงถึง 92.3% ในสิ่งส่งตรวจที่ให้ผล smear ลบ⁽¹¹⁵⁾ จึงสรุปว่า

	ระบบนี้สามารถใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคได้ดีและรวดเร็วภายในเวลา 1 วัน
7. Automated Q-Beta replicase amplification (Galileo)	เป็นระบบที่ใช้ Q-Beta replicase เพิ่มปริมาณ probe โดย target คือส่วน 23S rRNA ของเชื้อกลุ่มก่อวัณโรค ⁽¹¹⁶⁾ โดยสามารถจะตรวจพบเชื้อในตัวอย่างส่งตรวจ เมื่อมีเชื้อโรคในระดับประมาณ 10-300 เซลล์ ชุดตรวจอัตโนมัติทดสอบสิ่งส่งตรวจได้ครั้งละ 10 ตัวอย่างหลังจาก load sample เข้าเครื่อง Galileo analyser นานประมาณ 3 ชั่วโมงก็จะทราบผลเบื้องต้น และใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 6.5 ชั่วโมงสำหรับผลขั้นสุดท้าย จากการศึกษาศึกษาของ Smith และคณะ ⁽¹¹⁷⁾ สามารถตรวจตัวอย่าง smear ลบที่เพาะเชื้อขึ้นได้ 69.2%

*kit ส่วนใหญ่เหมาะในการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากเสมหะและน้ำล้างหลอดลม ไม่แนะนำให้ใช้ในการตรวจกับน้ำไขสันหลัง หรือสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น

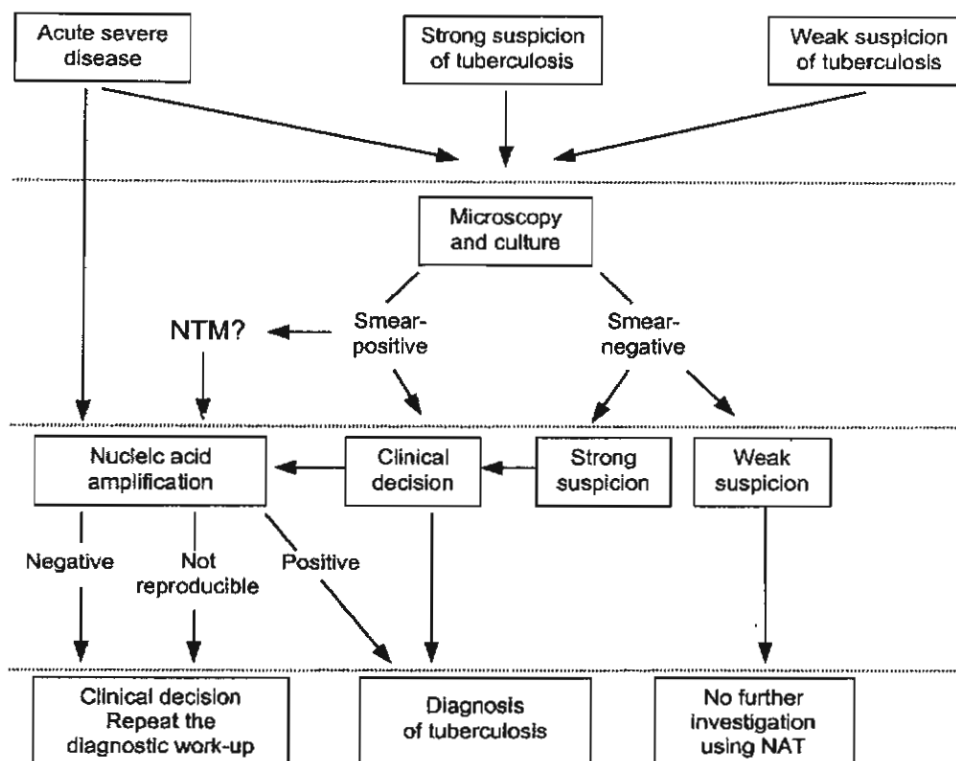
เท่าที่มีการศึกษามา ยังไม่พบวิธีหรือระบบการใช้ nucleic acid amplification (NA) ได้เลยที่ได้ผลดี และมีความไวสูงกว่าวิธีเพาะเชื้อ⁽¹¹⁸⁾ นอกจากนี้ก็ยังมีปัญหาในเรื่อง false positive จาก carryover contamination ซึ่งนิยมป้องกันโดยใช้ dUTP แทน dTTP ในปฏิกิริยา amplification เช่นในวิธี PCR และย่อยสลาย product ที่อาจปนใน DNA template ก่อนด้วยเอนไซม์ uracil-N-glycosylase (UNG) false negative ก็เกิดขึ้นได้จากการที่มี polymerase inhibitors ปนอยู่ในสิ่งส่งตรวจ เช่น ในเสมหะ ในเลือด ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการเตรียม DNA เพื่อให้บริสุทธิ์และระบบ internal control โดยทั่วไปยอมรับกันว่าใน ideal DNA extraction and amplification condition จะสามารถตรวจพบ DNA product ได้ ต้องมี target DNA อยู่อย่างน้อย 20 โมเลกุล ซึ่งการตรวจหาเชื้อโรคในสิ่งส่งตรวจที่มีปริมาณเชื้อน้อย เช่นในเลือด ในอาหาร ในน้ำไขสันหลัง ความไวของวิธี PCR จึงมักจะต่ำกว่าการเพาะเชื้อ⁽¹¹⁹⁾ สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นข้อจำกัดของวิธี nucleic acid amplification นอกเหนือจากเรื่องราคาแพง และ reliability ของการทำในห้องปฏิบัติการต่างๆ ในปัญหาข้อสุดท้าย นำไปสู่การพัฒนาาระบบอัตโนมัติหรือกึ่งอัตโนมัติที่จะนำมาใช้งานด้าน NA โดยเตรียมมาตรฐานน้ำยา และขั้นตอนการทำด้วยเครื่องมือแทนคน จากการศึกษาส่วนใหญ่สรุปว่าวิธี NA จะไวกว่าการตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์เพียง 10 เท่า เพราะตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจ reproducible คือเสมหะที่มีเชื้อประมาณ 5×10^3 cells/ml⁽¹²⁰⁾ รายละเอียดเกี่ยวกับ molecular diagnosis ของเชื้อวัณโรคว่าจะมีที่ใช้ในทางคลินิกอย่างไร มีคุณค่าในกรณีใด แนะนำให้อ่านรายงานการทบทวนวารสารของ Roth และคณะ⁽¹²⁰⁾ ซึ่งพอจะสรุปความเห็นของผู้เขียนต่อการนำ nucleic acid technologies (NATs) มาใช้งานในทางคลินิกได้ดังต่อไปนี้

1. NATs ไม่เหมาะสำหรับงาน screening หาผู้ป่วย
2. NATs ยังไม่สามารถทดแทน culture ได้
3. จะต้องมีระบบควบคุมคุณภาพในขั้นตอนต่าง ๆ ตั้งแต่การเก็บสิ่งส่งตรวจจนถึงการรายงานผล เพื่อให้ข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพของการทำในขั้นตอนต่าง ๆ เช่น การเตรียม nucleic acid ปัญหาการปนเปื้อน ความไวและความจำเพาะของ amplification system ให้กับแพทย์รับทราบได้
4. สำหรับการรายงานผลหรือการแปลผลจากห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องทดสอบซ้ำในตัวอย่างส่งตรวจที่ให้ผลบวก ดังนั้น การรายงานผลที่ได้จาก NATs ควรจะรายงานเป็น 3 แบบ ดังต่อไปนี้ คือ
 - positive (reproducible)
 - negative และ
 - unreproducible ซึ่งต้องให้เหตุผลประกอบไปด้วย

Roth และคณะ⁽¹²⁰⁾ ยังเสนอว่า จากความรู้เท่าที่มีในปัจจุบัน การวินิจฉัยวัณโรคโดยใช้ NATs ด้วย ควรทำในกรณีดังต่อไปนี้

1. ในผู้ป่วยใหม่ที่มีผล smear AFB บวก และอยู่ในเขตที่มีรายงานว่ามีการติดเชื้อกลุ่ม NTM ได้สูง หรือในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อกลุ่มนี้ เช่น ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV
2. เด็กๆที่เป็นวัณโรคของต่อมน้ำเหลือง เพราะในผู้ป่วยกลุ่มนี้มีโอกาสพบการติดเชื้อจากกลุ่ม *M. avium complex* ได้สูง
3. สิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัด หรือสิ่งส่งตรวจที่ได้มาโดยวิธี invasive ต่างๆ เพราะว่าสิ่งส่งตรวจเหล่านี้เก็บได้ด้วยความยากลำบาก จึงมีค่าเป็นอย่างยิ่ง และผลจากการศึกษาก็สนับสนุนว่า nucleic acid-based diagnostic tests มีความไวและความจำเพาะที่ช่วยให้วินิจฉัยวัณโรคนอกปอดในผู้ป่วยจำนวนมากได้ ก่อนที่จะทราบผลการเพาะเชื้อเป็นเวลานาน

Roth และคณะ เสนอให้แพทย์พิจารณาเลือกใช้วิธีการทางห้องปฏิบัติการโดยอาศัยข้อมูลทางคลินิกประกอบตาม Flow chart ดังต่อไปนี้



สำหรับผลของ NATs ต่อการรักษา น่าจะมีอิทธิพลต่อการตัดสินใจของแพทย์ในกรณีที่ได้ผล smear บวก แต่ผลของ NATs ต่อ *M. tuberculosis* เป็นลบ (ทั้งนี้ทั้งนั้นหมายความว่าผลจาก NATs ต้อง reproducible พร้อมทั้งมีความไวและความจำเพาะสูงด้วย) ในเรื่องการใช้ NATs เพื่อตรวจหา

