



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความชุกของการป่วยเป็นวัณโรค
และการติดเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria
ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี”

โดย ผศ. สวรรยา พงศ์ปริตร และคณะ

31 ตุลาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “ความชุกของการป่วยเป็นวัณโรค
และการติดเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria
ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี”

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--------------------------|---|
| 1. สวรรยา พงศ์ปริตร | คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต |
| 2. พระครูอาทรประชานาถ | มูลนิธิธรรมรักษ์ โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ |
| 3. จุรี เจียรนัยศิลาวงศ์ | คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. กัณฑ์มา ชูแสง | คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต |

ชุดโครงการวัณโรค

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี พ.ศ. 2543 โดยได้รับการชี้แนะในการทำวิจัยจากผู้วิจัยหลายท่าน รวมทั้งได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงานต่างๆ งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี ที่ข้าพเจ้าต้องขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ อาทิ ผู้อำนวยการกองวัดโรค นายแพทย์ภัสกร อัครเสวี ที่กรุณาอนุเคราะห์ให้กองวัดโรคตรวจสอบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค และกรุณามอบรมเจ้าหน้าที่สถานดูแลผู้ป่วยวัณโรคพาหน้ำพู่ให้สังเกตหาผู้ป่วยเป็นวัณโรคและวิธีการรักษาดูแลผู้ป่วยวัณโรคด้วยตนเอง และทำให้เกิดการประสานงานกับสำนักงานสาธารณสุข จังหวัดสระบุรี, คุณสมศักดิ์ เจริญทอง หัวหน้าหน่วยงานชั้นสูตร กองวัดโรคที่สนับสนุนและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค, หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยและคณะทำงานวิจัยในหน่วยงานของท่าน และได้รับความร่วมมืออย่างดียิ่งจากเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการมัยโคแบคทีเรียตลอดระยะเวลาดำเนินการ, นายแพทย์ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ และ อาจารย์อังคณา ฉายประเสริฐ ที่ให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการดำเนินการ และขอขอบคุณ ABBOTT ประเทศไทยอนุเคราะห์ยา clarithromycin

ความสำเร็จของการวิจัยต้องขึ้นกับบุคคลากรหลายฝ่ายที่ทำให้มีการศึกษาที่มูลนิธิธรรมรักษ์ โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ผู้วิจัยขอกราบนมัสการเจ้าอาวาส และประธานมูลนิธิธรรมรักษ์ ดอกเตอร์พระครูอาทรประชานาถ ที่ให้ความอนุเคราะห์ร่วมเป็นผู้ร่วมวิจัย และทำให้การศึกษาในครั้งนี้เกิดขึ้นได้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่พยาบาล ผู้ช่วยพยาบาล อาสาสมัคร และผู้ป่วยทุกท่านในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ที่กรุณาเป็นที่เลียงและประสานงานกับผู้ป่วยในการเก็บสิ่งส่งตรวจ ติดตามการเก็บสิ่งส่งตรวจ การกรอกแบบสอบถาม และ การช่วยประสานงานในการรายงานผลแก่ผู้ป่วยทุกท่าน นอกจากนี้ข้าพเจ้าต้องขอขอบคุณผู้ร่วมงานในโครงการทุกท่าน ที่ร่วมมือทำให้การวิจัยครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้

ที่เหนือสิ่งอื่นใดผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณผู้ป่วยทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้ และขอให้ข้อมูลที่ได้รับกลับไปยังประ โยชน์แก่ท่าน หรือเป็นประ โยชน์ต่อผู้ป่วยอื่นต่อไป

หัวหน้าโครงการวิจัย
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สวรรยา พงศ์ปรีตร
 27 พฤศจิกายน 2544

รหัสโครงการ : RDG3/28/2543

ชื่อโครงการ : ความชุกของการป่วยเป็นวัณโรคและการติดเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี

ชื่อนักวิจัย : สวรรยา พงศ์ปรีตร¹, พระครูอาทรประชานาถ², จุรี เจียรนัยศิลาวงศ์³, กัททิมา ชูแสง¹

¹คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต, ²โครงการธรรมรักษันเวศน์ วัดพระบาทน้ำพุ

³คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

email address : sawanya_pongparit@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ : มีนาคม 2543 – ตุลาคม 2546

วัตถุประสงค์ : ศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) และการติดเชื้อ *M. avium* complex (MAC) และ Nontuberculous Mycobacteria (NTM) จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่สถานดูแลผู้ป่วยเอดส์วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ระหว่างตุลาคม 2543-มกราคม 2545 โดยการทดสอบชีวเคมีเปรียบเทียบกับ PCR-Restriction enzyme analysis (REA) และสำรวจหาการตีอยาของ MTB และ MAC โดยทำการแยกเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะ 822 ตัวอย่างจากผู้ป่วยเอดส์ 278 คน และจากเลือดของผู้ป่วยที่มีไข้เรื้อรัง 181 ราย

วิธีการวิจัย : วินิจฉัยเชื้อที่แยกได้โดยการทดสอบชีวเคมีและ PCR-REA ของ 16S-23S rDNA spacer gene แล้วทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของ MTB ที่แยกได้โดยวิธี Proportional Method และหา minimum inhibitory concentration (MIC) ของยา clarithromycin ของ MAC ที่แยกได้โดยวิธี broth macro dilution test และ E-test นอกจากนี้ยังทำการแยกวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พบในเลือดของผู้ป่วย

ผลการทดลอง : พบผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุมีอัตราการติดเชื้อวัณโรค 15.38% เป็นวัณโรคปอด 13.54%, Disseminated TB 2.46% พบเชื้อวัณโรคตีอยา 33.96% เป็น MDR-TB 11.32% อัตราการพบเชื้อ MAC เท่ากับ 15.38% โดยพบเชื้อในเสมหะ 12%, Disseminated MAC 5.85 % โดยพบเป็นเชื้อ *M. avium* สูงที่สุด 12.30% ไม่พบสายพันธุ์ MAC ที่ตีอยา clarithromycin พบ NTM อื่นๆ 12.30% พบในเสมหะ 12%, ในเลือด 0.31% โดยพบ *M. kansasii* *M. scrofulaceum* *M. chelonae* *M. fortuitum* *M. gordonae* และ *M. flavescens* และพบเชื้อที่สงสัยเป็น *M. xenopi* และ *M. simiae* โดยพบว่าจากเชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกได้ 245 สายพันธุ์ REA-PCR ของ 16S-23S rDNA spacer สามารถแยกวินิจฉัยเชื้อได้ตรงกับการทดสอบชีวเคมีถึง 91.02% และแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากในเลือดผู้ป่วยเอดส์ 16.57% พบเป็นเชื้อ *Cryptococcus* และ *Salmonella* สูงสุดอย่างละ 3.87%

สรุปผลและข้อเสนอแนะ : พบการติดเชื้อ TB, MAC และ NTM สูงมากในผู้ป่วยเอดส์ทั้งในเลือดและเสมหะ โดยเฉพาะเชื้อวัณโรคตีอยาที่มักเป็นสาเหตุการตายในผู้ป่วยเอดส์ที่สำคัญ การแยกวินิจฉัยเชื้อที่พบในผู้ป่วยอย่างรวดเร็วจะทำให้เลือกการรักษาที่ใช้รักษาได้อย่างเหมาะสมจะช่วยรักษาชีวิตของผู้ป่วยเอดส์ให้ยาวนาน REA-PCR อาจเป็นทางเลือกที่ถูกกว่าการใช้ Accuprobe และเร็วกว่าการทดสอบชีวเคมีในการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่เร็วและเชื่อถือได้ยังคงเป็นที่ต้องการ

Project Code : RDG3/28/2543

Project Title : Prevalence of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacteriosis in AIDS patients at Wat Prabat Numpu , Lopburi

Investigator : Pongparit S¹, Phrakru Arthornprachanard², Jearanaisilavong J³, Chuseang K¹

¹Dept.of Medical Technology, Rangsit University ²Dharmaraknivej Wat Prabat Numpu

³Siriraj Medical School , Mahidol University

email address : sawanya_pongparit@hotmail.com

Project Duration : March 2000 – October 2003

Objective : To study prevalence of *Mycobacterium tuberculosis*(MTB), *M. avium* complex(MAC) and Nontuberculous Mycobacteria(NTM) infection in AIDS patients in AIDS care center of Wat Prabat Numpu, Lopburi province during October 2000 to January 2002, especially the drug resistance TB and the clarithromycin-resistance strains of MAC. Also to compare the Identification of all isolates by conventional methods and PCR-Restriction enzyme analysis (REA). Septicemia of AIDS patients with bacteria and fungi will also be studied.

Methodology : From 278 AIDS patients with tuberculosis symptoms 822 sputum specimens were collected, blood samples from 181 AIDS patients with prolong fever were also collected. Specimens were cultured and conventional biochemical tests as well as PCR-REA of 16S-23S rDNA spacer gene were used to identify all isolates. MTB isolates were determined for susceptibilities to anti-tuberculosis drugs by proportional method, while MAC isolates were determined for minimum inhibitory concentration (MIC) of clarithromycin by broth macrodilution test and E-test. Septicemia due to other bacteria and fungi in AIDS patients were also studied.

Results : Prevalence of tuberculosis in AIDS patients at Wat Prabat Numpu were 15.38% with 13.54% pulmonary TB and 2.46% disseminated TB. Prevalence of drugs resistance TB were as high as 33.96% with 11.32% MDR-TB. Prevalence of MAC found in AIDS patients were as high as TB (15.38%), 12% were found in sputum with 5.85% Disseminated MAC. Most strains of MAC isolated were *M. avium* (12.30%). MIC of clarithromycin by both methods showed that no strain of clarithromycin resistant MAC was isolated. Other NTM were found 12.30% both in sputum and blood samples (12% and 0.31%, respectively) ; included *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* and *M. flavescens* ; with 2 isolates that were suspected to be *M. xenopi* and *M. simiae*. Identification of 245 isolates by conventional methods and REA-PCR showed 91.02% comparable results. Bacteria and fungi were isolated from 16.57% of all hemoculture. The most cases of septicemia found in this study were due equally to Cryptococcosis and Salmonellosis (3.87%).

Conclusion : With high rates of MAC and NTM infection and the prevalence of drug resistance TB in AIDS patients. Rapid detection and identification methods of *Mycobacterium* and its susceptibility were needed in order to select the proper treatment that could reduce a mortality rate in AIDS patients. REA-PCR could be a rapid , reliable and cheaper method to identify *Mycobacterium* compare to Accuprobe and biochemical tests. A fast and reliable method to test for drug susceptibility still needed.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ที่มาของปัญหา	1
2. ทบทวนเอกสาร	5
3. วัตถุประสงค์	47
4. ประโยชน์และการนำไปใช้	47
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	49
1. เครื่องมือ	49
2. อุปกรณ์	50
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ	51
4. ผู้ป่วย	52
5. สิ่งส่งตรวจ	52
6. การเพาะเชื้อจากเสมหะ	53
7. การแยกวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> โดยการ Amplification of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer	59
8. การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค	64
9. การทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของเชื้อ <i>Mycobacterium avium complex</i>	67
10. การเก็บ stock เชื้อ <i>Mycobacterium</i>	70
11. การแยกวินิจฉัยแบคทีเรียอื่น ๆ	70
12. การแยกวินิจฉัยเชื้อรา	70
บทที่ 3 ผลการดำเนินการ	71
1. ผู้ป่วย	71
2. การตรวจหาการติดเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ในเสมหะ	71
3. การตรวจหาการติดเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ในเลือด	109
4. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค	120
5. ผลการทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของ <i>Mycobacterium avium complex</i>	122
6. ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆในเลือด	125

	หน้า
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	127
1. ผู้ป่วย	127
2. ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Mycobacterium</i> จากเสมหะผู้ป่วย โดยการย้อมและการเพาะเชื้อ	128
3. ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> จากเสมหะ โดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR	130
4. การวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> จากเลือด โดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR	131
5. การเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> โดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR	132
6. ความชุกของการตรวจพบเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยเอดส์ของวัดพระบาทน้ำพุ	135
7. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค	137
8. ความชุกของการตรวจพบเชื้อ Nontuberculous <i>Mycobacterium</i> ในผู้ป่วยเอดส์ของวัดพระบาทน้ำพุ	141
9. การทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของ <i>Mycobacterium avium</i> complex	144
10. ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆในเลือด	146
11. อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์	147
12. สรุปผลการการศึกษา	149
เอกสารอ้างอิง	150
ภาคผนวก	168

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	<i>Mycobacterium</i> species	9
ตารางที่ 2	Nontuberculous mycobacteria ที่ทำให้เกิดโรคในคน	12
ตารางที่ 3	การวินิจฉัยเชื้อ rapid growers ที่พบบ่อย	17
ตารางที่ 4	การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing photochromogens ที่พบบ่อย	18
ตารางที่ 5	การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing scotochromogens ที่พบบ่อย	18
ตารางที่ 6	การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing niacin-positive nonchromogens	19
ตารางที่ 7	การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing niacin-negative nonchromogens	20
ตารางที่ 8	ความเข้มข้นวิกฤติของยาด้านวัฒนธรรมโรคนอกอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด	39
ตารางที่ 9	ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการทดสอบ	64
ตารางที่ 10	การอ่านผลการทดสอบความไวต่อยาด้านวัฒนธรรมโรควิธี Proportional Method โดยวิธีของ LCDC (Laboratory Center for Disease Control, Canada)	66
ตารางที่ 11	จำนวนผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์วัดพระบาทน้ำพุ และจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมหะ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2545	72
ตารางที่ 12	จำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะและจำนวนเสมหะที่นำส่ง	72
ตารางที่ 13	ช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ	73
ตารางที่ 14	จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมหะและมีอาการทางคลินิกของวัณโรค	74
ตารางที่ 15	จำนวนผู้ป่วยที่เคยได้รับยารักษาวัณโรค	75
ตารางที่ 16	ผลการย้อมเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์	75
ตารางที่ 17	ผลการวินิจฉัย <i>Mycobacterium</i> species ที่แยกจากเสมหะโดยการทดสอบชีวเคมี	76
ตารางที่ 18	ผู้ป่วยที่แยกวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> species จากเสมหะโดยการทดสอบชีวเคมี	78
ตารางที่ 19	ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> sp ที่แยกจากเสมหะ โดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer ร่วมกับ restriction enzyme analysis เทียบการทดสอบชีวเคมี	82
ตารางที่ 20	ผลการวินิจฉัยโดยชีวเคมี, REA-PCR patterns และความเหมือนของ DNA sequence ของเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ที่ผลการแยกวินิจฉัยทางชีวเคมี และ REA-PCR ไม่ตรงกัน	96
ตารางที่ 21	ผลการย้อม Ziehl-Neelsen acid fast stain และ ผลการเพาะแยกเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> (M.tb) และ Nontuberculosis Mycobacterium (NTM) ของเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์	107
ตารางที่ 22	ผลการเพาะแยกเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> และ Nontuberculosis Mycobacteria จากเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ และ การได้รับยาด้านวัณโรค	108