เชื้อวัณโรคดื้อยาในปัจจุบันยังไม่สามารถใช้ในห้องปฏิบัติการ mycobacteria ทั่วไปได้ トラバโดที่ยังไม่สามารถหายีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาของเชื้อวัณโรคโดยเฉพาะต่อ first line drugs ทั้งหมดได้ ประโยชน์อีกข้อของ NATs ที่เห็นชัดก็คือ การนำมาจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคโดยวิธีทำ DNA fingerprinting

RESEARCH QUESTIONS

1. ประเทศไทยขาดบุคลากรที่มีความสนใจ และความรู้ที่จะทำงานด้านการตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการใช้หรือไม่?
2. Level III laboratory ในประเทศไทย มีอยู่จำนวนเท่าใด? ต้องการเท่าใด?
3. บทบาทของมหาวิทยาลัยและกระทรวงสาธารณสุขในด้านการวินิจฉัย ตรวจสอบคุณภาพ และประเมินคุณภาพ จะทำงานร่วม หรือเสริมกันได้อย่างไร? จึงจะก่อประโยชน์แก่ชาติสูงสุด
4. การส่งสิ่งส่งตรวจ 3 ครั้ง แยกทำ กับรวมทำ อย่างไหนจะดีกว่ากัน? ในแง่การวินิจฉัยและค่าใช้จ่าย

5. วิธีจำแนกสปีชีส์ *M. tuberculosis* วิธีใดจะทำงานง่าย สะดวก ประหยัด รวดเร็ว และให้ผลถูกต้องอย่างน้อย 97% (NAP, Niacin, PCR, PCR/REA และ ICG)
6. การเพาะแยกเชื้อก่อโรค โดยทั่วไปให้ใช้อาหารแข็งและ อาหารเหลว ข้อแนะนำเช่นนี้เหมาะกับประเทศที่มีกำลังทรัพย์น้อยหรือไม่
7. วิธีใดจึงจะเหมาะสมสำหรับจำแนกสปีชีส์มัคโคแบคทีเรียกลุ่ม Non-tuberculous mycobacteria สำหรับประเทศไทย? (การทดสอบทางชีวเคมี, PCR, PCR/REA, PCR/ELISA, PCR/reverse blot hybridization)
8. PNA จะใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจโดยตรงได้หรือไม่ และจะมีความไวสูงกว่าวิธีย้อมสีทึบกรดเพียงใด?
9. WHO เสนอให้ส่งเสริมการตรวจหาเชื้อมัคโคแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในประเทศด้อยและกำลังพัฒนามากกว่าที่จะทำเทคนิคอื่น แพทย์ผู้รักษาเห็นด้วยหรือไม่ อย่างไร?
10. การวินิจฉัย extrapulmonary TB ส่วนใหญ่มีปัญหาเพราะสิ่งส่งตรวจไม่มีคุณภาพ เช่นปริมาณน้อยเกินไป เก็บมาไม่ตรงกับตำแหน่งรอยโรค กรณีที่มีเชืื่อน้อยๆ วิธีเพาะเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติและ DNA technology น่าจะช่วยเรื่องการวินิจฉัยให้ดีขึ้นได้อีกอย่างน้อยเท่าตัวเทียบกับก่อนการใช้ ได้หรือไม่?
11. ปัญหาการเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อมัคโคแบคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจ ยังต้องการการพัฒนา ควรทำเองหรือใช้ commercial kit?
12. Facility ในเรื่อง HPLC GLC DNA-sequencing และ DNA-Chip ควรจะมีในประเทศเพื่อใช้งานในเรื่อง species identification หรือไม่? ความคุ้มค่าอยู่ที่ใด?
13. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ควรทำกับเชื้อทุกสายพันธุ์หรือไม่? เมื่อใดจึงควรทำ? และวิธี Proportion method ที่เสนอแนะโดย WHO มี feasibility และให้ผลที่ reliable เพียงใด? มีวิธีอื่นใดที่ควรศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการงาน routine อีกหรือไม่ เช่น วิธีใช้ MTT
14. Rapid diagnosis ของการวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรค หรือ ติดเชื้อกลุ่ม MAC ทราบผลเบื้องต้นใน 2 สัปดาห์ และจะยอมรับได้หรือไม่? มีประโยชน์ต่อการรักษามากกว่า ถูกต้องมากกว่า และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการรายงานผลภายใน 1 สัปดาห์ ใช่หรือไม่?

เอกสารอ้างอิง

1. Sudre P, Dam GT, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. WHO Bulletin 1992; 70: 149-159.
2. สมบุญ ผ่องอักษร. 2535. ประวัติงานวัณโรคในประเทศไทย. ใน วัณโรค พิมพ์ครั้งที่ 3. บรรณาธิการ: บัญญัติ ปรัชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 18.
3. Tuberculosis Programme Review Thailand. Thailand Ministry of Public Health and WHO. 1995, Bangkok, Thailand.

4. Rigsby MO, Friedland G. 1997. Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus Infection. In AIDS: Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention, 4th ed. Edited by Vincent T, DeVita Jr., Hellman S, Rosenberg SA. Lippincott-Raven Publishers, pp. 245-257.
5. Vestal AL. 1978. Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service, CDC, Atlanta, Georgia 30333, p. 15.
6. Grange JM. 1996. Mycobacteria and human disease. Arnold, A member of the Hodder Headline Group, London, pp. 1-10, 61-77.
7. ชัยเวช นุชประยูร. 2535. เชื้อวัณโรคและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ. ใน วัณโรค พิมพ์ครั้งที่ 3. บรรณาธิการ: บัญญัติ ปรีชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 127-173.
8. Collins CH, Grange JM, Yates MD. 1997. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice. 2nd ed. Butterworth Heinemann, Oxford, pp 41-116.
9. Salfinger M, Hale YM, Driscoll JR. Diagnostic tools in tuberculosis. Respiration 1998; 65: 163-170.
10. Yeager H Jr, Lacy J, Smith LR, Le Maistre CA. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. Am Rev Respir Dis 1967; 95: 998-1004.
11. Kim TC, Blackman RS, Heatwole KM, et al. Acid fast bacilli in sputum smears of patients with tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1984; 129: 264-268.
12. Kent PT, Kubica GP. 1985. Public Health Mycobacteriology: a Guide For The Level III Laboratory. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia 30333, pp 57-70, 159-184.
13. Toman K. 1979. Tuberculosis Case-Finding And Chemotherapy: Questions and Answers. World Health Organization, Switzerland, pp. 6-8, 14-22, 173-174.
14. Thisted M, Just T, Pluzek K-J, Petersen KH, Hyldig-Nielsen JJ, Godtfredsen SE. Detection of immunoglobulin kappa light chain mRNA in paraffin sections by in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. Cell Vision 1996; 3: 358-363.
15. Nauman L. Culture detection of mycobacteria. Biotest Bulletin 1995; 5: 177-180.
16. Kanai K. 1990. Introduction to Tuberculosis and Mycobacteria. Southeast Asian Medical Information Center, International Medical Foundation of Japan, Japan, pp. 28-29, 111, 125.
17. Rosch-Gerdes S, Schroder KH, Finnern J. Untersuchungen mit dem System Bactec 460 2. Isolierung von *Mycobacterium tuberculosis* aus Sputum Vergleich der radiometrischen mit der konventionellen Methode. Prax Klin Pneumol 1987; 41: 219-222.
18. Naumann L. Vergleichende Untersuchungen von flossigen und festen Nohrboden in der Tuberkulose-Diagnostik. Klin Lab 1992; 38: 325-329.
19. American Thoracic Society, Centers for Disease Control. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 725-735.
20. Naumann L, Lehn N, Wolf H, Reischl U. Neue schnelle kulturelle Nachweismethoden im Mykobakterienlabor. Mikrobiologie 1997; 7: 123-125.

21. van Griethuysen AJ, Jansz AR, Buiting AGM. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB system, Septi-Chek AFB system, and Lowenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2391-2394.
22. Zanetti S, Ardito F, Sechi L, Sanguinetti M, Mollicotti P, Delogu G, Pinna MP, Nacci A, Fadda G. Evaluation of a nonradiometric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2072-2075.
23. Pfyffer GB, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, Rosch-Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 364-368.
24. Cornfield DB, Beavis KG, Greene JA, Bojak M, Bondi J. Mycobacterial growth and bacterial contamination in the Mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture systems. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2068-2071.
25. Rohner P, Ninet B, Metral C, Emler S, Auckenthaler R. Evaluation of the MB/BacT system comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3127-3131.
26. Benjamin WH Jr, Waites KB, Beverly A, Gibbs L, Waller M, Nix S, Moser SA, Willert M. Comparison of the MB/BacT system with a revised antibiotic supplement kit to the BACTEC 460 system for detection of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3234-3238.
27. Desjardin LE, Perkins MD, Teixeira L, Cave MD, Eisenach KD. Alkaline decontamination of sputum specimens adversely affects stability of mycobacterial mRNA. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2435-2439.
28. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Lockwood DE, Romagnoli M, Turner J, Merz WG, Schwalbe RS, Moody M, Lue Y, Passen S. Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C18-Carboxypropylbetaine: Blinded study. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1996-2003.
29. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Wolfe DM, Llorin OL, Passen S. Processing respiratory specimens with C18-Carboxypropylbetaine: Development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2004-2013.
30. Thornton CG, MacLellan KM, Brink TL Jr, Passen S. In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween80, and C18-Carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3558-3566.
31. Nelson SM, Deike MA, Cartwright CP. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 467-469.
32. Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of *Mycobacterium tuberculosis* in selective media. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 1067-1069.
33. Isenberg HD, D' Amato RF, Heifets L, et al. Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1719-1722.

34. Perry JL. New culture and identification procedures in mycobacteriology part 1. Clin Lab Sci 1993; 6: 163-164.
35. Warns M, Hagemann P, Beaty PS. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 automated system for the growth and detection of mycobacteria from processed sputum specimens. Clin Microbiol Infect 1997; 3(S2): 164.
36. Rosch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1999; 37: 45-48.
37. Ichiyama S, Shimokata K, Takeuchi J, et al. Comparative study of a biphasic culture system (Roche MB Check system) with a conventional egg medium for recovery of mycobacteria. Tubercle Lung Dis 1993; 74: 338-41.
38. Horn J. Redox systems as bacterial growth indicators. Biotest Bulletin 1995; 5: 181-186.
39. Suwangool S, Kolladarungkri T, Leelarasamee A, Chuenarom V, Jearanaisilavong J, Chaiprasert A. Prolonged fever due to *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease in advanced HIV infection: A public health concern. J Med Assoc Thai 1998; 81: 893-904.
40. Siddiqi SH, Hwangbo CC, Silcox V, Good RC, Snider DE Jr, Middlebrook G. Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis*/*Mycobacterium bovis* from other mycobacterial species. Am Rev Respir Dis 1984; 130: 634-640.
41. Musial C, Tice L, Stockman L, Roberts G. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 1988; 26: 2120-2123.
42. Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex in culture. J Clin Microbiol 1991; 29: 2473-2476.
43. Perry JL. New culture and identification procedures in mycobacteriology, part 2. Clin Lab Sci 1993; 6: 216-217.
44. Butler WR, Kilburn JO. Identification of major slow growing pathogenic mycobacteria and *Mycobacterium gordonae* by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol 1988; 26: 50-53.
45. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol 1991; 29: 2468-2472.
46. Marks J, Szulga T. Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification; technical procedures; *Mycobacterium fortuitum*. Tubercle 1965; 46: 400-411.
47. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA et al. Differentiation of slowly growing mycobacterium species, including *Mycobacterium tuberculosis* by gene amplification and restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol 1992; 30:1815-1822.
48. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 1993; 31: 175-178.

49. Vaneechoutte M, De Beenhouwer H, Claeys G, et al. Identification of *Mycobacterium* species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2061-2065.
50. Lappayawichit P, Rienthong S, Rienthong D, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Panbangred W, Saringcarinkul H, Palittapongampim P. Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences. *Tuberc Lung Dis* 1996; 77: 257-263.
51. Sansila A, Hongmanee P, Chuchottaworn C, Rienthong S, Rienthong D, Palittapongampim P. Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* by amplification of the 16S-23S ribosomal DNA spacer. *J Clin Microbiol* 1998; 36:
52. Patel S, Yates M, Saunders NA. PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2375-2380.
53. Rogall T, Flohr T, Bottger EC. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 1915-1920.
54. Hoheisel JD. Oligomer-chip technology. *Tibtech* 1997; 15: 465-469.
55. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, Mabilat C. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 49-55.
56. de Kantor IN, Laszlo A. 1998. Tuberculosis laboratory procedures for developing countries. In *Mycobacteria I Basic Aspects*. Edited by Gangadharam PRJ, Jenkins PA. Chapman&Hall, ITP International Thomson Publishing, New York, pp. 351-390.
57. Nilsson LE, Hoffner SE, □ns□hn S. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by bioluminescence assay of mycobacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 1208-1212.
58. Arain TM, Resconi AE, Hickey MJ, Stover CK. Bioluminescence screening in vitro (Bio-Siv) assays for high-volume antimycobacterial drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1536-1541.
59. Collins LA, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1004-1009.
60. Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter microplate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 344-347.
61. Mshana RN, Tadesse G, Abate G, Miørner H. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1214-1219.
62. Horn J, Backes M. MB-redox susceptibility a liquid medium for susceptibility testing of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: S390.
63. Norden MA, Kurzynski TA, Bownds SE, Callister SM, Schell RF. Rapid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1231-1237.

64. Bownds SE, Kurzynski TA, Norden MA, Dufek JL, Shell RF. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1386-1390.
65. Kawa DE, Pennell DR, Kubista LN, Shell RF. Development of a rapid method for determining the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid using the Gen-Probe DNA hybridization system. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1000-1005.
66. Martin-Casabona N, Mimo DX, Gonzalez T, Rossello J, Arcalis L. Rapid method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2521-2525.
67. Goyal M, Shaw RJ, Banerjee DK, Coker RJ, Robertson BD, Young DB. Rapid detection of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 1997; 10: 1120-1124.
68. Suzuki Y, Katukawa C, Tamaru A, Abe C, Makino M, Mizuguchi Y, Taniguchi H. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1220-1225.
69. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1969-1973.
70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 287-291.
71. Cole ST, Brosch R, Parkhill J et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-544.
72. Prammananan T. Characterization of a group-specific DNA fragment for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by in vitro DNA amplification. M.Sc. thesis in Microbiology. Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1993.
73. อังคณา ฉายประเสริฐ. การใช้ PCR Technology ใน งานควบคุมโรคติดต่อ. *วัณโรค*. หน้า 63-82. เอกสารประกอบการสัมมนา จัดโดย กองโรคเรื้อน กรมควบคุมโรคติดต่อ วันที่ 26 เมษายน 2537 ณ ห้องประชุมกษ โรงแรมรอยัลริเวอร์.
74. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frobault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet* 1989; 334: 1069-1071.
75. Pao CC, Benedict Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1877-1880.
76. Pierre C, Lecossier D, Boussougant Y, Bocart D, Joly V, Yeni P, Hance AJ. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *J Clin Microbiol* 1991; 29:712-717.
77. Seelig R, Renz M, Böttner C, Stockinger K, Czichos J, Schulz V, Seelig HP. Tuberkulose-Schnelldiagnostik mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). *Immun Infekt* 1991; 19:179-185.
78. Brisson-NÓel A, Aznar C, Chureau C, Nguyen S, Pierre C, Bartoli M, Bonete R, Pialoux G, Gicquel B, Garrigue G. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; 338:364-366.

79. Thierry D, Brisson-NÓel A, Levy-FrÉbault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2668-2673.
80. De Lasseance A, Lecossier D, Pierre C, Cadranet J, Stern M, Hance AJ. Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid from patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction : comparison of two protocols. *Thorax* 1992; 47:265-269.
81. Walker DA, Taylor IK, Mitchell DM, Shaw RJ. Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65kDa antigen gene, in the diagnosis of tuberculosis. *Thorax* 1992; 47:690-694.
82. Saboor SA, Johnson NM, McFadden J. Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction. *Lancet* 1992; 339:1012-1015.
83. Eisenach KD, Siffford MD, Cave D, Bates JH, Crawford JT. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:1160-1163.
84. Buck GE, O'Hara LC, Summersgill JT. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1331-1334.
85. Shawar RM, El-Zaatari FAK, Natara A, Clarridge JE. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. *J Clin Microbiol* 1993; 31:61-65.
86. Folgueira L, Delgado R, Palenque E and Noriega AR. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1019-1021.
87. Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, Hartskeerl RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2567-2575.
88. Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari Shrinivas M, Ahuja GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 337:5-7.
89. Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, Tsuji S. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). *Neurology* 1990; 40:1617-1618.
90. Soini H, Skurnik M, Liippo K, Tala E, Viljanen MK. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of a gene coding for the 32-Kilodalton protein. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2025-2028.
91. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:255-258.
92. Portillo PD, Murillo LA, Patarroyo ME. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2163-2168.
93. De Wit D, Steyn L, Shoemaker S, Sogin M. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2437-2441.

94. Sritharan V, Barker Jr. RH. A Simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol Cell Probe* 1991; 5:385-395.
95. Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuille ET, Black WA, Smith JA. Characterization of a DNA probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2173-2176.
96. Thierry D, Chureau C, Aznar C, Guesdon JL. The detection of *Mycobacterium tuberculosis* in uncultured clinical specimens using the polymerase chain reaction and a non-radioactive DNA probe. *Mol Cell Probe* 1992; 6:181-191.
97. Charoenratanakul S, Chaiprasert A, Yenchitsomanas P, Pattanakitsakul S, Jearanaisilavong J, Dejsomritrutai W. Clinical utility of the polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage in the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis. *Thai J Tuberc Chest Dis* 1996;17:1-9.
98. Chaiprasert A, Prammananan T, Samerpitak K, Pattanakitsakul S, Yenchitsomanas P, Jearanaisilavong J, Charoenratanakul S. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by reamplification with 16S rRNA based primers. *As Pac J Mol Biol Biotechnol* 1996;4:250-9.
99. Abe C, Hirano K, Wada M, Kazumi Y, Takahashi M, Fukasawa Y, Yoshimura T, Miyagi C, Goto S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3270-3274.
100. Jonas V, Alden M, Curry JJ, Kamisango K, Knott CA, Lankford R, Wolfe JM, Moore DF. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2410-2416.
101. Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A. Clinical efficacy of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1606-1610.
102. Piersimoni C, Zitti P, Cimorelli ME, Nista D, De Sio G. Clinical utility of the Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test compared with smear and culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 442-446.
103. Jorgensen JH, Salinas JR, Paxon R, Magnon K, Patterson JE, Patterson TF. False positive Gen-Probe direct *Mycobacterium tuberculosis* amplification test results for patients with pulmonary *M. kansasii* and *M. avium* infection. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 175-178.
104. Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F, Iinuma Y, Yamori S, Shimojima M, Hasegawa Y, Shimokata K, Nakashima N. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3082-3085.
105. Bennedsen J, Thomson VO, Pfyffer GE, et al. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1407-1411.
106. Reischl U, Lehn N, Wolf H, Naumann L. Clinical evaluation of the automated COBAS AMPLICOR MTB assay for testing respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2853-2860.
107. Sheehan S, Schroder G, Garland J. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens using the new Abbott LCx MTB assay. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3(S2):159.