		หน้า
ตารางที่ 23	ผลการเพาะแยกเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> และ Nontuberculosis Mycobacteria (NTM) ของเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์ตามจำนวนเสมหะที่นำส่ง	109
ตารางที่ 24	ช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture	110
ตารางที่ 25	จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเลือดและมีอาการทางคลินิกของวัณโรค	111
ตารางที่ 26	จำนวนผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture ที่เคยได้รับยารักษาวัณโรค	111
ตารางที่ 27	ผลการเพาะแยกเชื้อ <i>Mycobacterium</i> จากเลือดผู้ป่วยโรคเอดส์ที่ วัดพระบาทน้ำพุ	112
ตารางที่ 28	ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ที่แยกจากเลือดผู้ป่วยเอดส์โดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer ร่วมกับ restriction enzyme analysis เทียบกับการทดสอบชีวเคมี	113
ตารางที่ 29	ผลการเพาะแยกเชื้อ <i>M. tuberculosis</i> และ Nontuberculosis Mycobacteria จาก hemoculture ของผู้ป่วยโรคเอดส์ และ การได้รับยาต้านวัณโรค	119
ตารางที่ 30	ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อวัณโรคที่แยกจากผู้ป่วย	121
ตารางที่ 31	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อยา Clarithromycin ของ <i>Mycobacterium avium</i> complex โดยวิธี broth macrodilution test	122
ตารางที่ 32	MIC ของยา Clarithromycin ต่อ <i>Mycobacterium avium</i> complex โดยวิธี E-Test [®]	124
ตารางที่ 33	การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จาก Hemoculture ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี	126
ตารางที่ 34	อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ที่ตรวจพบเชื้อในเสมหะ และ ในเลือด	148

สารบัญภาพ

			หน้า
ภาพที่	1	โครงสร้างยา isoniazid	26
ภาพที่	2	โครงสร้างยา rifampicin	27
ภาพที่	3	โครงสร้างยา ethambutol	28
ภาพที่	4	โครงสร้างยา streptomycin	29
ภาพที่	5	โครงสร้างยา kanamycin	30
ภาพที่	6	โครงสร้างยา amikacin	31
ภาพที่	7	โครงสร้างยา Ofloxacin	33
ภาพที่	8	โครงสร้างยา pyrazinamide	34
ภาพที่	9	สูตรโครงสร้าง Clarithromycin และ 14-OH Clarithromycin metabolite ของ Clarithromycin	37
ภาพที่	10	Dendrogram ของการแยก species ของ Mycobacterium โดยใช้ PCR-REA patterns ของ 16S-23S rDNA spacer	63
ภาพที่	11	ร้อยละของเชื้อ Mycobacterium species ต่างๆ ที่แยกจากเสมหะ และวินิจฉัยด้วยการทดสอบชีวเคมี	77
ภาพที่	12	ร้อยละของผู้ป่วยเอคส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ Mycobacterium sp. ต่างๆ จากเสมหะ และวินิจฉัยโดยการทดสอบชีวเคมี	79
ภาพที่	13	Agarose gel electrophoresis of Mycobacterium chromosomal DNA extracted by boiling method, enzymatic lysis method and mechanical lysis method	81
ภาพที่	14	ร้อยละของเชื้อ Mycobacterium species ต่างๆ ที่แยกจากเสมหะ และวินิจฉัยด้วยการทดสอบชีวเคมี และ PCR-REA ให้ผลตรงกัน	82
ภาพที่	15	Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. tuberculosis</i>	85
ภาพที่	16	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. avium</i> complex; <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> and unclassified <i>M. avium</i> complex.	86
ภาพที่	17	Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. kansasii</i> .	87
ภาพที่	18	Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. scrofulaceum</i>	88
ภาพที่	19	Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. chelonae</i> .	89
ภาพที่	20	Amplified products of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. fortuitum</i>	90

			หน้า
ภาพที่	21	Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. gordonae</i>	91
ภาพที่	22	Amplified products of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. flavescens</i> .	92
ภาพที่	23	Phylogenetic tree แบบ no root neighbor-joining tree ที่แสดง DNA alignment ของ gene sequence ของ 16S-23S rRNA spacer gene ของเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ที่ผลการแยกวินิจฉัยโดยวิธีการทดสอบชีวเคมี และ PCR-REA ไม่สัมพันธ์กัน กับ <i>Mycobacterium</i> species ต่างๆ โดยอาศัยความเหมือนของ DNA sequence ของ ISR gene และแสดงค่า bootstrap values ของแต่ละแขนงของ phylogenetic tree เฉพาะที่มีค่ามากกว่า 70%	97
ภาพที่	24	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv with 2 clinical isolates that belong in group 1 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their ISR gene sequences were closely related to ISR gene of <i>M. simiae</i> [Z46426] in GenBank database.	98
ภาพที่	25	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291, <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950 and a clinical isolate that belong in group 2 unidentified <i>Mycobacterium</i> that its DNA sequences was closely related to ISR gene of <i>M. xenopi</i> [Y14192] in GenBank database	99
ภาพที่	26	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291, <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, <i>M. fortuitum</i> ATCC 6841 and 2 clinical isolates that belong in group 3 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their DNA sequences were closely related to ISR gene of <i>M. fortuitum</i> [AJ291589] in GenBank database.	100
ภาพที่	27	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291, <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950, <i>M. flavescens</i> ATCC 23035 and <i>M. gordonae</i> 330 with 2 clinical isolates that belong in group 4 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their DNA sequences were closely related to ISR gene of <i>M. gordonae</i> [L42260] in GenBank database.	101
ภาพที่	28	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291, <i>M. intracellulare</i> ATCC 13950 and <i>M. gordonae</i> 330 with 3 clinical isolates that belong in group 5 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their DNA sequences were closely related to ISR gene of <i>M. avium</i> RiVM 9601918 [AF315833] in GenBank database.	102

			หน้า
ภาพที่	29	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291 and <i>M. scrofulaceum</i> ATCC 19981 with 2 clinical isolates that belong in group 6 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their DNA sequences were closely related to ISR gene of <i>M. avium</i> RiVM 9601918 [AF315833] in the GenBank database	103
ภาพที่	30	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. avium</i> ATCC 25291 and <i>M. chelonae</i> ATCC 0019 with a clinical isolate that belong in group 7 unidentified <i>Mycobacterium</i> that their DNA sequences were closely related to ISR gene of <i>M. avium</i> Myc373 [AF410479] in the GenBank database.	104
ภาพที่	31	Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of <i>M. kansasii</i> ATCC 12478 and <i>M. tuberculosis</i> H37Rv with one of the clinical isolates that belong in group 8 unidentified <i>Mycobacterium</i> , before and after subculture. DNA sequences of ISR gene of pure culture of an isolate in group 8 unidentified <i>Mycobacterium</i> was closely related to ISR gene of <i>M. kansasii</i> [AB026695] in GenBank database.	105
ภาพที่	32	ร้อยละของผู้ป่วยเอดส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> จากเสมหะ โดยการเพาะเชื้อ เทียบกับการซ่อมพบ AFB	107
ภาพที่	33	ร้อยละของผู้ป่วยเอดส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> ในเลือด	113
ภาพที่	34	Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with <i>Hae</i> III on 3% agarose gel of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isolates from hemoculture	114
ภาพที่	35	Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with <i>Hae</i> III on 3% agarose gel of <i>M. avium</i> isolates from hemoculture	115
ภาพที่	36	Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of <i>M. intrcellulare</i> isolates from hemoculture	116
ภาพที่	37	Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with <i>Hae</i> III on 3% agarose gel of unclassified <i>M. avium</i> complex isolate from hemoculture	117
ภาพที่	38	Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with <i>Hae</i> III on 3% agarose gel of <i>M. kansasii</i> isolates from hemoculture	118
ภาพที่	39	Minimum inhibitory concentration ต่อยา clarithromycin ของ <i>M. avium</i> complex ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี Broth Macrodilution Test	123
ภาพที่	40	Minimum inhibitory concentration ต่อยา clarithromycin ของ <i>M. avium</i> complex ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี E-Test [®]	125

บทที่ 1

บทนำ

1. ที่มาของปัญหา

1.1 ปัญหาวัณโรค

แบคทีเรียใน Genus *Mycobacterium* พบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อร้ายแรงที่เป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุขอย่างมากและเป็นที่รู้จักทั่วโลกมาเป็นเวลาช้านานแล้ว ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2417 ที่ Armauer Hansen แยกเชื้อ *M. leprae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรื้อน (Hansen 1880) และ Robert Koch พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุของวัณโรคในปี พ.ศ. 2425 (Koch 1882) ปัจจุบันวัณโรคยังจัดเป็นสาเหตุของโรคติดต่อที่พบบ่อยและเป็นอันตรายมากที่สุดโรคหนึ่ง เนื่องจากทำให้ผู้ป่วยทุกข์ทรมานจากอาการที่เรื้อรังเป็นเวลานานและส่วนใหญ่อาจเสียชีวิตในที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถแพร่ระบาดสู่ผู้ที่อยู่ใกล้ชิดได้โดยง่าย การควบคุมวัณโรคเป็นไปได้ค่อนข้างยากลำบากจนกระทั่ง ในช่วง 40 ปีที่ผ่านมา เมื่อมีการพัฒนารักษาวัณโรคขึ้นหลายขนาน และมีการรณรงค์ให้ใช้วัคซีน BCG เพื่อป้องกันโรคอย่างแพร่หลาย ทำให้ปัญหาในประเทศอุตสาหกรรมลดลงอย่างมากในประเทศที่กำลังพัฒนา แม้ว่าวัณโรคยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ แต่เริ่มมีแนวโน้มว่าจะควบคุมโรคได้ในที่สุดทำให้ปัญหาวัณโรคเริ่มถูกละเลย ประสิทธิภาพในการตรวจหาผู้ติดเชื้อไม่ครอบคลุม ขาดการติดตามผลการรักษาทำให้ผู้ป่วยได้รับยาไม่ครบถ้วน ซึ่งนอกจากจะไม่สามารถกำจัดเชื้อวัณโรค ยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาเข้ามาแทรกทำให้การรักษาไม่ได้ผล เมื่อมีการระบาดของโรคเอดส์ที่ทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดต่ำลงจึงติดเชื้อวัณโรคได้ง่าย พบว่าจำนวนผู้ป่วยวัณโรคทั้งในกลุ่มคนที่เป็โรคเอดส์และไม่เป็นโรคเอดส์กลับมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในปี พ.ศ. 2534 Kochi รายงานว่าประชากรประมาณ 1,700 ล้านคน หรือประมาณ 1 ใน 3 ของประชากรของโลกกำลังติดเชื้อวัณโรค ทำให้มีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่สูงถึง 8-10 ล้านคน/ปี ในจำนวนนี้อยู่ในทวีปเอเชียและแปซิฟิกถึง 5 ล้านคน (Kochi 1991) ในปี พ.ศ. 2537 มีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคถึง 3 ล้านคนต่อปี ร้อยละ 98 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา นับเป็นอัตราการติดเชื้อและเสียชีวิตที่สูงมากกว่าในอดีต องค์การอนามัยโลกคาดว่าถ้าไม่หาทางแก้ไขปัญหาวัณโรค ในปี พ.ศ. 2547 อัตราการเสียชีวิตจะเพิ่มเป็น 4 ล้านคนต่อปี ในปี พ.ศ. 2537 องค์การอนามัยโลกจึงประกาศให้วัณโรคเป็น 'ปัญหาฉุกเฉินระดับโลก' ที่ต้องร่วมกันหาแนวทางแก้ไขและพัฒนาวิธีการในการตรวจหาผู้ป่วยที่ติดเชื้อใหม่ให้ครอบคลุมและมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังต้องให้การรักษาผู้ป่วยวัณโรคด้วยระบบยาด้านวัณโรคอย่างถูกต้องและเหมาะสม จึงจะสามารถลดแหล่งแพร่เชื้อวัณโรค (WHO 1994 a)

สำหรับประเทศไทยวัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีการระบาดทั่วประเทศ และเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขมาเป็นเวลานาน ในปี พ.ศ. 2496 อัตราผู้เสียชีวิตจากวัณโรคสูงถึง 43.5 รายต่อประชากรแสนคน เมื่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องดำเนินการควบคุมปัญหาวัณโรคตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 อัตราป่วยเป็นวัณโรคในประเทศไทยลดลงจาก 150 ราย/ประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2528 เป็น 76 ราย/ประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2534 หรือประมาณ 4 หมื่นคน โดยมีอัตราการเสียชีวิตลดเหลือ 6.5 ราย/ประชากรแสนคน อย่างไรก็ตามในขณะนั้นวัณโรคยังจัดเป็นสาเหตุการตายที่สูงสุดจากโรคติดเชื้อและเป็นสาเหตุการตายสูงเป็นอันดับที่ 5 ของสาเหตุการตายทั้งหมดของประเทศ การตรวจหาผู้ติดเชื้อวัณโรคยังคงครอบคลุมเพียงร้อยละ 50-60 และมีผู้เข้ารับการรักษาครบถ้วนและรักษาให้หายขาดเพียงร้อยละ 50-70 เมื่อต้องเผชิญปัญหาการดื้อยาของเชื้อวัณโรคโดยเฉพาะจากเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน ร่วมกับการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้ผู้ป่วยวัณโรคในประเทศไทยกลับมีปริมาณมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2536 ผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มเป็นประมาณ 5 หมื่น คน หรือ 85 รายต่อประชากรแสนคน โดยเฉพาะในแหล่งที่มีการแพร่ระบาดของโรคเอดส์สูงเช่นภาคเหนือตอนบนมีผู้ป่วยวัณโรคใหม่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วยถึงร้อยละ 39.7 รองลงมาคือ กรุงเทพมหานคร ร้อยละ 11.6 แนวโน้มของผู้ที่ป่วยเป็นวัณโรคเนื่องจากการติดเชื้อ HIV ก็มีแต่จะเพิ่มสูงมากขึ้น ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยโรคเอดส์โดยวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ เพื่อจะสามารถทำการรักษาวัณโรคได้อย่างรวดเร็วและครบถ้วน จะช่วยลดแหล่งแพร่เชื้อวัณโรค ลดปัญหาวัณโรคดื้อยาและลดปัญหาผลกระทบของการระบาดของโรคเอดส์ต่อการระบาดของวัณโรค (กองวัณโรค 2539, สยามคมปราบวัณโรคฯ และ คณะ 2539, วัลลภ 2542)

1.2 ปัญหาของมัยโคแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค

ในช่วงต้นของศตวรรษ *M. tuberculosis* เป็นเชื้อก่อโรคสำคัญเพียง species เดียวที่สามารถแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก ต่อมามีการแยกเชื้อ *Mycobacterium* species อื่น ได้จากสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ ฟุ่นละออง และ มูลสัตว์บางชนิด โดยไม่ทำให้เกิดโรค จึงเชื่อว่าเชื้อเหล่านี้เป็น saprophyte แต่ต่อมามีรายงานการเกิดโรคในคนหรือสัตว์แต่ความรุนแรงของโรคจะน้อยกว่าวัณโรค และโรคเรื้อนมาก จึงเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า Nontuberculous mycobacteria (NTM) (American Thoracic Society 1997) มีการเรียกชื่อในกลุ่มนี้ด้วยชื่ออื่นอีก เช่น mycobacterium other than tuberculosis (MOTT) , atypical mycobacteria , environmental mycobacteria เป็นต้น (Timpe and Runyon 1954 , Ellis 1988) ในปี พ.ศ. 2526 *Mycobacterium* species ที่เป็นที่ยอมรับมี 54 species (Wayne and Kubica 1986) และมีการค้นพบเชื้อ *Mycobacterium* species อื่น เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบันมี *Mycobacterium* ทั้งที่ก่อและไม่ก่อโรค 71 species โดยอาศัยคุณสมบัติ ของเวลาที่เชื้อให้ colonies ที่มองเห็นได้บน solid media ลักษณะ colonies และผลทางชีวเคมี (Shinnick and Good 1994)

Nontuberculous mycobacteria มี virulence ต่ำ จึงก่อโรคในคนปกติได้น้อยมาก มักจะก่อโรคฉวยโอกาสในคนไข้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (immunocompromised host) หรือมี underlying disease (Wolinsky 1979) อุบัติการณ์การติดเชื้อ NTM ในแต่ละท้องถิ่นมีความแตกต่างกันมาก ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อุบัติการณ์ของวัณโรค พบว่าประเทศที่มีการระบาดของวัณโรคสูงจะมีอัตราการติดเชื้อ NTM ต่ำ แต่ประเทศที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัณโรคและมีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคลดลง จะพบการติดเชื้อ NTM สูงขึ้น เช่น ประเทศญี่ปุ่นในระหว่างปี พ.ศ. 2514-2526 อุบัติการณ์ของวัณโรคลดลงจาก 133 คน เป็น 47 คน ต่อประชากรแสนคน อุบัติการณ์การติดเชื้อ NTM สูงขึ้นจาก 0.8 คนเป็น 3.5 คน ต่อประชากรแสนคน (Tsukamura, *et al.* 1985) ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของสถานพยาบาลและโรงพยาบาล ประเทศที่สามารถควบคุมวัณโรคได้ จะสามารถตรวจหาและแยกวินิจฉัยเชื้อวัณโรค และเชื้อ NTM ได้ดีกว่า อีกปัจจัยที่มีผลกับอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ NTM คือ สภาพภูมิอากาศ การติดเชื้อ NTM จะพบมากในเขตอบอุ่นมากกว่าเขตร้อนหรือเขตกึ่งหนาว ซึ่งจะพบมากในสหรัฐอเมริกา แคนาดา ยุโรป ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น (Tsukamura, *et al.* 1984) ปัจจุบันปัจจัยที่ผลกับความชุกของการติดเชื้อ NTM อย่างมาก คือ การแพร่ระบาดของโรคเอดส์ที่ทำให้ผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันต่ำ จากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี พ.ศ. 2524-2526 พบว่ามีอุบัติการณ์การติดเชื้อ NTM ก่อนการระบาดของโรคเอดส์ประมาณ 1.8 คน/ประชากรแสนคน ในจำนวนนี้ 1.1 คน/ประชากรแสนคน เป็นการติดเชื้อ *M. avium* complex ที่ทำให้เกิด pulmonary mycobacteriosis ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่ปอดจะมีอาการคล้ายวัณโรคเป็นส่วนใหญ่ แต่อาจพบการติดเชื้อที่ตำแหน่งอื่นๆแบบแพร่กระจายไปทั่วร่างกายได้ด้วยในผู้ป่วยที่มี underlying disease (O'Brien, *et al.* 1987) ภายหลังการแพร่ระบาดของโรคเอดส์การติดเชื้อ NTM เพิ่มขึ้นอย่างมาก และมีสาเหตุจาก *Mycobacterium* หลาย species ที่เคยพบเป็นเพียงเชื้อที่แยกได้สิ่งแวดล้อมโดยไม่ก่อโรค ในผู้ป่วยเอดส์มักพบการติดเชื้อ NTM แบบแพร่กระจายไปทั่วร่างกายมากกว่าการติดเชื้อที่ปอด สามารถแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ เช่น เลือด ค่อน้ำเหลือง ไชกระดูก ตับ ม้าม กระดูก ข้อ ผิวหนัง เชื้อหุ้มสมอง ลูกตา ทอนซิล ลำไส้ และ ไต (Horsburgh, *et al.* 1991) ในประเทศอุตสาหกรรม *M. avium* complex (MAC) และ NTM จัดเป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ที่สำคัญและพบบ่อยที่สุด โดยพบสูงกว่าการติดเชื้อวัณโรคอาจเป็นเพราะประเทศเหล่านี้สามารถควบคุมวัณโรคได้ทำให้ผู้ป่วยเอดส์มีโอกาสได้รับเชื้อวัณโรคได้น้อยกว่า ขณะที่เชื้อ MAC และ NTM อื่นๆ มีแหล่งแพร่เชื้ออยู่ในธรรมชาติ ในปี พ.ศ. 2532 ร้อยละ 5.5 ของผู้ป่วยเอดส์ในสหรัฐอเมริกา ติดเชื้อ MAC ในปี พ.ศ. 2535 มีรายงานการแยกเชื้อ MAC จากเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่มีภาวะ bacteremia ได้ถึงร้อยละ 43 และมักพบเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยเอดส์เสียชีวิตอย่างรวดเร็ว ในผู้ป่วยเอดส์ที่เสียชีวิตจะตรวจพบมีการติดเชื้อ MAC ในถึงร้อยละ 47 - 50 (Horsburgh and Selik 1989, Benson and Ellner 1993, Nightingale, *et al.* 1992, Greene, *et al.* 1982, Zakowski, *et al.* 1982)

นอกจากนี้จะพบว่า NTM แต่ละชนิดตอบสนองต่อยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคแตกต่างกัน เมื่อให้การรักษาแบบ long term multidrug treatment ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ NTM จะตอบสนองต่อการรักษาเพียง ร้อยละ 45-65 เท่านั้น (Hornick, *et al.* 1988) เชื้อในกลุ่มของ NTM เชื้อ *M. kansasii* จะไวต่อยารักษาวัณโรคได้ดีที่สุดโดยเฉพาะ rifampin ขณะที่กลุ่ม MAC เช่น *M. avium* และ *M. intracellulare* ซึ่งเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อ NTM และ เชื้อ NTM ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะ rapid grower *Mycobacterium* จะตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษาวัณโรคได้น้อย โดยเฉพาะกับยา isoniazid และ parazinamide (Kim, *et al.* 1981) จึงจำเป็นต้องแยกวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม NTM และเลือกใช้ยารักษาที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ Nontuberculous mycobacteria

ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ NTM ที่ปอดครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2511 โดยเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *M. kansasii* (Nuchprayoon, *et al.* 1968) ระหว่างปี พ.ศ. 2512-2521 นายแพทย์ นัดดา ศรียาภย รายงานการติดเชื้อ NTM ที่ปอด 24 ราย; เป็น *M. avium-intracellulare* 7 ราย, *M. avium* 6 ราย, *M. scrofulaceum* 6 ราย, *M. fortuitum* 2 ราย และเป็น *M. gordonae*, *M. kansasii* และ เชื้อที่สงสัยว่าเป็น *M. simiae* อย่างละ 1 ราย ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นวัณโรคร่วมด้วยหรือมีโรคที่ปอดชนิดอื่น ๆ (Sriyabhaya and Wongwattana 1981) และแพทย์หญิงศรีบุศย์ วงศ์วัฒน์รายงานการพบเชื้อ NTM ที่ปอดในระหว่างปี พ.ศ. 2522-2530 อีก 42 ราย พบมีอาการทางคลินิก 30 ราย เป็นเชื้อ MAC 20 ราย, *M. scrofulaceum* 3 ราย, *M. kansasii* 3 ราย และเป็น *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. asiaticum*, *M. szulgai* รวมทั้งเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *M. simiae* ชนิดละ 1 ราย โดยพบในผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่เป็นวัณโรคหรือมีโรคที่ปอดชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย (Wongwatana and Sriyabhaya 1992) ในปี พ.ศ. 2534-2535 นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร และคณะ ศึกษาจากเสมหะของผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรคและส่งเพาะเชื้อ จำนวน 4,016 ราย พบเชื้อ NTM และมีอาการทางคลินิก 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.37 โดยพบเป็น MAC 6 ราย, *M. chelonae subs. abscessus* 3 ราย, *M. scrofulaceum* 2 ราย, *M. kansasii* 2 ราย และเป็น *M. gordonae* และ *M. flavescens* อย่างละ 1 ราย ผู้ป่วยที่แยกได้เชื้อ NTM ไม่พบมีการติดเชื้อเอคส์ร่วมด้วย (Chuchottaworn, Sudsamart and Kanpai 1998) ในปี พ.ศ. 2538-2539 นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร และคณะ เพาะเชื้อจากเลือดของคนไข้โรคเอคส์ที่มีอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุนาน 2 สัปดาห์ จำนวน 334 ราย พบมีการติดเชื้อแบบแพร่กระจายทั่วร่างกายของเชื้อ MAC ร้อยละ 17.4 และ *M. tuberculosis* ร้อยละ 10.2 แสดงให้เห็นว่าในผู้ป่วยเอคส์ระยะสุดท้ายในประเทศไทยมีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ MAC ชนิดแพร่กระจายทั่วร่างกายในอัตราที่สูงเช่นเดียวกับในประเทศอุตสาหกรรม (Chuchottaworn, *et al.* 1999) จึงควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อ MAC และ NTM ชนิดอื่นๆ ในผู้ป่วยเอคส์ขั้นสุดท้าย ซึ่งจะตรวจพบเชื้อ ได้มากขึ้นหากทำการเพาะหาเชื้อทั้งในเลือดและในเสมหะ

2. ทบทวนเอกสาร

2.1 คุณสมบัติทั่วไปของ *Mycobacterium*

Genus *Mycobacterium* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน Class Actinomycetes Order Actinomycetales Family Mycobacteriaceae คุณสมบัติสำคัญของเชื้อในกลุ่มนี้ คือมีผนังเซลล์ที่หนา และมีไขมันที่มีองค์ประกอบของ mycolic acid ในปริมาณมาก ทำให้เชื้อมีความทนทานต่อ ความแห้ง น้ำยาฆ่าเชื้อ แอลกอฮอล์ กรด และ ด่าง นอกจากนี้ยังทำให้ย้อมติดสีได้ยาก เมื่อทำการย้อม Gram's stain จะติดสีน้ำเงินจางๆ ไม่สม่ำเสมอ จึงต้องใช้วิธีพิเศษในการย้อมโดยใช้ความร้อนหรือสารเคมีจึงจะทำให้เชื้อย้อมติดสี เมื่อติดสีจะถูกล้างสีออกได้ยากมากถึงแม้ล้างด้วย acid alcohol เนื่องจากเชื้อทน ทั้งกรด และ แอลกอฮอล์ จะเห็นเป็นแบคทีเรียรูปแท่งพอมบาง เป็นแท่งตรงหรือโค้งเล็กน้อย ติดสีแดงของ carbol fuchsin ในพื้นสีฟ้า เรียกว่า acid fast bacilli บางครั้งอาจติดสีไม่สม่ำเสมอเป็นจุด ๆ (beaded appearance) โดยส่วนที่ติดสีเข้มเกิดจากภายในเซลล์มี inclusion body ที่มี glycogen และ polymetaphosphate ที่เรียกเป็น metachromatic granule ส่วนที่ไม่ติดเกิดจาก unstained vacuole ภายในเซลล์ (Barksdale and Kim 1977) *Mycobacterium* ส่วนใหญ่เป็นแท่งพอมบาง ขนาด 0.2-0.6 x 1-10 μ แต่อาจพบเป็น coccobacilli หรือถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวอาจยึดเป็น filament หรือ branching bacilli คล้ายเชื้อรา เชื้อไม่เคลื่อนที่ ไม่มี flagella ไม่มี capsule และไม่สร้าง spore (Wayne and Kubica 1986)

ผนังเซลล์ของ *Mycobacterium* มีหลายชั้น มีความหนาประมาณ 20 nm ประกอบด้วยไขมันในปริมาณมากกว่าร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับเชื้อ gram positive ที่มีไขมันเพียงร้อยละ 0.5 และ gram negative ที่มีไขมันร้อยละ 3 ชั้นที่อยู่ติดกับ cell membrane คือชั้นของ peptidoglycan มีโครงสร้างคล้าย cell wall ของ gram positive ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงและคงรูปอยู่ได้ โครงสร้างเป็นร่างแหประกอบด้วยของน้ำตาล 2 ชนิด คือ N-acetylglucosamine และ N-glycolylmuramic acid ถัดมาเป็นชั้นของน้ำตาล arabinogalactan ที่ทำหน้าที่ยึดระหว่างชั้นของ peptidoglycan และ ชั้นของ mycolic acid ซึ่งเป็น long chain fatty acid ที่มี carbon 60-90 atoms ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น $R-C_{88}H_{176}O_4$ และที่ผิวชั้นนอกสุดเป็นชั้นของไขมันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ glycolipid เช่น Wax D , trehalose dimycolate (cord factor) , mycoside C และ sulfolipid เช่น sulfatides นอกจากนี้ยังมีน้ำตาล lipoarabinomannan ซึ่งเป็น lipopolysaccharide ที่ยึดชั้นต่าง ๆ ของ ผนังเซลล์กับ cell membrane ด้วยความหนาของผนังเซลล์ และปริมาณไขมันที่มีมากเป็นสาเหตุให้ *Mycobacterium* ทนทานต่อน้ำยาฆ่าเชื้อ ยาปฏิชีวนะ กรด และ ด่างได้ดี แต่การที่ผนังเซลล์หนาก็ทำให้เชื้อได้รับอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ทีละน้อย ทั้งยังต้องใช้สารอาหารและพลังงานจำนวนมากในการสร้างโครงสร้างของเซลล์จึงทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ช้า (Ellner, et al. 1993, Besra and Chatterjee 1994, Thomas and Michael 1991)