108. Linbrathen A, Gaustad P, Hovig B, Tønnum T. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples from patients in Norway by Ligase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3248-3253.
109. Ausina V, Gamboa F, Gazapo E, et al. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1996-2002.
110. Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2424-2426.
111. Rohner P, Jahn EIM, Ninet B, Ionati C, Weber R, Auckenthaler R, Pfyffer GE. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis with the LCx pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with conventional diagnostic techniques. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3046-3047.
112. Gamboa F, Dominguez J, Padilla E, et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1324-1329.
113. Garrino MG, Glupczynski Y, Degraux J, Nizet H, Delmoe M. Evaluation of the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in human samples. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 229-232.
114. Bergmann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the BDProbe Tec strand displacement amplification assay for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2766-2768.
115. Pfyffer GE, Funke-Kissling P, Rundler E, Weber R. Performance characteristics of the BDProbe Tec System for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 137-140.
116. Smith JH, Buxton D, Cahill P, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum by using a prototype automated Q β replicase assay. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1477-83.
117. Smith JH, Radcliffe G, Rigby S, Mahan D, Lane J, Klinger JD. Performance of an automated Q-Beta replicase amplification assay for *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical trial. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1484-1491.
118. Godfrey-Faussett P. Molecular diagnosis of tuberculosis: the need for new diagnostic tools. *Thorax* 1995; 50: 709-711.
119. Vaneechoutte M, van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J Med Microbiol* 1997; 46: 188-194.
120. Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. *Eur Respir J* 1997; 10: 1877-1891.

TUBERCULOSIS : COMPLIANCE AND DOTS

พญ. จรรยา แชนเจน, นพ. ยุทธิชัย เกษตรเจริญ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่เป็นเรื้อรังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ทั้งในระดับครอบครัว สังคมและประเทศชาติ วัณโรคพบได้ทั่วไปไม่ว่าในประเทศด้อยพัฒนา กำลังพัฒนาหรือประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเคยมีอุบัติการณ์ของวัณโรคลดลงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1953 มีผู้ป่วยจำนวน 48,000 ราย เหลือ 22,255 ราย ในปี ค.ศ. 1984 และเพิ่มอีก 18% ระหว่างปี 1985-1991 คิดเป็นจำนวนผู้ป่วยที่เพิ่มขึ้นจากที่คาดการณ์ไว้ถึง 39,000 ราย อุบัติการณ์ของวัณโรคที่เพิ่มขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการระบาดของเชื้อ HIV หรือ AIDS สถาบัน CDC แห่งสหรัฐอเมริกาคาดว่าจะมีจำนวนผู้ป่วยใหม่วัณโรคระยะแพร่เชื้อทั่วโลกเพิ่มจาก 7,537,000-11,875,000 คน ต่อปี การเกิดโรคเพิ่มจาก 143 เป็น 176 ต่อแสนคนประชากรตายจากโรคเพิ่มจาก 2.5 เป็น 3.5 ล้าน/ปี⁽¹⁾ ระหว่างปี 1990-2005 องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประมาณว่าในปี พ.ศ. 2543 ทั่วโลกจะมีผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นเป็น 1,400,000 คน⁽²⁾ ดังนั้น WHO จึงได้ประกาศให้วัณโรคเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ทุกประเทศจะต้องเร่งแก้ไข เพิ่มการควบคุมและกำจัดเชื้อวัณโรคให้หมด(3)

วัณโรคระยะแพร่เชื้อถ้าไม่รักษาจะตายใน 1 ปี ได้ถึง ร้อยละ 30 และ 5 ปี ร้อยละ 50 ของจำนวนผู้ป่วย⁽¹⁾ การดูแลรักษาที่ถูกต้องสามารถทำให้ผู้ป่วยหายขาดจากโรคนี้ได้ การดูแลรักษาที่ไม่ถูกต้องและไม่เพียงพอ นอกจากผู้ป่วยไม่หายและยังสามารถแพร่เชื้อไปยังบุคคลอื่น ที่อยู่ข้างเคียง เช่น เพื่อนฝูงญาติ พี่น้อง ลูกหลาน บุคลากร และอาจเกิดภาวะดื้อยาของเชื้อวัณโรคตามมาอีกด้วย

สูตรยามาตรฐานระยะสั้นที่ใช้ในประเทศไทย สำหรับผู้ป่วยวัณโรคเสมหะบวก คือ สูตร 2HRZE(S) และ 4HR รวมเวลาที่ใช้รักษา 6 เดือน ซึ่งให้ผลการรักษาเกือบ 100% แต่ผลการรักษาในปัจจุบัน ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ นอกจากปัจจัยด้านแพทย์เกี่ยวกับ Mismanagement การบริหารจัดการด้านการรักษาที่ขาดประสิทธิภาพ แล้ว ซึ่งนำไปสู่ปัญหา Poor compliance หรือ non Adherence เป็นผลให้เชื้อวัณโรคไม่ตายและเชือดื้อยา

สาเหตุของ Poor compliance หรือ non Adherence

Poor compliance หมายถึง การรับยาที่ใช้รักษาวัณโรคไม่ต่อเนื่อง

ในปี 1990 CDC รายงานว่า ร้อยละ 25 ของผู้ป่วยวัณโรคระยะแพร่เชื้อไม่สามารถรับยาแบบ short course ครบในเวลา 12 เดือน, ร้อยละ 33 ของผู้ป่วยไม่สามารถกินยาป้องกันวัณโรคได้ครบตามกำหนดเวลา

มีหลายรายงานที่ศึกษาถึง compliance ของผู้ป่วย ซึ่งพอจะแบ่งแยกหัวข้อได้ดังนี้เกี่ยวกับความเจ็บป่วย, ความเชื่อถือเกี่ยวกับโรคที่ไม่ถูกต้อง⁽⁷⁾ เช่น

- ในไสตี 85% ของผู้ป่วย, ยังเชื่อว่าวัณโรคอาจเกิดจากพอมดหมอผี
- แม่บ้านในเมืองเคปทาวน์ ซึ่งเคยได้รับความรู้เกี่ยวกับวัณโรคยังคิดว่าสาเหตุหลักของวัณโรคคืออากาศเย็น การสูบบุหรี่ และการขาดสารอาหาร
- ในแอฟริกาใต้ซึ่งพบวัณโรคบ่อยยังไม่เชื่อว่าคนในครอบครัวอาจเป็นโรคนี้ได้

- คนผิวดำ ซึ่งได้รับการรักษาในโรงพยาบาล มีโอกาสถูกครอบครัวยุติและไม่อนุญาตให้กลับบ้าน

เกี่ยวกับผู้ป่วยที่ทำให้ไม่สามารถมารับยาต่อเนื่อง ได้แก่

- โรคประจำตัวบางอย่าง เช่น ปัญญาอ่อน โรคจิต⁽⁶⁾
- ระดับการศึกษา การมีความรู้เกี่ยวกับโรคน้อย⁽⁷⁾
- การมาโรงพยาบาล การคมนาคมขนส่งไม่สะดวก⁽⁷⁾
- เศรษฐกิจ ฐานะยากจน⁽⁶⁾
- ติดยาเสพติด, Alcoholism, เรื้อรังไร้ที่อยู่⁽⁴⁾
- ไม่มี Social/Family Support พบว่าผู้ป่วยที่มีญาติจะมี Compliance ดีกว่าพวกที่ญาติอยู่ไกล

ไกล

- เพศ มีรายงานว่าในกลุ่มอายุ < 30 ปี เพศชายปฏิเสธยามากกว่าเพศหญิง
- ภาษาที่ใช้ พบว่าการให้สุขศึกษาเป็นภาษาเดียวกับภาษาดั้งเดิมที่ผู้ป่วยใช้สามารถทำให้ผู้ป่วยมีความเข้าใจได้ดีขึ้น adherence ดีขึ้น^(6,18)
- อื่น ๆ ความเปลืองเรอ ซ้ำลิ้ม ความจำเสื่อม พบได้บ่อยในคนอายุมาก

เกี่ยวกับยา

- สูตรระยะสั้น compliance ดีกว่าสูตรระยะยาว
- ชนิดและจำนวนเม็ดยาต่อวัน, ความบ่อยในการบริหารยา ถ้ามากเกินไปทำให้ Compliance ของผู้ป่วยลดลงและปฏิเสธยา เช่นเดียวกับผลข้างเคียงของยาที่มากเกินไป

เกี่ยวกับผู้รักษา

- ทัศนคติ ความสัมพันธ์ที่ดีกับผู้ป่วย การให้คำแนะนำ การสื่อสารที่มีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่ม Compliance ของผู้ป่วยได้⁽⁶⁾
- ในบางประเทศให้อำนาจแก่ผู้รักษาในการสั่งกับบริเวณผู้ป่วยวัณโรคระยะแพร่เชื้อหรือไม่ให้เป็นอันตรายแก่ผู้อื่น จนกว่าจะพ้นระยะแพร่เชื้อ

เกี่ยวกับวิธีการให้ยา

- พบว่าผู้ป่วยที่นอนโรงพยาบาล มี non compliance 19% (บางรายงาน 17%)
- ผู้ป่วยที่มาโรงพยาบาลทุกวันมี Non compliance 37% (เพิ่มมากในช่วงวันหยุดยาว เช่น คริสต์มาส 4 สัปดาห์) มีผู้ป่วยหยุดยาถึง 63%
- บางส่วนเกิดจากการไม่ได้สอนให้ผู้ป่วยกินยาที่บ้าน ก่อนออกจากโรงพยาบาล

การลดปัญหา POOR COMPLIANCE

มีบทความจำนวนมากรายงานถึงวิธีการต่าง ๆ ในการทำให้ compliance ของผู้ป่วยดีขึ้น สามารถแบ่งได้ 7 หัวข้อดังนี้