2.2 ลักษณะพันธุกรรมเชื้อ *Mycobacterium* (ชัยเวช นุชประยูร, 2542)

Mycobacterium มี genome ขนาดใหญ่ประมาณ $2.2-5.5 \times 10^6$ kDa DNA มีปริมาณ G+C เฉลี่ยประมาณ 66-71 mol% สำหรับเชื้อวัณโรคมี genome ขนาดประมาณ $2.5-3 \times 10^6$ kDa DNA มีปริมาณ G+C เฉลี่ยประมาณ 65 mol% ประกอบด้วย 4.41 ล้าน base pair ส่วน *M. lepreae* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $1.3 - 2.2 \times 10^6$ kDa และมี GC content โดยประมาณ 65% และในบาง region สูงถึง 80-85% ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียอื่นๆ แต่ genome ของ NTM จะมีขนาดใหญ่กว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $3.92 - 5.5 \times 10^6$ kDa (Clark-Curtiss 1990, Levy-Febrault and Portaels 1992) ภายใน genome ของ *Mycobacterium* แต่ละ species ส่วนใหญ่จะมี repetitive DNA elements ซึ่งอาจจะเป็น DNA sequences สั้นๆ ที่มีปริมาณ G+C สูง หรือ insert sequence หรือ transposons ซึ่ง repetitive DNA บางชนิด อาจพบได้ใน *Mycobacterium* หลาย ๆ species แต่ DNA insert sequence บางชนิดพบเป็น species-specific คือ มีความจำเพาะกับ *Mycobacterium* แต่ละ species ตัวอย่างของ insert sequence ที่จำเพาะกับ *Mycobacterium* แต่ละ species ได้แก่ IS1245 พบเฉพาะใน *M. avium* และ IS6110 และ IS1081 พบเฉพาะใน *M. tuberculosis* complex IS6110 มีขนาด 1361 bp ที่ส่วนปลายประมาณ 28 bp เป็น imperfect repeat ซึ่ง *M. tuberculosis* สายพันธุ์ต่าง ๆ จะมี IS6110 5-17 copies ขณะที่ *M. bovis* จะมี IS6110 1-5 copies ทำให้มีการนำ IS6110 มาเป็น primer ในการทำ PCR เพื่อตรวจหา *M. tuberculosis* complex และใช้ศึกษา DNA finger print เพื่อเป็นการศึกษาทางระบาดวิทยาของ *M. tuberculosis* complex สายพันธุ์ต่าง ๆ (Eisenach, *et al.* 1986 , Crawford 1996)

ภายในแต่ละเซลล์ของ *Mycobacterium* เช่นเดียวกับแบคทีเรีย อื่น ๆ จะมี ribosome ขนาด 70S ประมาณ 10^3-10^4 copies ซึ่งประกอบด้วย 2 subunit ขนาด 50S และ 30S ส่วนของ 50S subunit ประกอบด้วย 23S และ 5S rRNA และส่วนของ 30S subunit ที่ทำหน้าที่ decode mRNA ในขบวนการ translation จะประกอบด้วย 16S rRNA ที่มี base sequence จำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละ species จึงเป็นประโยชน์ในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียหลายชนิด และใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียที่มี sensitivity สูง เนื่องจากมีหลาย copies เมื่อเทียบกับ chromosomal DNA (Stackebrandt and Liesack 1993, Lane, *et al.* 1985) Ribosomal RNA operon ของแบคทีเรียทุกชนิดประกอบด้วย gene ที่ควบคุม rRNA ทั้ง 16S 23S และ 5S ที่เรียงตัวเหมือนกันดังนี้ 5'-16S-23S-5S-3' โดยมี spacer regions ขึ้นระหว่าง rRNA gene (Brosius, *et al.* 1981) แต่มีจำนวนที่แตกต่างกัน rRNA gene ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีหลาย copies แต่กลุ่ม rapid-growing *Mycobacterium* พบ 10 copies และ slowly-growing *Mycobacterium* มีเพียง 1 - 2 copies (Clark-Curtiss 1990) มีการศึกษา gene sequence ของ 16S rRNA gene อย่างแพร่หลาย พบว่ามีความจำเพาะในแบคทีเรียแต่ละ species โดยที่แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ใน species เดียวกันจะมีความเหมือนกันมากกว่าร้อยละ 97 มีการรวบรวม gene sequence ของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ไว้ใน world-wide web

(<http://www.bdt.org.br/structure/molecular.html>) ต่อมามีการศึกษา gene sequence ที่อยู่ระหว่าง 16S rRNA gene และ 23S rRNA ที่เรียกว่า 16S-23S rDNA spacer พบความแตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแต่ละ species ทั้ง degree of sequence และ length variation มากกว่า 16S rRNA gene ทำให้ปัจจุบันมีการใช้ทั้ง 16S rRNA gene และ 16S-23S rDNA spacer ในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Mycobacterium* species ต่างๆ มากขึ้น (Stackebrandt and Goebel 1994, Liesack *et al.* 1990, Kempell *et al.* 1992, Suzuki *et al.* 1988, Ji *et al.* 1994, Jensen *et al.* 1993, Van der Giessen *et al.* 1994, Lappayawichit *et al.* 1996, Sansila *et al.* 1998)

Plasmid DNA หรือ Extrachromosomal DNA สามารถพบใน nontuberculosis บาง species เท่านั้น เช่น *M. avium* *M. scrofulaceum* ซึ่งพบว่า free plasmid เข้าสู่ภายใน cell ของ *Mycobacterium* ก่อนข้างยากและเมื่อเข้าสู่ภายในแล้วพบว่าไม่ integrat เข้ากับ host genome ซึ่งในแบคทีเรียอื่นๆ plasmid ทำหน้าที่เป็น vector ในการนำ foreign DNA เข้าสู่ cell

2.3 การจัดกลุ่มของ *Mycobacterium*

2.3.1 Runyon classification

Runyon ทำการจำแนกหมวดหมู่ *Mycobacterium* ออกเป็น 4 หมู่ โดยอาศัยอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะและสีของ colony ซึ่งยังเป็นที่ยอมรับอยู่ในปัจจุบัน (Runyon 1959) ได้แก่

Runyon Group I - Photochromogens: เป็นกลุ่มของเชื้อที่เจริญช้าให้ colony บน solid media นานกว่า 7 วัน colony ไม่มีสีเมื่อบ่มเชื้อในที่มืด แต่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือสีส้มเมื่อถูกแสงสว่าง เนื่องจาก enzyme ที่ทำให้เชื้อสร้าง carotenoid pigment เป็น oxygen dependent photoinducible enzyme ได้แก่ *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. marinum* และ *M. asiaticum* เป็นต้น

Runyon Group II - Scotochromogens: เป็นเชื้อที่เจริญช้าให้ colony บน solid media นานกว่า 7 วัน สร้าง carotenoid pigment โดยไม่เกี่ยวข้องกับแสงสว่าง ให้ colony เป็นสีเหลืองหรือสีส้ม เมื่อบ่มเชื้อในที่มืด สีอาจเข้มขึ้นเมื่อถูกแสงสว่าง ได้แก่ *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* และ *M. szulgai* เป็นต้น

Runyon Group III – Non-photochromogens: เป็นเชื้อที่เจริญช้าให้ colony บน solid media นานกว่า 7 วัน ไม่สร้าง carotenoid pigment ให้ colony เป็นสีขาวหรือสีครีมทั้งในที่มืด และเมื่อถูกแสงสว่าง ได้แก่ *M. avium* complex, *M. terrae* complex, *M. celatum*, *M. ulcerans* และ *M. xenopi** (สร้าง pigment สีเหลือง ช่วงแรกเท่านั้น)

Runyon Group IV – Rapid grower: เป็นเชื้อที่เจริญเร็ว ให้ colony บน solid media ภายใน 3-7 วัน มีทั้งชนิดที่สร้างและไม่สร้าง carotenoid pigment ได้แก่ *M. chelonae* และ *M. fortuitum*

2.3.2 Numerical taxonomy

เมื่อพบว่า *Mycobacterium* บาง species มีทั้งสายพันธุ์ที่สร้างและไม่สร้างสี นักวิจัยหลายกลุ่มทำการปรับปรุงวิธีการจัดหมวดหมู่ของเชื้อใน genus *Mycobacterium* ใหม่ โดยใช้ Adansonian classification scheme หรือ numerical taxonomy อาศัยคุณสมบัติต่าง ๆ อย่างน้อย 50 อย่าง ได้แก่ morphology, physiological properties และ การทดสอบชีวเคมี จากนั้นก็นำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Matching coefficient) ซึ่งจากการศึกษาของ Tsukamura พบกลุ่มของ *Mycobacterium* species ที่มีความคล้ายคลึงกันมาก ได้แก่ กลุ่มของ *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* และ *M. microti*; กลุ่มของ *M. avium*, *M. intracellare*, *M. scrofulaceum* และ *M. asiaticum*; และกลุ่มของ *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. novum* และ *M. triviale* จึงจัดเชื้อเหล่านี้ไว้ในกลุ่มเดียวกัน เรียกเป็น *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex; และ *M. nonchromogenicum* complex ตามลำดับ (Tsukamura 1976, Tsukamura, et al. 1979, Wayne 1967, Wayne 1982, Kubica, et al. 1972, Kubica, et al. 1973) เมื่อมีการศึกษาทาง molecular biology ของเชื้อ *Mycobacterium* ก็อาศัยความเหมือนและความแตกต่างของ 16s rRNA gene เป็นส่วนหนึ่งในการจัดหมวดหมู่ของ *Mycobacterium* พบว่า species ต่าง ๆ ของ *Mycobacterium* มีความเหมือนกันมาก ขณะเดียวกันก็แตกต่างจากแบคทีเรียใน genus อื่น ๆ อย่างมาก และมีความสัมพันธ์กับการจัดหมวดหมู่โดยวิธี numerical taxonomy ยกเว้น *M. kansasii* และ *M. gastri* ซึ่งแยกจากกันโดย numerical taxonomy แต่มี 16s ribosomal RNA gene เหมือนกัน (Stahl and Urbance 1990, Rogall, et al. 1990) เชื้อ *Mycobacterium* 71 species ที่พบในปัจจุบัน แสดงในตารางที่ 1

2.4 โรคที่เกิดจากเชื้อ *Mycobacterium*

2.4.1 วัณโรค

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่มีมาตั้งแต่สมัยโบราณ สามารถแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุจากเสมหะของผู้ป่วยได้เป็นครั้งแรก ในปี พ.ศ. 2425 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวปรัสเซียชื่อ Robert Koch เรียกว่า *Bacterium tuberculosis* ต่อมา Lehmann และ Neumann ตั้งชื่อใหม่เป็น *Mycobacterium tuberculosis* (Major 1959, Koch 1882, Lehmann and Neumann 1896) เชื้อที่ก่อให้เกิดวัณโรคเรียกว่า *Mycobacterium tuberculosis* complex ประกอบด้วยเชื้อที่มี DNA sequence คล้าย ๆ กัน 4 ชนิด (Eisenach, et al. 1986) ร้อยละ 99 ของวัณโรคเกิดจาก *M. tuberculosis* รองลงมา คือ *M. bovis* ที่ก่อให้เกิดโรคในวัวควายและติดต่อถึงคนได้ และ *Mycobacterium africanum* ที่พบก่อให้เกิดวัณโรคในคนเฉพาะในทวีปแอฟริกา และ *M. microti* ที่พบก่อให้เกิดโรคในคนน้อยมาก มักก่อให้เกิดวัณโรคในสัตว์กักตุน (Ellner, et al. 1993, Karison and Lessel 1970, Castet, et al. 1969, Redd 1957)

ตารางที่ 1. *Mycobacterium* species

Pathogenic			Non-pathogenic		
Slow growers		Rapid	Slow growers		Rapid growers
<i>M. africanum</i>	<i>M. leprarmurium</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. methyllovorum</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. aichense</i>	<i>M. moriokaense</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. alvei</i>	<i>M. neoaurum</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. abuense</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. pocinum</i>	<i>M. nochromogenicum</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. parafortuitum</i>
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. brumae</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. genavence</i>	<i>M. shimoidei</i>		<i>M. triviale</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. poriferae</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. simiae</i>			<i>M. chubuense</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. interjectum</i>	<i>M. szulgai</i>			<i>M. confluentis</i>	<i>M. rhodesiae</i>
<i>M. intermedium</i>	<i>M. tuberculosis</i>			<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. shanghaiense</i>
<i>M. intracelulare</i>	<i>M. ulceans</i>			<i>M. duvalii</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. xenopi</i>			<i>M. fallax</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. leprae</i>				<i>M. flavescens</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
				<i>M. gadium</i>	<i>M. tokaiense</i>
				<i>M. gilvum</i>	<i>M. vaccae</i>
				<i>M. komossense</i>	<i>M. yunnanense</i>
				<i>M. madagascariense</i>	

(Shinnick and Good 1994)

วัณโรคมีแหล่งแพร่เชื้อในคนหรือสัตว์ที่เป็นโรค เชื้อเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง ที่พบบ่อยที่สุดเกิดจากการหายใจเอาเชื้อวัณโรคที่อยู่ในละอองน้ำในอากาศ (aerosol) ขนาด 1-10 μ ที่เกิดจากการไอหรือจามของผู้ป่วยเข้าสู่ถุงลมปอด เสมหะของผู้ป่วยเป็นแหล่งแพร่เชื้อสำคัญเนื่องจากในเสมหะที่ย้อมพบ acid fast bacilli จะมีเชื้อถึง 5,000 ตัว/ml (Rouillon, et al. 1976) ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อที่ตำแหน่งอื่นมักไม่ติดต่อสู่ผู้อื่น วิธีที่อาจทำให้ติดเชื้อวัณโรคแต่ไม่พบบ่อยในปัจจุบันได้แก่ กินนมหรืออาหารนมที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ เข้าทางทางผิวหนังที่มีบาดแผล หรือโดยการปลูกถ่ายอวัยวะ (Grange 1996) การเกิดพยาธิสภาพของวัณโรคแบ่งเป็น 2 ระยะ (ปานเทพ สุทธินนท์ 2542) ได้แก่

1. Primary pulmonary tuberculosis

เมื่อเชื้อเข้าสู่ถุงลมปอดจะถูกจับกินโดย activated alveolar macrophage ที่ถูกกระตุ้นโดยธรรมชาติจากสารอื่นและฝุ่นละออง ทำให้เชื้อส่วนใหญ่ถูกทำลายภายในสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ มักและไม่ทำให้เกิดรอยโรค แต่ถ้าไม่มี activated macrophage เชื้อที่มี virulence factor เช่น cord

factor, sulfatides และ acidic lipid อื่น ๆ จะสามารถทนทานต่อการถูกจับกิน และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage จนทำให้ macrophage แตก เชื้อวัณโรคที่หลุดออกมาจะไปกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ monocyte จากกระแสเลือดมาที่บริเวณติดเชื้อ และเปลี่ยนเป็น macrophage เข้าจับกินเชื้อ แต่เนื่องจากไม่ใช่ activated macrophage จึงไม่สามารถทำลายเชื้อ macrophage ที่มีเชื้อจะรวมกลุ่ม และเปลี่ยนรูปเป็น epithelioid cell และ multinucleated giant cell เรียกว่ารอยโรคที่เกิดขึ้นว่า Ghon's complex เชื้อจะอาศัย macrophage แพร่ไปตามท่อน้ำเหลืองไปยังต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณซั้วปอด (simmon foci) และก่อให้เกิดรอยโรคที่ต่อมน้ำเหลืองที่มีขนาดใหญ่กว่าที่บริเวณเนื้อปอด อาจมีการแพร่จากต่อมน้ำเหลืองเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ เยื่อหุ้มสมอง ไต กระดูก และ ปอด เชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนใน macrophage โดยไม่ถูกทำลายเป็นเวลา 3-8 สัปดาห์ จนกระทั่งมีการตอบสนองของร่างกายโดย cellular immune response (CMIR) ทำให้เกิด cellular immunity (CMI) จะเกิดการสะสมของ T-lymphocyte ที่เปลี่ยน macrophage โดยรอบบริเวณรอยโรคเป็น activated macrophage ที่สามารถจับและทำลายเชื้อที่อยู่รอบนอกได้ และควบคุมเชื้อที่อยู่ภายในไม่ให้เพิ่มจำนวน ขณะเดียวกันก็มีการกระตุ้นให้เกิด delayed-type hypersensitivity (DTH) ซึ่งทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ เกิดเป็น caseous necrosis ที่ตรงกลางรอยโรค และอาจมี fibrosis ล้อมรอบ แต่ถ้าเชื้อมีปริมาณมาก หรือ ที่รอยโรคมี tuberculin-like product มาก hydrolytic enzyme ของ macrophage จะ liquefy caseous necrosis จะทำให้การทำลายของเนื้อเยื่อมากขึ้น และบริเวณเนื้อตายที่ถูกละลายดังกล่าวจะมีสารอาหารในปริมาณมาก เชื้อจะเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และกระตุ้นให้เกิด DTH มากขึ้น มีการทำลายเนื้อเยื่อได้เป็นบริเวณกว้างขึ้น ในที่สุดจะเกิดโพรงแผล (cavity) ขึ้น ที่มีเชื้อมากมาย อาจแพร่ไปยังบริเวณอื่น หรือแพร่สู่ผู้อื่นได้ ตามปกติถ้าผู้ป่วยมีการตอบสนองโดย cellular immune response (CMIR) เป็นปกติ primary pulmonary tuberculosis จะถูกควบคุมได้ในที่สุด แต่ยังคงมีเชื้อหลงเหลืออยู่ภายในรอยโรค บางรายที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ในเด็กเล็ก หญิงมีครรภ์ ผู้ป่วยเบาหวาน และขาดอาหาร จะเกิดอาการของโรคลุกลามแบบ progressive primary tuberculosis ไปยังเนื้อปอดข้างเคียง หรือแพร่สู่หลอดลมทำให้เกิด bronchopneumonia หรือ caseous necrosis ที่ทำให้หลอดลมเกิดเป็นโพรงแผล หรือแพร่เข้าสู่กระแสเลือด ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะอื่น ๆ เช่น ตับ ม้าม ไต กระดูก และ สมอง อาจเกิดเป็น miliary tuberculosis หรือ disseminated tuberculosis

2. Post-primary tuberculosis

ส่วนใหญ่มักเกิดจากการกำเริบของเชื้อที่เป็น endogenous source ที่เคยสงบนิ่ง เรียกว่า reactivation infection จะเกิดเมื่อร่างกายอ่อนแอและภูมิต้านทานลดต่ำลง เนื่องจาก สูงอายุ ติดสุรา เบาหวาน ได้รับการรักษาด้วย steroid หรือยากดภูมิคุ้มกัน ผ่าตัดกระเพาะอาหาร เป็นมะเร็ง หรือทำงานหนักและไม่ได้รับการพักผ่อนเพียงพอ เป็นต้น ทำให้เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้น แต่อาจเกิดจากรับเชื้อใหม่ เรียกว่า reinfection Post-primary tuberculosis จะเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อลุกลาม เนื่อง

จากการตอบสนองของ CMIR ทั้ง CMI และ DTH ทำให้มีการอักเสบทำลายของเนื้อปอดรุนแรง แบบ caseous necrosis และ cavity ที่ลุกลามออกไปซ้ำ เมื่อเชื้อลุกลามเข้ากระแสโลหิตจะเกิด extrapulmonary tuberculosis โดยก่อให้เกิดการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมอง ไข กระดูกสันหลัง หรือ เกิดเป็น miliary tuberculosis (disseminated tuberculosis) คือ มีรอยโรคทั่วร่างกาย ในคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เมื่อได้รับเชื้อวัณโรคจะก่อให้เกิดอาการของวัณโรคเพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ในจำนวนนี้ครึ่งหนึ่งมักแสดงอาการของโรคในภายหลังระยะเวลา 1-2 ปี เมื่อร่างกายอ่อนแอลง วัณโรคพบมากในผู้ที่มีฐานะยากจนที่อยู่รวมกันอย่างหนาแน่นที่มีสุขอนามัยที่ไม่เหมาะสม อัตราเสี่ยงจะสูงขึ้นถ้าคนในครอบครัวหรือคนในระแวกใกล้เคียงเป็นวัณโรค พบในคนที่อยู่รวมกันหนาแน่น เช่น ในคุกและค่ายผู้อพยพ โดยเฉพาะเมื่อผู้อพยพมาจากแหล่งที่มีการแพร่ระบาดของวัณโรคสูง พบในผู้ป่วยชายสูงกว่าในผู้หญิง โดยเฉพาะในกลุ่มที่สูบบุหรี่และดื่มเหล้า (Daley, *et al.* 1992, Capewell, *et al.* 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราเสี่ยงในการติดเชื้อวัณโรคขึ้นกับอาชีพ เช่น ทำเหมือง โรงงานที่มีฝุ่นฟุ้งกระจาย รวมทั้งบุคลากรทางการแพทย์ที่ทำหน้าที่ดูแลผู้ป่วยซึ่งสามารถลดอัตราการเสี่ยงลงได้มากถ้าปฏิบัติตามหลักการรักษาความปลอดภัยในสถานพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการ (Collins 1993) แต่กลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อวัณโรคสูงที่สุดคือ คนที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (immunocompromised host) ได้แก่ เด็กแรกเกิดและเด็กเล็ก คนชรา คนที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันในกรณีของผู้ปลูกถ่ายอวัยวะ คนไข้ไตวาย ผู้ป่วยมะเร็ง และมีรายงานว่า การใช้ steroid จะทำให้เกิด reactivation tuberculosis แต่กลุ่มผู้ป่วยที่พบมีอัตราการติดเชื้อสูงสุด คือ ผู้ป่วยเอดส์ในปัจจุบันกลุ่มที่พบติดเชื้อวัณโรคสูงเป็นกลุ่มคนทำงานอายุประมาณ 15-45 ปี ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเอดส์สูง (ปานเทพ สุทธิพันธ์ 2542)

2.4.2 การติดเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria

โรคติดเชื้อจาก *Mycobacterium* อื่นที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค เรียกว่า mycobacteriosis ซึ่งก่อโรคได้ทั้งที่ปอด ต่อมน้ำเหลือง ผิวหนัง soft tissue กระดูก เอ็น และแบบแพร่กระจายทั่วร่างกาย ในระยะแรกที่มีรายงานการติดเชื้อ NTM มักก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ปอด ซึ่งจะพบในผู้ป่วยสูงอายุที่มีความผิดปกติที่หลอดลมหรือปอดรวมทั้งผู้ที่เคยติดเชื้อวัณโรค แต่ในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันระบบ CMIR บกพร่องมักพบเป็นการติดเชื้อแบบ disseminated mycobacteriosis โดยพบว่าถึงแม้อาการของ mycobacteriosis เมื่อมีการติดเชื้อที่ปอดจะเหมือนกับอาการของวัณโรค แต่มักไม่มีการติดต่อจากผู้อื่นไปยังอีกผู้หนึ่งโดยตรงคล้ายวัณโรค ผู้ป่วยน่าจะได้รับเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำประปา อาจพบเชื้อ *M. kansasii* และแหล่งน้ำธรรมชาติอาจพบเชื้อ *M. avium* แล้วก่อให้เกิด colonization ที่ลำคอหรือหลอดลมซึ่งจะไม่ก่อโรคเลย ยกเว้นเมื่อความต้านทานของร่างกายลดต่ำลง ดังนั้นการที่แยกเชื้อจากเสมหะของผู้ป่วยยังไม่อาจชี้ได้ว่ามีการติดเชื้ออาจเป็นเพียง colonization (Edwards and Palmer 1959) ในการสำรวจที่สหรัฐอเมริกาซึ่งเป็นแหล่งที่พบอุบัติการณ์ของโรค mycobacteriosis สูงมากว่าที่อื่นๆ พบว่า *M. avium* และ *M. kansasii* ที่แยกได้จากเสมหะ เป็นสาเหตุของโรคเพียงร้อยละ 47 และ

75 เท่านั้น(O'Brien, *et al.* 1987) หลักการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อ NTM ที่ปอดได้แก่ แสดงอาการของโรค ตรวจพบเงาผิดปกติบน X-ray ปอด เพาะเชื้อ พบเชื้อในเสมหะ 3 ครั้ง หรือ 2 ครั้ง ร่วมกับการข้อม หรือเมื่อเพาะพบเชื้อมากกว่า 2+ โดยไม่พบเชื้อวัณโรคหรือเชื้อก่อโรคอื่น ๆ และเมื่อตรวจพยาธิสภาพที่รอยโรค พบ granuloma ที่เมื่อนำมาข้อม หรือ เพาะจะต้องพบเชื้อ (American Thoracic Society 1997) NTM ที่พบก่อโรคในคนแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. Nontuberculous mycobacteria ที่ทำให้เกิดโรคในคน

Disease	Common species		Unusual species	
	Slow growers	Rapid growers	Slow growers	Rapid growers
Pulmonary	<i>M. avium</i> complex <i>M. kansasii</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. celatum</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimoidei</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. smegmatis</i>
Lymphadenitis	<i>M. avium</i> complex <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. malmoense</i>		<i>M. kansasii</i> <i>M. haemophilum</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>
Cutaneous Disease	<i>M. marinum</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i>	<i>M. avium</i> complex <i>M. kansasii</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. smegmatis</i>
Disseminated Disease	<i>M. avium</i> complex <i>M. kansasii</i> <i>M. haemophilum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. simiae</i> <i>M. marinum</i> <i>M. genavence</i> <i>M. conspicuum</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. fortuitum</i>

(Kent and Kubica 1985)

2.5 การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *Mycobacterium*

ในการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อวัณโรคจะวินิจฉัยจากอาการทางคลินิก เช่น มีไข้ต่ำ ๆ ตอนเย็น ถึงค่ำ และนอนไม่หลับ มีเหงื่อออกกลางคืนมาก ไอแห้ง ๆ ในตอนเช้า ต่อมาจะถี่ขึ้นและมีเสมหะมาก เหม็นเป็นสีเหลืองหรือเขียว อาจมีเลือดปน และเจ็บหน้าอก อ่อนเพลียไม่มีแรงทำงาน เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ผิวซีดเหลือง ซีฟจรเต้นเร็ว อาจมีการกระอักเป็นเลือด หรืออานเจียนเป็นเลือด ดับม้ามโต ต่อมน้ำเหลืองโต เนื่องจากพยาธิสภาพของวัณโรคและ pulmonary mycobacteriosis จาก NTM ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ปอด การฉาย X-ray ปอดจึงสามารถใช้ประกอบการวินิจฉัยได้และมีความไวสูงมาก แต่

ภาพ X-ray ของการติดเชื้อวัณโรค หรือ NTM ไม่มีลักษณะจำเพาะ และไม่สามารถบอกว่าอยู่ในระยะลุกลามหรือไม่ การทดสอบ tuberculin skin test ที่ตรวจการตอบสนองของผู้ป่วยแบบ delayed type hypersensitivity ก็เป็นอีกวิธีที่สามารถตรวจการติดเชื้อวัณโรค โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยมีอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ วิธีที่นิยมคือ Mantoux test ที่ฉีด purified protein derivative ได้ผิวหนังจะเกิดตุ่มนูนแดงขนาดใหญ่กว่า 10 mm ภายใน 72 ชั่วโมง แต่อาจให้ผลบวกได้จากการฉีดวัคซีน BCG ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยมีการฉีดวัคซีน BCG ก่อนเข้าโรงเรียนแล้ว นอกจากนี้ยังอาจให้ผลลบในคนที่มีการหนักติดเชื้อไวรัสบางชนิดได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือขาดอาหาร แต่การตรวจที่เชื่อถือได้ที่จะต้องมีการพบเชื้อโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วยจึงจะให้ผลถูกต้องที่สุด (Robert, et al. 1991)

2.5.1 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการจะแสดงให้เห็นว่ามีเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยและสามารถช่วยในการยืนยันการติดเชื้อ *Mycobacterium* ทั้งยังสามารถแยกวินิจฉัย *Mycobacterium* species ต่างๆ ที่นิยมใช้มานานหลายปี วิธีการตรวจแบ่งเป็น 2 วิธี คือการย้อมโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจและการเพาะเชื้อ ดังนั้นในการจะตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อทางห้องปฏิบัติการได้อย่างถูกต้องต้องขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการดังต่อไปนี้