1. ปรับปรุงวิธีการรักษา เช่น การใช้ยานัดแทน/ร่วมกับยากิน, การใช้ PRE-PACKAGE (การจัดยาเพื่อให้สะดวกต่อการหยิบมารับประทาน เช่น ซองละ 1 มื้อ หรือ 1 วัน เป็นต้น)
- การใช้สูตรยาระยะสั้นแทนระยะยาว

- การให้ยาแบบเว้นระยะ (intermittent) 2-3 ครั้ง/สัปดาห์
- การให้ทำเครื่องหมายบนปฏิทินทุกครั้งที่ยินยา
- 2. การให้ความรู้ทางสุขศึกษาเกี่ยวกับวัณโรค
- 3. การให้สิ่งจูงใจต่างๆ เช่นเงิน อาหาร ค่ารถ การให้เกียรติทางสังคม โดยการเข้าร่วมกิจกรรมกับผู้ป่วยที่มีปัญหา
- 4. การมีเจ้าหน้าที่ออกไปทำงานในพื้นที่ (community health worker) หรือ Outreach worker
- 5. การจัดบริการทางคลินิก ให้มีความสะดวก รวดเร็ว เหมาะสม ยืดหยุ่นได้พอสมควร มีการนัดหมายล่วงหน้า การลงทะเบียนและเก็บประวัติผู้ป่วยอย่างดีไม่สูญหาย ทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องรอนาน
- 6. การใช้ Supervised therapy หรือ DOT หรือการให้กินยาต่อหน้าผู้อื่น (เจ้าหน้าที่)
- 7. การออกกฎหมายที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาของ DOT

DOT ย่อมาจาก DIRECTLY OBSERVED THERAPY

หมายถึง การสังเกตการกินยาในอดีตใช้คำว่า Supervised therapy

DOTS ย่อมาจาก DOT + Short course หมายถึงการรักษาวัณโรค

โดยใช้สูตรระยะสั้นภายใต้การสังเกตการกินยา หรือกินต่อหน้าผู้อื่นทุกครั้ง DOTS ในความหมายของ WHO ยังรวมถึงการมี Drug Supply ที่เพียงพอมี Passive Case detection และมีระบบบันทึกข้อมูล รายงานและกำกับดูแลที่มีประสิทธิภาพด้วย

อินเดีย และฮ่องกง^(11,12) เป็นตัวอย่างของประเทศที่ใช้ Supervised therapy สรุปได้ว่า

1. Supervised Ambulatory care ให้ผลใกล้เคียงกับการดูแลในสถานพยาบาล
2. Intermittent ให้ผลเท่ากับ Daily Regimen

ต่อมาได้มีการนำ DOT มาใช้ในสหรัฐอเมริกา โดยช่วงแรกใช้ในกลุ่ม Treatment failure โดย McDonald RT และคณะ⁽¹⁵⁾ ในรัฐนิวเจอร์ซีย์รักษาผู้ป่วย Treatment failure จำนวน 21 ราย ในจำนวนนี้ 14 ราย ตื้อยา อย่างน้อย 1 ตัว ผลการรักษาประสบความสำเร็จ 19 ราย ส่วนอีก 2 ราย ยังมี Sputum AFB positive ต่อมาก็เริ่มมีการใช้มากขึ้นเรื่อย ๆ

จน ACET (Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis) ซึ่งเป็นศูนย์ให้คำแนะนำในการกำจัดวัณโรค ได้ Recommend ให้ใช้ DOT สำหรับเขตที่มี Complete Treatment rate <90% ผลการใช้ DOT ในสหรัฐอเมริกามีหลาย Series ดังนี้

STEPHEN E. W. และคณะ⁽¹⁷⁾ ศึกษาการใช้ DOT ในปี 1986-1992 ในการรักษาวัณโรค 581 episodes ในเมือง Tarrant รัฐ Texas, USA.

พบว่าเชื้อวัณโรคตื้อยาปฐมภูมิลดจาก 13% เป็น 6.7%

พบว่าเชื้อวัณโรคตื้อยาทุติยภูมิลดจาก 14% เป็น 2.1%

พบว่าเชื้อวัณโรคตื้อยา relapse ลดจาก 20.9% เป็น 5.1%

พบว่าเชื้อวัณโรคตื้อยา relapse ด้วย MDR TB ลดจาก 25% เป็น 5%

COHN DJ และคณะ⁽¹⁸⁾ ศึกษาการให้ยา 62 dose ในเวลา 6 เดือนรักษา วัณโรคปอดและนอกปอดระหว่างปี 1981-1989 ที่เมือง DENVER, USA โดยใช้ Ambulatory supervised therapy 125 ราย ส่วนใหญ่เป็นวัณโรคปอด พบว่ามี relapse 2 ราย (หลังรักษาครบ 6 และ 56 เดือน)

El-Sadr W. และคณะ⁽²⁵⁾ ใช้ DOTS (on site surrogate model) รักษาผู้ป่วย 145 ราย ที่โรงพยาบาลซาเล็ม รัฐ New York, USA ในปี 1993 พบว่า completion rate สูงมาก, Visit Adherence 91.1%, loss Follow up เพียง 10%

Williamson DE. และคณะ⁽¹⁹⁾ ศึกษาเปรียบเทียบการรักษาวัณโรคด้วย DOT กับ Conventional ด้วยยา INH+Rifampin ในปี 1984 พบว่า

Sputum conversion rate กลุ่ม DOT = 88.66% (26ใน/30 ราย)

กลุ่ม Conventional = 61% (17ใน/28 ราย)

Schluger และคณะ DOT+ Comprehensive program ในโรงพยาบาล Bellevue ระหว่างปี 1992-1993 จำนวนผู้ป่วย 113 ราย, 11 ราย loss Follow up ที่เหลือ 102 ราย 99% ไม่พบเชื้อ (74 ราย ทำ DOT ที่โรงพยาบาล, 16 ราย ทำ DOT ที่บ้าน, ในเมือง, 3 ราย ตายจาก HIV, 9 ราย กินยาเอง)

Fujiwara และคณะ⁽²²⁾ ศึกษาข้อมูลระหว่างปี 1991-1994 (หลังเริ่มนำ DOT มาใช้ใน New York พบว่า ได้ผลดังตาราง

กลุ่ม	STATUS	ปี 1991	ปี 1994	
	จำนวนผู้ป่วย (ราย)	466	322	
New case	เชื้อดื้อยา > 1 ตัว	33%	24%	P< 0.01
	ดื้อ INH เป็นอย่างน้อย	26%	18%	P< 0.05
	ดื้อ INH+Rifampin	19%	13%	P< 0.05
Relapse	ดื้อยา > 1 ชนิด	22%	13%	P< 0.05
	เพาะเชื้อขึ้น > 4 เดือน (ราย)	133	44	

ในเมืองบัลติมอร์⁽²³⁾ ซึ่งเป็นเมืองใหญ่แห่งหนึ่งในสหรัฐอเมริกา ได้นำ DOT มาใช้อย่างจริงจังกับผู้ป่วยทุกราย ตั้งแต่ ค.ศ. 1981-1992 รวม 11 ปี พบว่าได้ผลดีมากเมื่อเทียบกับในเมืองใหญ่อื่นๆ ซึ่งใช้ DOT ภายหลัง หรือใช้เฉพาะรายที่มีปัญหา ผลการดำเนินงานเป็นดังรูปที่ 1,2

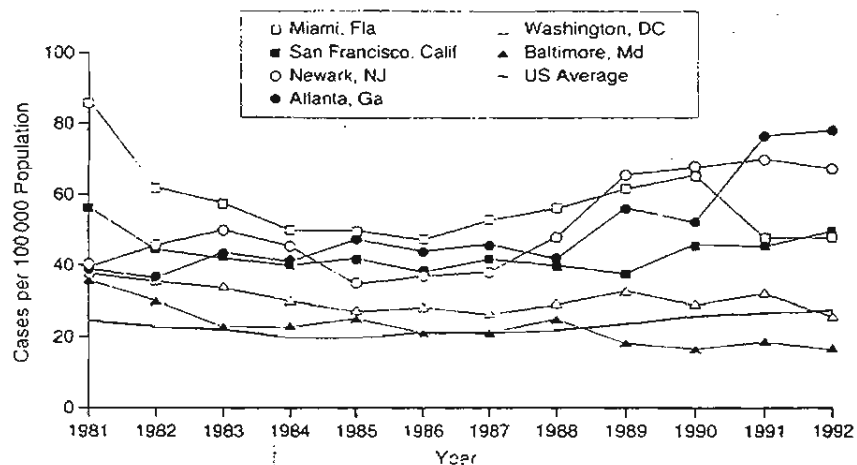


Figure 1.—Eleven-year trends in tuberculous incidence among the six cities (populations over 250 000) with the highest case rates (per 100 000 population) in 1981 and US average.

5

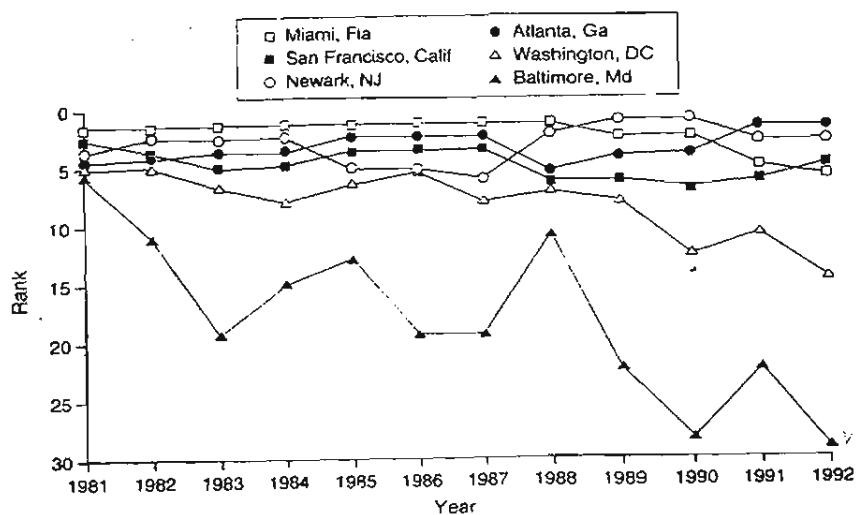


Figure 2.—Eleven-year trends in ranking among the six cities (population over 250 000) with the highest tuberculosis case rate (per 100 000 population) in 1981.

-Miles SH, Maat RB.⁽¹⁶⁾ รายงานผลการใช้ DOTS ในการรักษาวัณโรคในค่ายผู้อพยพชายแดนไทยกัมพูชา ระหว่างปี 1981-1983 จำนวน 58 ราย ที่มีอายุ ระหว่าง 10-64 ปี พบว่ามีผู้ขาด Follow up เพียง 15 ครั้ง/10209 total patient day มี default 45 ราย หลังได้ยา 43, 103, 145, 165 วันตามลำดับ⁽¹⁶⁾

-Wilkinson D. และคณะ⁽²⁰⁾ รักษาวัณโรคในแอฟริกาใต้ระหว่างปี 1991-1994 โดยให้ยาแบบ intermittent 2 ครั้ง/สัปดาห์ พบว่า 87% ของผู้ป่วย ได้รับการรักษาด้วย DOT 1903 ใน 2186 ราย), 55% DOT โดยอาสาสมัครซึ่งประกอบด้วย store keeper, คนที่อยู่บ้านเดียวกัน, นายจ้าง, ครู, ผู้ใหญ่บ้าน etc. อีก 45% DOT by Health care worker (พยาบาล, เจ้าหน้าที่, ชุมชุม) ผลปรากฏว่า Complete rate และ mortality rate ใกล้เคียงกัน⁽²⁰⁾

-ในบังคลาเทศ มีการศึกษาโดย Chowdhury และ มูลนิธิ BRAC ซึ่งเป็นของเอกชน พบว่า เมื่อ ให้ยา + DOT นาน 8-12 เดือน มี cure rate 81-85.9% เทียบกับกลุ่ม control ซึ่งมีแต่บริการของรัฐบาลมี cure rate เพียง 50%

-ในจีน⁽²¹⁾ เดิมผลการรักษาวัณโรคมี cure rate 52-58% มีการสำรวจในปี 1990 พบว่าในกลุ่มผู้ ที่ smear positive 52% เคยรู้มาก่อนว่าเป็นวัณโรค ทางสาธารณสุขจึงได้ร่วมกับ WHO วิเคราะห์ปัญหาและข้อจำกัด, ประสิทธิภาพของการรักษาและหาทางแก้ไขปัญหา โดยให้การรักษแบบไม่คิดมูลค่า (ค่ายา, ค่าตรวจ) การใช้ DOTS การให้ Incentives ในการติดตามผู้ป่วย ที่ loss Follow up, การเก็บเสมหะ การลงทะเบียน, การประเมินผล และรายงาน ระหว่างปี 1991-1994 มีจำนวนผู้ป่วย 112,842 ราย ผลปรากฏดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2

	New case	Relapse
Cure	89.66	81.1
Complete Treatment	2.1	3.1
Dead	2.35	3.9
Failure	3.09	8.1
Defaulted	1.61	2
Transfer	0.33	0.34
อื่นๆ	0.84	0.48

DOTS ในประเทศไทย

นายแพทย์นัดดา ศรียาภย์⁽²⁶⁾ ได้รายงานการให้ Intermittent therapy ในผู้ป่วยวัณโรคปอดแบบไป-กลับ ระหว่างปี 2511-2516 มีการจัดคลินิกให้ความสะดวกแก่ผู้ป่วยไม่ต้องเสียเวลารอแพทย์นาน ไม่เสียเงินค่ารักษา มีการฉีดยา กินยาบันทึกขนาดยาที่ใช้ ตรวจเสมหะ เอกซเรย์ปอด ตาม

ที่กำหนดไว้ พบว่า มี cure rate 65.6%, loss FU 19.1% ติดขัดมาไม่ได้ด้วยสาเหตุต่างๆ 21.9% แพ้ยา 8.7%

นายแพทย์ยุทธชัย เกษตรเจริญ(ติดต่อส่วนตัว) ได้ริเริ่มโครงการ DOTS ในประเทศไทยในปี 1994 ที่จังหวัดยะลา และในปัจจุบันได้ปรับเปลี่ยนมาใช้ Observer โดย HCW หรืออาสาสมัครซึ่งอาจเป็นสมาชิกในครอบครัว, เพื่อนบ้าน, พสส., อสม. ฯลฯ โดยที่ถ้าใช้อาสาสมัครเป็นสมาชิกในครอบครัวเป็นผู้สังเกตการณ์จะต้องมี Supervised visit อย่างน้อย 12 ครั้ง/course โดยเฉพาะในช่วง 2 เดือนแรก ต้องเยี่ยมให้ได้อย่างน้อย 8 ครั้ง แต่ครั้งที่เยี่ยมบ้านจะต้องนับเม็ดยา, เช็ค DOTS card ว่าถูกต้องตรงกันหรือไม่ และลงนามกำกับอีกครั้งหนึ่ง

ผลการศึกษาในขั้นต้นได้ผลเกิน 85% (ติดต่อส่วนตัว)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาจากเขต 7 อุบลราชธานี, เขต 6 ขอนแก่น, เขต 3 ชลบุรี แสดงให้เห็นว่ากลยุทธ์ DOTS สามารถเพิ่ม conversion rate และ Cure rate ให้สูงขึ้นได้ชัดเจน

Research Questions

1. DOTS ในเมืองใหญ่ เช่น กรุงเทพฯ, เชียงใหม่, นครราชสีมา, หาดใหญ่, ขอนแก่น
2. Intermitten regimen กับ DOTS.
3. ระบบเยี่ยมบ้านโดยเจ้าหน้าที่สอ. กรณี DOTS โดย family members
8 ครั้ง/ใน initial phase
4 ครั้ง/ใน continue phase
4. Incentives กับ DOTS.
5. อื่นๆ

References

1. Houston & Fanning. Treatment of Tuberculosis. Drug 1994; 48 (s): 689-708
2. นิรัช หุ่นดี. การเฝ้าระวังการติดเชื้อ HIV ในผู้ป่วยวัณโรครายใหม่และผลกระทบจากการระบาดของเชื้อ HIV ต่อแผนงานควบคุมโรคแห่งชาติ. วารสารโรคติดต่อ. 1997; Vol 23; No 1, 10-19
3. WHO. 1994; TB : A global Emergency
4. Pablos-Mendez et al, Nonadherence in Tuberculosis Treatment: Predicators and Consequence in New York city. AM J Med. 1997; 102:164-170
5. Donald LD. Why Patient Don't Take Pills. Chest. 1979 976:6, 744-6
6. Barry Blackwell. Drug therapy : Patient compliance. NEJM. 1973; 289(5) 249-252
7. Esther Sumartojo. When Tuberculosis Treatment failure. AM. Rev. Resp. Dis.
8. George J, Annase JD. Control of Tuberculosis-The law and Public health. NEJM. 1993; 328, 585-8
9. Mahmoud A, Michael D, Iseman, Pitfalls in the care of Patient with Tuberculosis. JAMA. 1993; 270:65-68
10. Aitken ML. et.al. Predictors of Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Am. Rev. Resp. Dis. 1984 : 130; 813-3
11. Rogasi et.al. Therapy of TB today:to prescribe is not enough, a case report (Abstract) Annali Italiani di Medicina Interna. 1996. 11Z3X; 211-5

12. Bull. Org. Mond Sante' Bull WHO. 1995, 21:51 - 144
13. Bull Org. Mond Sante' Bull WHO. 31 : 247-271
14. Ronald Baber, David Wilkmon. DOT for Tuberculosis : History of in Idea. Lancet. 1995. 345; 1545-1548
15. McDonald RJ. et.al. Successful Supervised Ambulatory Management of Tuberculosis Treatment failure. Ann. Int Med. 1982 : 297-302
16. Steven HM., Robert Maat. A successful Supervised Out Patient Short course Tuberculosis Treatment in an open Refugee camp on the Thai-Cambodian border. Am Rev. Resp Dis. 1984. 130 : 827-30
17. Stephen EW.et.al. Effect of DOT on the Rate of Drug Resistant and Relapse in Tuberculosis. NEJM. 1994 : 330 : 1179-84
18. John DL et.al. A 62 Dose, 6 Month Therapy for Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis. Ann. Int Med. 112 : 407-15
19. Williamson DE et.al. Effect of DOT c INH and Rifampin on 3 Month Sputum conversion in A Mississippi State Health District. Chest. 1979. S : A 205
20. Wilkinson et.al. DOT for Tuberculosis in Rural south A frica 1991-1994. Am J of Public Health. 1996 : 86 : No8, 1094-7
21. China Tuberculosis Control Collaboration : Result of DOTs chemotherapy in 112,842 Chinese Patient with Smear Positive Tuberculosis. Lancet. 1996. 347 : 358-62
22. Fujiwara et.al. A continuing Survey of Drug resistant TB in New York city, Apr. 1994. Arch. Of Int. med. 1997. 157 (5) 535-6
23. An Eleven year of Community based DOT for Tuberculosis. JAMA. 1995. 274:12, 945-51
24. DALE I Morse. DOT for Tuberculosis, BMJ. 1996. 312 : 719-20
25. EL-Sadv W.et.al. DOT for Tuberculosis : The Harlem Hospital experience 1993. Am J Public Health. 1996. 86 : No 8, 1146-9
26. นัสดา ศรียาภัย การรักษาวัณโรคปอดปฐมภูมิแบบบริหารยาวันละครั้ง. สารศิริราช. 2517. 26 ซ 1330-1359