2.5.1.1 การเก็บสิ่งส่งตรวจ

เสมหะเป็นสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจที่มีการนำส่งเพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคและ *Mycobacterium* อื่นๆ ได้บ่อยที่สุด ควรเก็บใส่ภาชนะสะอาดหรือปราศจากเชื้อ โดยเก็บในตอนเช้า ให้ผู้ป่วยบ้วนปาก หรือแปรงฟันก่อน ถ้าเก็บติดต่อกัน 3 วันจะเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อถึงร้อยละ 95 หากไม่สามารถตรวจหาเชื้อทางห้องปฏิบัติการให้เก็บที่ 4°C ได้ 3 วันเพื่อทำการเพาะเชื้อหรือ 14 วันเพื่อทำการย้อม direct examination เสมหะมักจะมีการปนเปื้อนจาก normal flora ในช่องปากดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการ decontamination ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ สิ่งส่งตรวจอื่นๆ ได้แก่ CSF, pleural fluid, pus, urine, tissue biopsy และเลือด การตรวจหาเชื้อในเลือดเป็นประโยชน์ในการตรวจหาการติดเชื้อแบบกระจายทั่วตัว (disseminated infection) ควรเก็บเลือด 5-20 ml ใส่ขวด hemoculture ที่มี broth media สำหรับเพาะเชื้อวัณโรค ในอัตราส่วน 1:5-1:10 ไม่ต้องเก็บที่ 4°C ให้เก็บที่อุณหภูมิห้องและไม่ต้องทำการ decontamination ก่อนนำไปทำการเพาะเชื้อ (Kent and Kubica 1985)

2.5.1.2 การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ

วิธีการย้อมเพื่อหาเชื้อ *Mycobacterium* โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจที่นิยมมี 2 วิธี คือ Ziehl-Neelsen และ modify Kinyoun carbol fuchsin เป็นการย้อมโดยอาศัยคุณสมบัติการทนกรดของเชื้อ *Mycobacterium* ที่เมื่อย้อมติดสี fuchsin จะไม่สามารถล้างออกด้วย acid alcohol แต่มีข้อ

จำกัดของการย้อมสี ก็จะย้อมพบเชื้อเมื่อมีเชื้ออยู่ 5,000-10,000 bacteria/ml ซึ่งจะมี sensitivity ในการตรวจพบเชื้อมากขึ้นเมื่อทำ concentration ก่อน (Mierner, *et al.* 1994) นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกวินิจฉัย species ของเชื้อ มีวิธีการย้อมเพื่อหาเชื้อ *Mycobacterium* โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจอีกวิธี โดยใช้ fluorochrome เช่น auramine-O หรือ rhodamine และทำการล้างออกด้วย 1% acid alcohol เชื้อ acid fast bacilli จะเรืองแสงและสังเกตได้ง่ายจึงสามารถตรวจโดยใช้กำลังขยาย 450 เท่า จะมีความไวสูงขึ้นเล็กน้อยแต่ก็มีข้อจำกัดเช่นเดียวกับการใช้สี fuchsin และต้องตรวจดูภายใน 24 ชม. (Smithwick 1976) ข้อดีของการย้อมหาเชื้อคือ ง่าย รวดเร็ว สามารถช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรคได้ดีเมื่อผู้ป่วยมีอาการ และ ช่วยประเมินผลการรักษา

2.5.1.3 การเพาะเชื้อ

วิธีการเพาะเชื้อเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและมีความไวสูงกว่าการย้อม สามารถเพาะเชื้อที่มีปริมาณเพียง 10-100 organisms/sample จึงตรวจหาเชื้อได้ในกรณีที่มีปริมาณน้อย จึงย้อมไม่พบ และส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับการย้อมพบเชื้อ ยกเว้นในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับการรักษามาก่อน นอกจากนี้ยังสามารถนำเชื้อที่แยกได้ไปแยกวินิจฉัย species แต่อาจใช้เวลานาน 1-8 สัปดาห์ ก่อนเชื้อจะเจริญเป็น colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำเป็นต้องทำการ decontamination ก่อนหากสิ่งส่งตรวจปนเปื้อนเชื้ออื่น ๆ ในปริมาณมาก

I. อาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะหาเชื้อ *Mycobacterium* ต้องอาศัย enriched media ที่ปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ทั้งที่เป็น solid และ liquid media และมีส่วนผสมหลักเป็น egg-potato base หรือ serum (albumin) agar base media อาหารเลี้ยงเชื้อ *Mycobacterium* ที่ดีต้องมีคุณสมบัติดังนี้ สามารถเพาะเชื้อ *Mycobacterium* ให้เจริญได้ตัวอย่างรวดเร็วถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย สามารถตรวจหาลักษณะ colony เพื่อช่วยในการแยกวินิจฉัยเชื้อ ยับยั้ง contaminant อื่น ๆ เติบโตได้ง่าย และสามารถใช้ทดสอบ sensitivity test ได้ (Kent and Kubica 1985) culture media ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

- (1) Egg-based medium เป็นอาหารที่เติมไข่แดงเนื่องจากเชื้อต้องการไขมันในปริมาณมาก ได้แก่ Löwenstein-Jensen medium และ Ogawa medium
- (2) Agar-based medium เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารอาหารครบโดยไม่ต้องใช้อาหารจากไข่แดง และทำให้แข็งตัวโดยเติม agar ข้อดี คือ มีสารอาหารคงที่ media ใส สามารถสังเกตลักษณะ colony ได้ง่าย เหมาะกับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ได้แก่ Middlebrook 7H10 และ 7H11
- (3) Liquid Medium เป็นอาหารเหลวที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่า แต่ถ้าเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจมักทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย และไม่เห็นลักษณะ colony เหมาะสำหรับทำ stock เชื้อ และเตรียม inoculum สำหรับทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ได้แก่ Middlebrook 7H9 medium

II. วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อน

สิ่งส่งตรวจเช่นเสมหะมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นในปริมาณมากอาจเจริญกลุ่มเชื้อวัณโรคที่ขึ้นได้ช้ากว่า ทำให้การเพาะเชื้อไม่ได้ผลจึงต้องทำการเตรียมเสมหะก่อนเพื่อกำจัดเชื้ออื่น ย่อยเสมหะให้เป็นของเหลวและทำให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอก่อนที่จะนำไปปั่นให้ตกตะกอน เพื่อนำเชื้อในตะกอนที่มีปริมาณเชื้อมากขึ้น ไปใช้ในการเพาะเชื้อหรือการย้อมเชื้อ วิธีที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อน ได้แก่ N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide ที่ใช้ N-acetyl-L-cysteine ย่อยเสมหะ และใช้ 2% NaOH กำจัดเชื้อปนเปื้อน (Kent and Kubica 1985)

III. Incubation Conditions

Mycobacterium ส่วนใหญ่เป็น obligate aerobic bacteria แต่เชื้อเจริญได้ดีขึ้นเมื่อมี carbon dioxide ร้อยละ 5-10 เชื้อก่อโรคส่วนใหญ่เจริญที่อุณหภูมิ 35-37°C แต่มีเชื้อบางชนิดที่มักพบก่อให้เกิดโรคที่ผิวหนัง เช่น *M. marinum*, *M. ulcerans* และ *M. haemophilum* จะเจริญได้ดีที่ 25-33°C และ *M. avium* และ *M. xenopi* จะเจริญได้ดีที่ 40-42°C pH ที่เหมาะสมในการเพาะเชื้อ *Mycobacterium* แตกต่างกันแต่ละ species อยู่ระหว่าง 6-7.6

ควรตรวจดูการเจริญของเชื้อภายใน 3-5 วัน เพื่อหาเชื้อกลุ่ม rapid grower และการปนเปื้อน จากนั้นตรวจการเจริญของเชื้อทุกสัปดาห์ไปจนครบ 8 สัปดาห์ slow grower ส่วนใหญ่จะให้ mature colony ภายใน 4-6 สัปดาห์ ซึ่งทำให้การเพาะแยกเชื้อไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากต้องใช้เวลาานานมาก ยุ่งยาก และมีขั้นตอนมาก (Kent and Kubica 1985)

2.5.1.4 Rapid detection

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำเร็จรูปที่เติม antibiotic หลายชนิดเพื่อยับยั้งการปนเปื้อน และมีวิธีการตรวจวัดการเจริญของเชื้อทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้อย่างรวดเร็ว antibiotic ที่เติมเพื่อการปนเปื้อนเรียกว่า PANTA ได้แก่ polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim และ azlocillin วิธีการตรวจวัดการเจริญของเชื้อมีหลายวิธี นับตั้งแต่รุ่นแรกที่ใช้ radiometric method ของ BACTEC 12B ที่ใช้ Middlebrook 12B broth media ซึ่งมี palmitic acid ที่ labeled ด้วย radioactive ^{14}C จึงสามารถวัด $^{14}\text{CO}_2$ ที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้อาจเพาะเชื้อในขวดที่เติมสาร *p*-nitro- α -acetylamino- β -propiophenone (NAP) ควบคุมไปด้วย โดยที่ *M. tuberculosis* จะเจริญได้เฉพาะในขวดที่ไม่มี NAP เท่านั้น ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้ nonradiometric method โดยนำสาร fluorophore ที่เป็น oxygen sensor เข้ามาใช้แทน เมื่อมีการเจริญของเชื้อจะใช้ oxygen ทำให้ สาร fluorophore เรืองแสงได้แสง UV light ได้แก่ MGIT เป็นต้น (Cornfield, et al. 1997, Pfyffer, et al. 1997) นอกจากนี้ยังมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น biphasic media ที่มีทั้ง liquid media และ solid media โดยทำการเพาะเชื้อบน Middlebrook 7H9 ที่เติม antibiotic ในขวดด้านหนึ่ง ที่ต่อกับขวดที่มี

solid media Middlebrook 7H11 media ด้านหนึ่ง และ อีกด้านหนึ่ง ครึ่งหนึ่งเป็น Middlebrook 7H11 media ที่เติม NAP และ chocolate agar สามารถ subculture เชื้อบน solid media โดยกลับขวดให้ broth ไหลท่วม solid media สัปดาห์ละ 4 ครั้ง จะทำให้ตรวจหาเชื้อได้เร็วและเห็นลักษณะ colony เรียกวิธีนี้ว่า Septic check AFB System (Isenberg, *et al.* 1991)

2.5.1.5 การแยกวินิจฉัยเชื้อ

เชื้อ *Mycobacterium* มีทั้ง species ที่ก่อให้เกิดโรคได้บ่อยและ species ที่ปกติเป็นเพียง colonization โดยไม่ก่อให้เกิดโรคดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องแยก species ของเชื้อให้ถูกต้อง และยังเป็นข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาซึ่งนำไปสู่การป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป คุณสมบัติที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อได้แก่

- i. Growth rate ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อเป็น 2 กลุ่ม
 - A. Rapid grower: พบเชื้อใน 7 วัน
 - B. Slow grower: พบเชื้อในเวลามากกว่า 7 วัน
- ii. Colony morphology ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะ colony เป็น 3 กลุ่ม
 - Rough colony (R): colony หยาบ
 - Smooth (S): colony เรียบ
 - Dome (D): colony นูนคล้ายโดม
- iii. Pigment production ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะ colony เป็น 3 กลุ่ม
 - Photochromogens : colony ไม่มีสีในที่มืด แต่เมื่อถูกแสง 1 ชม.แล้วเก็บในที่มืดต่อจะมีสีเหลืองหรือส้ม
 - Scotochromogens: colony มีสีเหลืองหรือส้มทั้งในที่มืดและเมื่อถูกแสง
 - Nonphotochromogens: colony ไม่มีสีทั้งในที่มืดและเมื่อถูกแสง
- iv. Biochemical test : การทดสอบที่ใช้ในการแยกวินิจฉัยเชื้อแต่ละกลุ่มมีดังนี้
 - A. Rapid growers: ทดสอบ 3-day arylsulfatase test, growth on MacConkey ที่ 28°C, NaCl tolerance test ที่ 28°C, nitrate reduction test, iron uptake ที่ 28°C, citrate utilization ที่ 28°C, mannitol utilization ที่ 28°C, Inositol utilization ที่ 28°C ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3. การวินิจฉัยเชื้อ rapid growers ที่พบบ่อย

SPECIES (subspecies)	Colony Morphology	Growth Temp (°C)	Pigment	Arylsulfatase	Carbon Source			Iron Uptake	Nitrate Reduction	Growth on	
					Sodium citrate	Inositol	Mannitol			MacConkey	5% NaCl
<i>M. fortuitum</i>	S(87) R(13)	22-40	N	+	-	-	-	+	+	+	+
				(97)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(96)	(75)
<i>M. fortuitum</i> 3rd biovar complex	S	22-37	N	+	-	+	+	+	+	+	+
				(97)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(96)	(75)
<i>M. fortuitum</i> biovar <i>peregrinum</i>	S	22-37	N	+	-	-	+	+	+	+	+
				(97)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(96)	(75)
<i>M. chelonae</i>	S (60) R(40)	22-35	N	+	+	-	-	-	-	+	-
				(97)	(99)	(99)	(99)	(98)	(99)	(96)	(99)
<i>M. abscessus</i>	S (60) R(40)	22-40	N	+	-	-	-	-	-	+	+
				(99)	(99)	(99)	(99)	(98)	(99)	(96)	(90)
<i>M. fallax</i>	R	30-37	N	-	-	-	-	-	+	-	-
				(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)	(99)
Other rapid growers	S R	17-52	N(58) S (38) P (4)	-	-	+	+	-	-	+	-
				(72)	(70)	(59)	(60)	(56)	(51)	(52)	(52)

(Kent and Kubica 1985) Other rapid growers : *M. agri* , *M. aichiense*, *M. aurum*, *M. austroafricanum*, *M. chitae*, *M. chubuense*, *M. diernhoferi*, *M. duvalii*, *M. fallax*, *M. gadium*, *M. gilvum*, *M. komossense*, *M. neoaurum*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. phlei*, *M. pulveris*, *M. rhodesiae*, *M. smegmatis*, *M. sphagni*, *M. thermoresistibile*, *M. tokaiense*, *M. vaccae*

B. Slow grower:

Photochromogens : ทดสอบ 2-week arylsulfatase test, nitrate reduction test, semiquantitative catalase test, tween hydrolysis test, niacin test, 4-day pyrazinaminidase test, urease test ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 4.