สาเหตุของการรักษาวัณโรคล้มเหลว

นพ.เจริญ ชูโชติถาวร

การรักษาวัณโรคในปัจจุบันได้มีการพัฒนามาสู่ระบบยาระยะสั้น 6 เดือนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและความสะดวกในการรักษา โดยพบว่าระบบยาระยะสั้นที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนั้นจะมีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยหายมากกว่า 98% และมีโอกาสกลับเป็นวัณโรคใหม่น้อยกว่า 3% ในขณะที่ระบบยาดั้งเดิม (conventional regimens) ซึ่งจะต้องใช้ระยะเวลาในการรักษา 12-18 เดือนและมีประสิทธิภาพในการรักษาหายเพียง 85-90% เท่านั้นและโอกาสของการกลับเพิ่มอีก 5-10% ⁽¹⁾ ถึงแม้ว่าระบบยาระยะสั้นจะมีประสิทธิภาพสูงและใช้ระยะเวลารักษาสั้นก็ตามก็พบว่าการรักษาล้มเหลวอาจจะเกิดขึ้นได้ Crofton ได้พยายามรวบรวมสาเหตุที่จะทำให้การรักษาวัณโรคล้มเหลวได้ ⁽²⁾ ซึ่งสาเหตุของการรักษาล้มเหลวอาจจะเกิดจาก

1. การที่เชื้อวัณโรคในร่างกายผู้ป่วยไม่สัมผัสกับยาด้วยสาเหตุดังต่อไปนี้

1.1 ผู้ป่วยไม่รับประทานยารักษาวัณโรคหรือรับประทานยารักษาวัณโรคไม่สม่ำเสมอ หรือผู้ป่วยหยุดการรักษาวัณโรคก่อนเวลาที่เหมาะสม (nonadherence or noncompliance) สาเหตุนี้ก็เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้การรักษาล้มเหลว การศึกษาที่โรงพยาบาลโรคทรวงอกพบว่าผู้ป่วยที่รักษาด้วยระบบยา 18 เดือนใน ปี พ.ศ. 2519 จำนวน 1056 รายมีผู้ป่วยที่ขาดการรักษาถึง 46% หรือ 490 ราย ⁽³⁾ และการศึกษาในปี พ.ศ. 2531-2533 ที่โรงพยาบาลโรคทรวงอกด้วยสูตรยาระยะสั้น 6 เดือน และ 9 เดือนพบว่าผู้ป่วยจำนวน 2205 ราย ขาดการรักษาถึง 21% หรือ จำนวน 461 ราย ⁽⁴⁾ การศึกษาจากกองวัณโรคพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยระบบยาระยะสั้น 6 เดือน ระหว่างเดือนตุลาคม 2533 ถึง กันยายน 2534 จำนวน 1314 รายมีผู้ป่วยขาดการรักษาคิดเป็น 11.3% และในจำนวนผู้ป่วยที่ขาดการรักษา 32.2% ขาดการรักษาหลังจากที่รับประทานยาไปแล้ว 2 เดือน ⁽⁵⁾ การรักษาวัณโรคในโครงการควบคุมวัณโรคแห่งชาติไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากปัญหาของการขาดการรักษาหรือรักษาไม่สม่ำเสมอเป็นสาเหตุหลัก องค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้การรักษาวัณโรคในแต่ละประเทศจะต้องมีอัตราการรักษาหายมากกว่า 85% และมีอัตราการครอบคลุมการรักษาของผู้ป่วยมากกว่า 70% จึงจะถือว่าประสบความสำเร็จ

1.2 ยารักษาวัณโรคที่ใช้ในการรักษาไม่มีคุณภาพที่ดีพอหรือปริมาณของยาในแต่ละเม็ดยามีปริมาณไม่เท่ากัน ในกรณีที่ปริมาณยามีมากกว่าที่กำหนดจะไม่มีปัญหาในการรักษา แต่ถ้าหากปริมาณยามีน้อยกว่าที่กำหนดจะทำให้มีปัญหาในการรักษาเนื่องจากระดับของยาในเลือดไม่สูงพอที่จะใช้รักษา ในปัจจุบันมีคำแนะนำให้ใช้ยาเม็ดชนิดที่รวมยาหลายอย่างในเม็ดเดียวกัน (fixed dose combination) ในการรักษาเพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ป่วยเลือกกินยาเฉพาะบางตัวหรือป้องกันการรักษาด้วยยาเดี่ยว (monotherapy) ⁽⁶⁾ การใช้ยาชนิดที่มีการรวมยาหลายอย่างในเม็ดเดียวกันจำเป็นจะต้องมีการเลือกใช้ยาที่มีศึกษาการเอื้อประโยชน์ในร่างกาย (bioavailability) แล้วและมีระดับยาที่สูงพอที่จะใช้รักษา การศึกษาในประเทศไทยพบว่ายารักษาวัณโรคชนิดที่มีการรวมยาหลายอย่างในเม็ดเดียวกันของสองชื่อการค้าเมื่อศึกษาหาการเอื้อประโยชน์ในร่างกายในผู้ป่วยวัณโรคไทยแล้ว มียาหนึ่งชื่อการค้าที่ไม่

สามารถจะให้ระดับยาสูงที่สุดในเลือด (peak serum level) ในผู้ป่วยบางรายถึงระดับที่ใช้รักษาวินโรคได้⁽⁷⁾ ดังนั้นคุณภาพของยาที่ไม่ดีพออาจจะทำให้เชื่อสัมผัสยาไม่เพียงพอจะรักษาได้

1.3 ยาที่ผู้ป่วยรับประทานเข้าไปไม่สามารถจะถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้ (inadequate absorption) ยารักษาวินโรคส่วนใหญ่ถูกดูดซึมจากบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและยารักษาวินโรคเกือบทุกตัวจะมีการเอื้อประโยชน์ในร่างกายของผู้ป่วยได้ดี (good bioavailability) มียารักษาวินโรคบางตัวซึ่งอาจจะถูกรบกวนการดูดซึมโดยอาหารที่รับประทานเข้าไปพร้อมกันหรือรับประทานยาหลังรับประทานอาหารทันทีทันใด ยาดังกล่าวคือยา rifampin การให้ยาลดกรดชนิดที่เป็นเกลือแคลเซียมและเกลือแมกนีเซียมจะทำให้ยา rifampin มีการดูดซึมลดลงได้และยา PAS จะทำให้ระดับยาในเลือดไม่สูงพอจะใช้รักษาวินโรคได้⁽⁸⁾ ผู้ป่วยที่มีปัญหาในการดูดซึมอาหารจากลำไส้ เช่น ผู้ป่วยที่ผ่าตัดลำไส้ไปบางส่วนโดยเฉพาะลำไส้เล็กส่วนต้นซึ่งจำเป็นสำหรับการดูดซึมยาจะทำให้มีระดับของยาในเลือดไม่สูงพอจะใช้รักษาวินโรคได้ มีรายงานว่าระดับของยารักษาวินโรคในเลือดจะมีระดับที่ต่ำลงในผู้ป่วยวินโรคที่มีการติดเชื้อโรคเอดส์ร่วมด้วยถ้าหากว่าผู้ป่วยมีอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น อาการท้องเสียเรื้อรัง ซึ่งทำให้ยาไม่สามารถถูกดูดซึมได้⁽⁹⁾ มีการศึกษาระดับของยารักษาวินโรคในผู้ป่วยวินโรคไทยที่มีการติดเชื้อโรคเอดส์ร่วมด้วยที่ภาควิชาเภสัชวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์พบว่าผู้ป่วยวินโรคไทยที่มีการติดเชื้อโรคเอดส์ยังมีระดับของยารักษาวินโรคที่อยู่ในเกณฑ์ปกติที่สามารถจะใช้รักษาวินโรคได้⁽¹⁰⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาในประเทศอัฟริกาใต้⁽¹¹⁾

1.4 ยารักษาวินโรคที่รับประทานเข้าไปไม่สามารถจะซึมผ่านเข้าสู่รอยโรคได้ (not penetrating the lesion) โดยปกติยารักษาวินโรคทุกตัวจะมีระดับยาที่สูงพอจะฆ่าเชื้อวินโรคได้โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อปอด (lung tissue) ยาวินโรคบางตัวจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในอวัยวะบางอย่างได้ เช่น ในสมองส่วนกลางหรือเยื่อหุ้มสมอง ยา isoniazid ยา pyrazinamide ผ่านเข้าเยื่อหุ้มสมองได้ดีในระดับที่สามารถจะรักษาวินโรคเยื่อหุ้มสมองได้⁽¹²⁾ ยา rifampin สามารถผ่านเข้าเยื่อหุ้มสมองได้ดีพอใช้และระดับยาอยู่ที่ใช้รักษาได้ ส่วนยา streptomycin และ ethambutol สามารถจะผ่านเข้าเยื่อหุ้มสมองได้ระดับยาพอเพียงในระยะแรกที่เยื่อหุ้มสมองอักเสบ⁽⁶⁾ ในผู้ป่วยที่มีโพรงเยื่อหุ้มปอดอักเสบจากวินโรคและมีลักษณะเป็นหนอง (empyema thoracis) นั้นยารักษาวินโรคอาจจะไม่สามารถผ่านเข้าสู่โพรงหนองได้และทำให้การรักษาไม่ได้ผลดี