Scotochromogens : ทดสอบ 2 week-arylsulfatase test, nitrate reduction test, catalase test, tween hydrolysis test, tween opacity test, urease test, NaCl tolerance test ที่ 28°C, niacin test และ photoactive pigment ที่ 25°C ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4. การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing photochromogens ที่พบบ่อย

SPECIES (subspecies)	Colony	Growth Temp (°C)	Growth Rate	Pigment	Arylsulfatase 2 wk	Catalase		Niacin	Nitrate Reduction	Pyrazinamidase	Growth on 5%	Tween Hydrolysis	Urease
						Semiquantitati	Heat Stable						
<i>M. kansasii</i>	S	25-40	S(98)	P(99)	+	+	+	-	+	4d -(99)	-	+	+
	R		R(2)	S(1)									
<i>M. marinum</i>	S	25-35	R(61)	P	+	-	-	-	-	+	-	+	+
			S(39)	(99)									
<i>M. asiaticum</i>	S	33-37	S	P	-	+	+	-	-		-	+	-
			(99)	(99)	(67)	(91)	(91)	(99)	(99)		(99)	(91)	(99)
<i>M. simiae</i>	S	22-37	S	P(91)	-		+	+	-	+	-	-	+
				N(9)	(84)		(95)	(85)	(85)		(99)	(85)	(64)
<i>M. avium- Intracelulare</i>	S	25-45	S	N(85)	+	-	+	-	-	4d+(85)	-	-	+
	R		(99)	S (12)									
				P (3)									

(Kent and Kubica 1985)

ตารางที่ 5. การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing scotochromogens ที่พบบ่อย

SPECIES (subspecies)	Colony Morphology	Growth Temp (°C)	Growth Rate	Pigment	Photoactive pigment	Arylsulfatase 2 week	Catalase		Niacin	Nitrate Reduction	Growth on 5% NaCl	Tween Hydrolysis	Tween Opacity 1 wk	Urease
							Semiquantitative	Heat Stable						
<i>M. scrofulaceum</i>	S	22-37	S(95)	S(97)	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
	R		R(5)	P(3)										
<i>M. szulgai</i>	S	22-37	S	37°C S	±	-	+	+	-	+	-	+	-	+
	R			25°C P										
<i>M. gordonae</i>	S	22-37	S(99)	S	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
			R(1)	(99)		(57)	(92)	(97)	(99)	(95)	(99)	(99)	(99)	(85)
<i>M. flavescens</i>	S	25-42	R(59)	S	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
			S(41)	(99)		(78)	(85)	(99)	(99)	(96)	(71)	(97)	(99)	(71)
<i>M. xenopi</i>	S	35-45	S	N(80)	-	+	W	+	-	-	-	-	-	-
				S(20)		(99)	(99)	(83)	(99)	(94)	(99)	(99)		(99)
<i>M. avium- intracelulare</i>	S	25-45	S	N(85)	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	R		(99)	S (12)										
				P (3)										

(Kent and Kubica 1985)

Nonphotochromogens : ทดสอบ niacin test

Niacin-positive nonchromogens : ทดสอบ catalase test, nitrate reduction test, เจริญใน TCH, urease test, photoactive pigment ที่ 25°C และ cord formation ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 6

Niacin-negative nonphotochromogens: ทดสอบ catalase test, nitrate reduction test, pyrazinamidase test, sodium chloride tolerance test, tellurite reduction test, growth on TCH, tween hydrolysis test, urease, test และ photoactive pigment ที่ 25°C ซึ่งให้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6. การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing niacin-positive nonchromogens

SPECIES (subspecies)	Colony Morphology	Growth Temp (°C)	Growth Rate	Pigment	Photoactive	Catalase		Niacin	Nitrate Reduction	Growth on TCH	Urease	Cord formation
						Semiquantitative	Heat Stable					
<i>M. tuberculosis</i>	R	33-39	S	N (99)	-	- (99)	- (99)	+ (98)	+ (99)	+ (92)	+ (98)	+
<i>M. bovis</i>	7H10 R	35-38	S	N (99)	-	- (97)	- (92)	- (95)	- (94)	- (94)	+ (99)	+
	L-J S											
<i>M. africanum</i>	R	35-38	S	N	-	-	- (99)	-/+	-	vary	+ (99)	+
<i>M. microti</i>	R	35-38	S	N (99)	-	-	-	+	-	-		+
<i>M. simiae</i>	S	22-37	S	P(91) N(9)	+		+ (95)	+ (85)	- (85)	+ (99)	+ (64)	-

(Kent and Kubica 1985)

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยก species ต้องใช้เชื้อที่มีอายุเหมาะสม ดังนั้นอาจต้องใช้เวลาเพิ่มเติม 4-8 สัปดาห์ นับตั้งแต่วันที่พบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีหลากหลายวิธี หลายขั้นตอน ทำให้ค่อนข้างยุ่งยาก จึงทำการทดสอบได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการที่เป็นศูนย์กลางในการตรวจหาวัณโรคเท่านั้น ไม่นิยมทำการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการทั่วไป

ตารางที่ 7. การวินิจฉัยเชื้อ slowly growing niacin-negative nonchromogens

SPECIES (subspecies)	Colony Morphology	Growth Temp (°C)	Growth Rate	Pigment	Photoactive pigment	Catalase		Niacin	Nitrate Reduction	Pyrazinamidase	Growth on 5% NaCl	Tellurite Reduction	Growth on TCH	Tween hydrolysis	Urease
						Semiquantitative	Heat Stable								
<i>M. bovis</i>	7H10 R L-J S	35-38	S	N (99)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>M. africanum</i>	R	35-38	S	N	-	-	-	± (85)	- (94)	- (98)	- (99)	- (55)	- (94)	- (84)	+
<i>M. simiae</i>	S	22-37	S	P(91) N(9)	P(91) N(9)	+	+	± (85)	- (85)	±	- (99)	± (85)	+	-	+
<i>M. avium- intraracelulare</i>	S R	25-45	S (99)	N(85) S(12) P(3)	N(85) S(12) P(3)	-	+	- (99)	- (92)	4d +(85) 7d +(99)	- (99)	+	+	-	-
<i>M. xenopi</i>	S	35-45	S	N(80) S(20)	N(80) S(20)	W (99)	+	- (99)	- (94)	+	- (99)	- (59)	+	-	-
<i>M. shimoidei</i>	R	30-40	S	N	N	-	+	-	-	+	-			+	-
<i>M. gastri</i>	S	25-40	S(80) R(20)	N (99)	N (99)	- (99)	- (99)	- (99)	- (99)	4d -(99) 7d +(63)	- (99)	- (74)	+	+	+
<i>M. terrae</i>	S R	22-37	S(77) R(23)	N(95) S(4) P(1)	N(95) S(4) P(1)	+	+	- (99)	+	4d +(63) 7d +(88)	- (94)	- (75)	+	+	-
<i>M. triviale</i>	R	22-37	S	N (99)	N (99)	+	+	- (99)	+		+	- (99)	+	+	-
<i>M. malmoense</i>	S	22-37	S	N(90) S(10)	N(90) S(10)	- (99)	+	- (99)	- (99)	+		+	+	+	-
<i>M. haemophilum</i>	R	22-35	S	N	N	-	-	-	-	+	-	-		-	
<i>M. ulceans</i>	S R	22-33	S	N	N	-	+	-	-		-		+	-	-

(Kent and Kubica 1985)

2.5.2 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยวิธีอื่น ๆ

สามารถตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ได้ด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น

I. การเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* ในอาหารเหลวที่มีสารกัมมันตรังสี เช่น BACTEC 460 TB system เมื่อทำการเพาะเชื้อในอาหารเหลวที่มีสารกัมมันตรังสีซึ่งมี ^{14}C เมื่อเชื้อเจริญเติบโตจะใสสารอาหารและปล่อย $^{14}\text{CO}_2$ ซึ่งจะถูกตรวจวัดได้โดยเครื่องวัดและเปรียบเทียบออกมาเป็นค่าดัชนีการเติบโต สามารถตรวจระยะเวลาในการพบเชื้อเหลือประมาณ 12-18 วัน และสามารถใช้หลักการเดียวกันในการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคต่อไปได้ โดยได้ผลภายในเวลาอีก 1-2 สัปดาห์ ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องเครื่องมือและน้ำยาราคาแพงและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Mycobacterium* ยังคงต้องอาศัยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆเช่นเดิม ทำให้ผลการจำแนกชนิดยังคงช้า

II. การเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* ในอาหารเหลวโดย solid-state CO₂ sensor เช่น MB/Bact system เป็นระบบการเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* อัตโนมัตินี้ที่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี แต่ใช้ solid-state CO₂ sensor ทำหน้าที่ตรวจวัดปริมาณ CO₂ ที่เพิ่มขึ้นจากการเจริญเติบโตของจุลชีพในขวด เมื่อปริมาณ CO₂ เพิ่มขึ้น indicator กั้นขวดจะเปลี่ยนจากสี เครื่องจะบอกเป็นสัญญาณบอก เวลาเฉลี่ยในการตรวจพบเชื้อปริมาณ 17.5 วัน

III. ตรวจการเจริญของเชื้อโดย Oxygen specific sensor เช่น BECTEC MGIT 960 system, BACTEC 9000 MB system ใช้เพาะแยกเชื้อจากเสมหะและสิ่งส่งตรวจประเภทต่างๆ การตรวจวัดการเจริญของจุลชีพ โดยวัดปริมาณ O₂ ใน medium ที่ลดลงเมื่อมีจุลชีพเจริญเติบโต เมื่อปริมาณ O₂ ลดลง Oxygen specific sensor ก็จะเรืองแสงเพิ่มมากขึ้น ข้อดีของวิธีนี้ คือ ตรวจพบการเจริญของเชื้อได้เร็ว ประมาณ 10 วัน

IV. Septi-Chek AFB system (MB Septi-Chek) ประกอบด้วย biphasic media คือ solid medium อยู่บนแผ่นลักษณะใบพาย ด้านหนึ่งเป็น Middlebrook 7H11 และ อีกด้านหนึ่งเป็น Middlebrook 7H11 เติม nitroacetylaminohydroxypropionophenone (NAP) ครึ่งหนึ่ง และ chocolate agar อีกครึ่งหนึ่งเพื่อใช้เพาะแยกเชื้อแบคทีเรียป็นป็น ยึดติดกับฝาขวดด้านหนึ่ง ต่อกับขวดพลาสติกบรรจุอาหารเหลว และสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือเชื้อราที่ปนเปื้อน สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคในเวลาประมาณ 19-27 วัน

V. High-performance liquid chromatography การตรวจ chemical composition profile ของเชื้อโดย (HPLC) (Suzanne, *et al.* 1994)

VI. การตรวจหา mycobacterial antigens เช่น lipoarabinomannan (LAM) เป็นต้น ในสิ่งส่งตรวจโดยวิธี ELISA test, coagglutination, hemagglutination, Latex agglutination (Rattan, *et al.* 1993, Chandramuki, *et al.* 1985, Sada, *et al.* 1992, Bal, *et al.* 1983) การตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยวิธีต่างๆ ยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจในการตรวจหา หรือ แยกวินิจฉัยเชื้อ

2.5.3 การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอณูชีววิทยา

มีความพยายามในการนำวิธีการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* โดยใช้ specific DNA probe มาตรวจหา DNA หรือ rRNA ของเชื้อโดยตรงด้วยวิธี hybridization ได้แก่ วิธี AccuProbe; Gen-Probe ที่ labeled probes ด้วย acridinium ester ซึ่งจะสามารถ hybridized กับ rRNA แล้วตรวจวัดสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence ด้วย luminometer ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่มี specificity สูงและตรวจหาได้อย่างรวดเร็ว แต่พบว่ามีความ sensitivity ที่ต่ำมาก เนื่องจากในสิ่งส่งตรวจจะพบเชื้อในปริมาณน้อย (Musial, *et al.* 1988) จนกระทั่งมีการนำวิธี DNA amplification เช่น PCR หรือ LCR มาใช้ประโยชน์ เพื่อทำการเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA ที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจทำ

ให้การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอณูชีววิทยาเป็นวิธีที่มี sensitivity สูง และพัฒนาทำเป็นชุด kit สำเร็จรูปที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ได้ง่ายขึ้น

2.5.3.1 การพัฒนาวิธี Nucleic acid amplification มาใช้ตรวจหา *Mycobacterium*

Nucleic acid amplification เช่น วิธี Polymerase chain reaction (PCR) หรือ ligase chain reaction (LCR) เป็นวิธีการจำลองสาย DNA โดยทำซ้ำๆกันหลายรอบจนมีปริมาณของ DNA ที่ต้องการมากเพียงพอที่จะตรวจวัดได้ มีวิธีการสำคัญ 3 ขั้นตอน ได้แก่

ขั้นที่ 1 Denaturation เป็นการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง $\sim 90-95^{\circ}\text{C}$

ขั้นที่ 2 Annealing เป็นขั้นตอนเพื่อให้ primer จับกับ DNA สายเดี่ยว โดยการลดอุณหภูมิลงประมาณ $40-60^{\circ}\text{C}$ ซึ่ง primer เป็นสาย nucleotide ที่สังเคราะห์ขึ้นขนาดความยาว $\sim 20-30$ bp ให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งตั้งต้นของ DNA sequence ที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน

ขั้นที่ 3 Extension ซึ่งเกิดการต่อสาย DNA โดย enzyme *Taq* polymerase ซึ่งทนความร้อนสูง สาย DNA จะถูกต่อจาก primer ทางด้าน $3'$ จนได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดที่ต้องการมักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 72°C

เมื่อจบ 3 ขั้นตอนจะจัดเป็น 1 รอบของการทำ PCR จะมี DNA เพิ่มขึ้น 2 เท่า ดังนั้นถ้าทำซ้ำ ๆ กัน หลายๆรอบก็จะมี DNA sequence ที่ต้องการเพิ่มขึ้นถึง 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำ PCR ทำให้มี DNA sequence ที่ต้องการในตัวอย่างตรวจมากพอที่จะตรวจวัดได้วิธีตรวจหา DNA ที่เพิ่มจำนวนซึ่งอาจทำได้โดย agarose gel electrophoresis และตรวจหาโดยการย้อมหรือทำการ hybridization กับ specific DNA probe (Mullis 1990)

สารพันธุกรรมเป้าหมายที่นิยมใช้ตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* มี 2 ประเภท คือ DNA และ RNA DNA sequence ที่ใช้เป็น target DNA มีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น *groEL* Gene ขนาด 383 bp ที่ควบคุมการสร้าง heat shock proteins (HSPs) ขนาด molecule 65 kD ที่พบใน *Mycobacterium* ทุก species (Brisson-Noel, et al. 1989); Gene *MPB 64* Gene และ *MPB 70* Gene ที่ควบคุมการสร้าง proteins MPB 64 ที่จำเพาะกับ *M. tuberculosis* complex หรือ proteins MPB 70 ที่จำเพาะกับ *M. bovis* (Kaneko, et al. 1990, Cousins 1992); Gene ที่ควบคุมการสร้าง proteins antigen ขนาด molecule 32 kD (Soini, et al. 1992); *Pab* Gene ที่ควบคุมการสร้าง proteins antigen b (PAB) ขนาด 38 kD ที่พบใน *M. tuberculosis* และ *M. bovis* (Sheehan, et al. 1997); ชิ้นส่วน DNA ที่ไม่ทราบหน้าที่แต่พบมีความจำเพาะกับเชื้อ เช่น *mtp4064* และ *pT7T3 18U* ที่จำเพาะกับ *M. tuberculosis* complex, (Portillo, et al. 1991, Altamiran, et al. 1992); Insertion sequence *IS6110* และ *IS986* ที่จำเพาะกับ *M. tuberculosis* complex หรือ *IS900* ที่จำเพาะกับ *M. paratuberculosis* (Thierry, et al.