2. การรักษาล้มเหลวอาจจะเกิดจากการที่เชื้อมีต่อยารักษาวินโรคที่ใช้อยู่ก่อนการรักษาและไม่มีผลการทดสอบการดื้อยาก่อนการรักษาที่จะนำมาใช้ปรับยา ทำให้การรักษาล้มเหลว เนื่องจากในปัจจุบันสูตรยาระยะสั้นที่ใช้อยู่จะเป็นสูตรยาที่ใช้ยา 4 ตัว ในระยะ 2 เดือนแรก คือใช้ยา isoniazid ยา rifampin ยา pyrazinamide และยา ethambutol และต่อยาด้วยยา isoniazid ร่วมกับยา rifampicin อีกเป็นระยะเวลา 4 เดือน การศึกษาในระยะแรกพบว่าถ้าเชื้อมีต่อยา isoniazid และหรือต่อยา ethambutol จะไม่มีผลต่อการรักษาหลัง 6 เดือนกล่าวคือยาให้ผลการรักษาที่ดี⁽¹³⁾ แต่ถ้าเชื้อมีต่อยา rifampin หรือ ต่อยา pyrazinamide จะมีผลการรักษาล้มเหลวหรือมีการกลับเป็นซ้ำในอัตราที่สูงขึ้น (relapsed) ดังนั้นการดื้อยาก่อนการรักษาจะมีผลทำให้การรักษาล้มเหลว

3. การรักษาด้วยระยะเวลาที่ไม่นานพอจะทำให้มีเชื้อที่หลงเหลืออยู่ในร่างกายมากพอหรือเชื่อไม่ถูกกำจัดให้หมดไปทำให้มีการกลับเป็นซ้ำ (relapsed) อีกครั้ง มีการศึกษาพบว่าในระยะหรือยุคที่มีการ

ใช้ยารักษาวัณโรคปอดแบบดั้งเดิม 18 เดือนและมีการผ่าตัดปอดร่วมด้วย ยิ่งให้ระยะเวลาในการรักษานานเท่าใดก็จะมีอัตราเพาะเชื้อพบจากปอดลดลงเท่านั้นและหลังจากการรักษาเป็นระยะเวลา 18 เดือน หรือนานกว่าก็จะไม่พบเชื้อวัณโรคเลย⁽¹⁴⁾ ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการรักษาจะป้องกันไม่ให้เกิดการรักษาล้มเหลวได้

4. การรักษาล้มเหลวอาจจะเกิดจากการที่โรคของผู้ป่วยมีอาการมากหรือรุนแรงจนทำให้การรักษาไม่ได้ผลเท่าที่ควร ถึงแม้ระบบยาระยะสั้นจะมีประสิทธิภาพสูงและให้ผลการรักษาที่ดีมากก็ตาม ในการศึกษาสูตรยาระยะสั้นระบบต่างๆ จะพบว่ามียอัตรการเสียชีวิตในแต่ละการศึกษาอยู่ องค์การอนามัยโลกได้ประมาณการว่าในปี พ.ศ. 2533 มีผู้ป่วยวัณโรคที่เสียชีวิตจากวัณโรคทั่วโลกประมาณ 2.5 ล้านคน⁽¹⁵⁾

5. การรักษาวัณโรคล้มเหลวหรือไม่ได้ผลอาจจะเกิดจากการที่ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่ออาการข้างเคียงของยาได้ ทำให้ไม่สามารถรับประทานยาต่อได้อย่างสม่ำเสมอหรือผู้ป่วยเลือกที่จะรับประทานยารักษาวัณโรคบางตัวเองทำให้การรักษาล้มเหลวได้

สาเหตุที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นสาเหตุที่พบว่าทำให้การรักษาวัณโรคล้มเหลวได้ ส่วนใหญ่ของการรักษาล้มเหลวมักจะเกิดจากการขาดการรักษาหรือรักษาไม่สม่ำเสมอ สาเหตุของการรักษาล้มเหลวอื่นๆมักจะเป็นสาเหตุรองหรือพบในอัตราที่ต่ำกว่า

Researchs questions

1. ศึกษาหาปัจจัยหรือสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยมารับการรักษาไม่สม่ำเสมอหรือขาดการรักษา วิธีการป้องกันหรือกลยุทธ์ในการทำให้ผู้ป่วยรับการรักษาอย่างสม่ำเสมอเพื่อเพิ่มอัตราการรักษาหาย
2. กลยุทธ์การรักษาด้วยระบบยาระยะสั้นแบบมีตัวควบคุม (directly observed therapy short course, DOTS) เป็นกลยุทธ์หลักในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคให้มีการรับยาสม่ำเสมอแต่สามารถจะปฏิบัติได้ในสถานบริการระดับห่างไกล (periphery) ที่มีระบบสาธารณสุขมูลฐานรองรับที่ดี ในชุมชนเขตเมืองหรือในโรงพยาบาลจะปฏิบัติได้ยาก การศึกษาหารูปแบบของการรักษาด้วยกลยุทธ์ดังกล่าวในเขตเมือง เช่น กรุงเทพมหานครหรือโรงพยาบาลเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการควบคุมวัณโรคเนื่องจากผู้ป่วยจำนวนมากที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลและมีความเชื่อว่าการรักษาในโรงพยาบาลจะให้ผลการรักษาที่ดีกว่า
3. การศึกษาหากกลยุทธ์อื่นในการเพิ่มความสม่ำเสมอในการรักษาหรืออัตราการรักษาหายมีความจำเป็น เนื่องจากกลยุทธ์ DOTS อาจจะไม่สามารถหรือเหมาะสมที่จะใช้ได้กับสถานบริการทุกแห่งได้
4. คุณภาพของยารักษาวัณโรคที่ผลิตในประเทศและยาที่ผลิตจากต่างประเทศมีคุณภาพเหมือนกันหรือไม่ และการเอื้อประโยชน์ในร่างกายผู้ป่วยจะเหมือนกันหรือไม่
5. คุณภาพของยาชนิดที่รวมยาหลายตัวเข้าไว้ในเม็ดยาเดียวกันจะมีคุณภาพได้มาตรฐานหรือไม่ และการเอื้อประโยชน์ของยาจะถูกต้องตามมาตรฐานการรักษาของยาแต่ละตัวหรือไม่

6. ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยารักษาวัณโรคในผู้ป่วยพิเศษบางรายที่มีโอกาสหรือมีความเป็นไปได้ที่จะมีปัญหาของการดูดซึมของยา เช่น ผู้ป่วยวัณโรคที่มีการติดเชื้อโรคเอดส์ร่วมกับ ผู้ป่วยเบาหวานที่มีปัญหาของระบบทางเดินอาหาร (diabetic enteropathy) เป็นต้น
7. ศึกษาหาระบบการเฝ้าระวังคุณภาพของยารักษาวัณโรคที่มีใช้หรือจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดเพื่อการรักษาวัณโรค เพื่อเป็นการประกันว่าผู้ป่วยวัณโรคไทยได้รับการรักษาด้วยยาที่มีคุณภาพสูงพอ
8. ศึกษาหาระดับของยาหรือจลนศาสตร์ของยาในอวัยวะบางแห่ง เช่น เยื่อหุ้มปอดเพื่อใช้ในการปรับขนาดของยาหรือปรับปรุงสูตรยาที่จะใช้รักษาให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด
9. ศึกษาแนวโน้มของการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อวัณโรคในประเทศไทยโดยจัดระบบการเฝ้าระวังอย่างมีระบบและถูกต้องตามหลักการทางระบาดวิทยาและสถิติ เพื่อใช้ประโยชน์ในการวางแผนการควบคุมวัณโรคระดับชาติ
10. ศึกษาอัตราการแพ้ยาวัณโรค (drug hypersensitivity) ว่ามีอัตราความชุกเท่าใดและเกิดจากยาตัวใดมากที่สุด เพื่อใช้ในการแนะนำการดูแลผู้ป่วยวัณโรคที่มีการแพ้ยา
11. ศึกษาหาอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยวัณโรคไทยหลังการรักษาวัณโรคทั้งในผู้ป่วยที่ไม่มีการติดเชื้อและมีการติดเชื้อโรคเอดส์ร่วมกับ และศึกษาหาปัจจัยที่ทำให้ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Fox W . The chemotherapy of pulmonary tuberculosis : a review. Chest 1979 ; 76 (s) : 7855-7965.
2. Crofton J. Failure in the treatment of pulmonary tuberculosis : potential causes and their avoidance. Bull Int Union Against tuberc 1980;55:93-99.
3. จุรี ปุณโณทก. การยอมรับการรักษาด้วยระบบยาระยะสั้นในผู้ป่วยวัณโรคปอด วารสารโรคติดต่อ 2534;17:163-176.
4. จุรี ปุณโณทก. ทำอย่างไรจึงจะทำให้ผู้ป่วยวัณโรครักษากรบ วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก 2535;13:152-5.
5. สายัณห์ แก้วเกตุ, รูปนภ รัตนดิลล ฌ ภูเก็ต, สำเนา โกญจนาท. การประเมินผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยระบบยาระยะสั้น 2HRZ/4HR สถานตรวจโรคปอดกรุงเทพ. วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก 2536;14:105-9.
6. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom recommendations 1998 : Thorax 1998 ; 53: 536-548.
7. เจริญ ชูโชติถาวร, วิลารัตน์ คำเมือง, อาภาพรณ พวงบุญรอด และคณะ การศึกษาระดับของยา rifampin ในเลือดของผู้ป่วยเปรียบเทียบกับระหว่างยารักษาวัณโรคชนิดรวมยาหลายอย่างในเม็ดเดียวกับที่มีจำหน่ายในประเทศไทย. วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก 2537 ; 15 : 167-174.
8. Ramber DB. Toxicologic and pharmacologic aspects of rifampin. Chest. 1993;64:213-216.
9. Patei KB, Belmonte R, Crowe HM. Drug malabsorption and resistant tuberculosis in HIV infected patients . N Engl J Med 1995;332:336-337.
10. Jaruratanasirikul S, The pharmacokinetics of oral rifampin in AIDS patients. J Med Assoc Thai 1998;81:25-28.