1990, Kolk, *et al.* 1992, Green, *et al.* 1989); Gene ที่ควบคุมการสร้าง 16S rRNA ที่มี gene sequence จำเพาะใน *Mycobacterium* แต่ละ species (Chaiprasert, *et al.* 1996)

การตรวจหา rRNA เป็นอีกเป้าหมายที่นิยมใช้ในการตรวจหา *Mycobacterium* ดังที่กล่าวมาแล้วว่าจะมี sensitivity ที่ดีกว่าเนื่องจากมีใน bacteria แต่ละตัวจะมีอยู่หลาย copies ประมาณ 10^3 - 10^4 molecule/cell (Fox, *et al.* 1980) ตัวอย่างเช่น Amplified Mycobacterium Direct test ของ Gen Probe ที่อาศัยหลักการ amplify rRNA ก่อนที่จะตรวจหาโดยใช้ 16S rRNA gene เป็น specific probe (Abe, *et al.* 1993)

วิธีการ Nucleic acid amplification มาใช้ตรวจหา *Mycobacterium* เป็นวิธีการเพิ่ม sensitivity ของการตรวจวัด แต่จะมีความจำเพาะสูงหรือต่ำขึ้นกับวิธีการตรวจหา DNA และขั้นตอนการทำ PCR ที่เมื่อมีสารยับยั้ง enzyme *Taq* polymerase จะเกิด false negative ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการ purify DNA หรือจะเกิด false positive ถ้าปนเปื้อนด้วย DNA จากสิ่งส่งตรวจอื่นที่ทำการทดสอบก่อน เรียกว่าเกิด carry over อาจกำจัดปัญหาการ carry over โดยใช้ UV irradiation หรือ uracil DNA glycosylase (UDG) digestion โดยใช้ dUTP แทน dTTP ในขั้นตอนการต่อสาย DNA ทำให้ PCR product ที่ได้จะมี uracil base แทน thymine base ก่อนจะเริ่มการทำ PCR ทุกครั้งใช้ UDG digestion กำจัด PCR product กำที่ที่มี uracil base ก่อนเสมอ และ uracil DNA glycosylase จะถูก inactive ที่อุณหภูมิสูง (Longo, Berniger and Hartley 1990) จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างผลการเพาะเชื้อกับวิธี Nucleic acid amplification ในการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* พบว่า วิธี Nucleic acid amplification จะต้องมี target DNA อย่างน้อย 20 molecule ดังนั้นใน ตัวอย่างตรวจที่มีเชื้อน้อย ๆ sensitivity ของการทำ PCR ยังสู้ การเพาะเชื้อไม่ได้ แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลการย้อมจะมีความไวสูงกว่าเพียง 10 เท่า ดังนั้นในการจะนำมาใช้ตัดสินใจการติดเชื้อ หรือ แยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จะต้องได้ผลที่ reproducible เมื่อตรวจซ้ำและมีอาการทางคลินิกชัดเจน หรือตรวจพบเชื้อในเสมหะ (Vanechoutte and van Eldere 1997, Roth, *et al.* 1977)

2.5.3.2 Nucleotide sequencing

เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* แต่ละ species ตำแหน่ง DNA ที่นิยมทำการ sequencing ได้แก่ rDNA ที่นิยมใช้ได้แก่ 16S rDNA , 23S rDNA และ 16S-23S rDNA spacer ดังที่กล่าวมาแล้วว่าเป็นตำแหน่งที่มีความจำเพาะกับเชื้อแต่ละ species มากจึงใช้แยก species ของ *Mycobacterium* ได้ แต่วิธีการยุ่งยากและยากในการแปลผล (Rogall, *et al.* 1990 , Van der Giessen, *et al.* 1994)

2.5.3.3 PCR-restriction enzyme analysis

การทำ restriction enzyme analysis ของ chromosomal DNA ของ mycobacteria สามารถใช้ในการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* species ได้ แต่การศึกษา chromosomal DNA ของ mycobacteria ที่มีขนาดใหญ่ ต้องใช้วิธีการที่เหมาะสมในการแยก DNA นอกจากนี้ยังทำให้การแปลผลค่อนข้างยุ่งยาก (Palittapongarpim, et al. 1993) ผู้วิจัยหลายกลุ่มจึงมีการนำ technique PCR มาทำการขยาย gene sequence ในตำแหน่งที่เป็น genus และ species specific ตำแหน่งต่าง ๆ ก่อนนำมาทำ restriction enzyme analysis เพื่อที่จะสามารถแปลผลได้ง่ายขึ้น ได้แก่ การ amplify 65 kD HSP gene (*hsp 65*) แล้วนำมาตัดโดย restriction enzyme *Bst* NI และ *Xho* I โดย Plikaytis, et al. ในปี 1992 พบ fragment pattern ที่แตกต่างกันในแต่ละ species แต่ไม่สามารถแยกเชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex ; ในปี 1997 Telennti, et al. เปลี่ยนมาใช้ restriction enzyme *Bst* EII และ *Hae* III ในการตัดชิ้นส่วนของ amplify 65 kD HSP gene (*hsp 65*) แทน พบ fragment pattern ที่แตกต่างกันในแต่ละ species แต่ไม่สามารถแยก *M. tuberculosis* complex และ *M. avium* complex ออกจากกัน; ในปี 1997 Vaneechoutte and van Eldere ทำการ amplify 16S rDNA gene แล้วตัดโดย restriction enzyme *Cfo* I , *Mbo* I และ *Rsa* I ได้ fragment pattern ที่ได้ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* species ได้แต่ให้ผลไม่ดีนัก จนกระทั่ง ในปี 1996 Lappayawichit, et al. ทำการ amplify 16S-23S rDNA spacer แล้วตัดด้วย *Bst* XI *Msp* I และ *Hae* III พบว่า fragment pattern สามารถใช้วินิจฉัย nontuberculous mycobacteria ได้ทุก species ยกเว้น เชื้อในกลุ่ม *M. tuberculosis* complex วิธี PCR-restriction enzyme analysis เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่ายและเชื่อถือได้เพื่อใช้ในการแยกเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* species

การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีอณูชีววิทยาช่วยเร่งระยะเวลาในการตรวจพบเชื้อ และวินิจฉัยเชื้อได้อย่างรวดเร็วทำให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้เร็วขึ้น สามารถแยกวินิจฉัยเชื้อสำคัญที่พบบ่อยในสิ่งตรวจทางคลินิกได้ในระดับหนึ่ง ข้อเสียของวิธีอณูชีววิทยาคือไม่สามารถบอกได้ว่าเชื้ออยู่ในสภาวะแพร่เชื้อหรือหายจากโรคนี้อแล้วแต่ยังมีชิ้นส่วนของ DNA หลงเหลือ จึงไม่สามารถใช้ติดตามผลการรักษา

2.6 การรักษาการติดเชื้อ *Mycobacterium*

2.6.1 การรักษาวัณโรค

เมื่อตรวจวินิจฉัยพบการติดเชื้อ *M. tuberculosis* ก็จะนำไปสู่การรักษาผู้ป่วยวัณโรคอย่างถูกวิธีและทันท่วงทีจะช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรค หากผู้ป่วยวัณโรคที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้องจะสามารถแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องได้ถึง 15-20 คนต่อปี แต่หากให้การรักษาอย่างถูกต้องจะควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่เชื้อภายใน 2-3 สัปดาห์ของการรักษา (Rouillon, et al. 1976 , Johnston and Wildrick 1975) ยาที่นิยมใช้ในการรักษาวัณโรคเรียกว่า first line drugs หมายถึง

กลุ่มยาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อวัณโรคได้สูงและก่อให้เกิดอาการที่ไม่พึงประสงค์ต่อผู้ป่วยน้อย สามารถใช้รักษาวัณโรคให้หายขาด จึงนิยมใช้เป็นตัวเลือกในระบบยารักษาวัณโรค ได้แก่ isoniazid, rifampin, streptomycin, pyrazinamide และ ethambutol ปัจจุบันมียาใหม่ที่ใช้ในการรักษาวัณโรคหลายขนาน จัดเป็นยาสำรอง (second line drugs) หมายถึงยาที่เป็นตัวเลือกสำรองในการใช้รักษาวัณโรค เนื่องจากมีประสิทธิภาพต่ำปานหรือกลาง หรือมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยสูงหรือมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก ดังนั้นจะเลือกใช้ยาในกลุ่มนี้เมื่อเชื้อวัณโรคเกิดการดื้อยาในกลุ่มแรก แพ้ยาในกลุ่มแรก หรือใช้รักษาผู้ป่วยวัณโรคนอกปอด ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ thiacetazol, *p*-aminosalicylic acid, quinolones เช่น ciprofloxacin และ ofloxacin , rifampin derivative เช่น rifabutin, macrolide เช่น clarithromycin, aminoglycoside เช่น kanamycin และ amikacin (บัญญัติ ปริชญานนท์ 2542) ปัจจุบัน WHO แนะนำการใช้ระบบยาระยะสั้น (Short course therapy) ในการรักษาวัณโรคภายใน 6-8 เดือน (กองวัณโรค 2540) ได้แก่

แบบที่ 1 ผู้ป่วยใหม่ที่ยอมพบเชื้อ : 2HRZE(S) / 4HR หรือ 2HRZE(S) / 4H₃R₃

แบบที่ 2 ผู้ที่เคยเป็นวัณโรคและกลับมาเป็นอีก เคยรับการรักษาแต่ไม่ได้ผล หรือไม่ได้รับการรักษาครบถ้วน : 2HRZES/1HRZE/ 5HRE หรือ 2HRZES / 1HRZE/ 5H₃R₃E₃

แบบที่ 3 ผู้ป่วยใหม่ที่มีอาการแต่ตรวจไม่พบเชื้อ ให้ใช้ 2HRZ/4HR

แบบที่ 4 ผู้ป่วยที่มีอาการ chronic อาจใช้ยาสำรอง 3 ตัวขึ้นไป หรือ ให้ isoniazid ตัวเดียว

เมื่อนำการรักษาระบบยาระยะสั้นมารวมกับการจัดพี่เลี้ยงคอยควบคุม ดูแลและสังเกตการรับยาของผู้ป่วยวัณโรคให้เป็นไปอย่างถูกต้องสม่ำเสมอ (Direct Observed Therapy Short Course; DOTS) จะทำให้ผลการรักษาวัณโรคดีขึ้นเนื่องจากผู้ป่วยได้รับยาอย่างสม่ำเสมอ (Iseman 1996)

2.6.2 ยารักษาวัณโรค

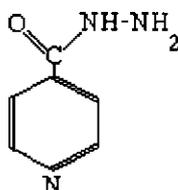
ยารักษาวัณโรคมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการรักษาและออกฤทธิ์แตกต่างกัน หากแบ่งยารักษาวัณโรคตามการออกฤทธิ์ จะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ (สุรินทร์ พลเสน, 2538)

- กลุ่มที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อวัณโรค (Bactericidal action) : isoniazid, rifampicin, streptomycin และ pyrazinamide เป็นต้น
- กลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อวัณโรค (Bacteriostatic action) : thioacetazone, ethambutol, *p*-aminosalicylic acid และ kanamycin เป็นต้น

ยาต้านวัณโรคที่ใช้ในระบบยาที่นิยมใช้รักษาโรคในประเทศไทย ได้แก่ยาต่อไปนี้

I. ISONIAZID (H หรือ INH)

Isoniazid หรือ isoniazid hydraside เป็นยาที่นิยมใช้ในการรักษาวัณโรคเป็นอันดับแรก เพราะเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูงและราคาถูก มีฤทธิ์ข้างเคียงต่อผู้ป่วยต่ำ และสามารถดูดซึมเข้าสู่อวัยวะและบริเวณรอยโรคได้ทุกแห่ง ในบางกรณีสามารถใช้ isoniazid เพียงขนานเดียวทำการรักษา และถูกนำมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยโรคเอดส์อีกด้วย isoniazid จะมีฤทธิ์เป็น bactericidal กับเชื้อวัณโรคในระยะกำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว แต่มีฤทธิ์เป็น bacteriostatic เมื่อเชื้ออยู่ในระยะพัก โดยมีฤทธิ์ต่อเชื้อวัณโรคทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (เทอดศักดิ์ พรหมฉัตร, 2543) สูตรโครงสร้างของยา isoniazid แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างยา isoniazid (สุมาลย์ สารทยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : Isoniazid มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ lipid และ nucleic acid โดยเฉพาะจะออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง mycolic acid ที่เป็นส่วนประกอบของ cell wall จึงมีผลสำคัญในการฆ่าเชื้อ

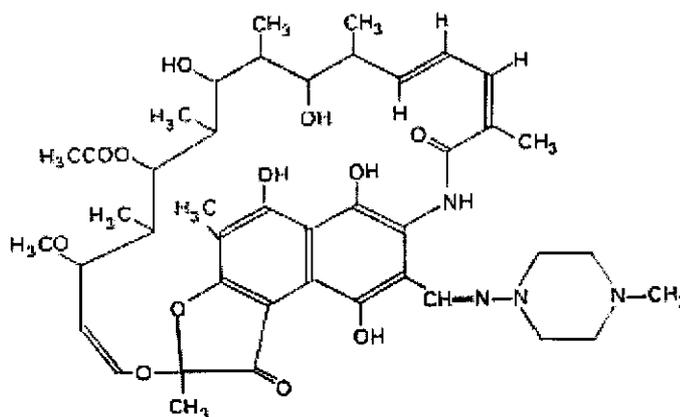
กลไกการดื้อยา : การดื้อต่อยา isoniazid ของเชื้อวัณโรค อาจเกิดจาก spontaneous mutation ซึ่งมีอัตราการดื้อยาเท่ากับ 1 ในล้านตัวตามธรรมชาติ แต่เมื่อใช้ยา isoniazid รักษาอย่างไม่ถูกต้องจะคัดเลือกเชื้อที่ดื้อต่อยา isoniazid ให้มีปริมาณมากขึ้น เชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อ isoniazid จะมีการทำงานของเอนไซม์ catalase ลดลง เชื่อว่า catalase activity จะไปย่อย isoniazid ที่เข้าสู่เซลล์ให้เปลี่ยนเป็น active form ที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อ เมื่อศึกษาทางพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อ isoniazid พบการผ่าเหล่าของ *katG* gene ซึ่งมีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างเอนไซม์ catalase โดยสาเหตุของการผ่าเหล่าเกิดขึ้นเนื่องจากการแทนที่เบส guanine ด้วย thymine ของ gene ที่ควบคุมการสร้าง amino acid ลำดับที่ 463 ส่งผลให้โปรตีนมีลำดับ amino acid เปลี่ยนจาก arginine เป็น leucine (เทอดศักดิ์ พรหมฉัตร, 2543)

อาการไม่พึงประสงค์ : ประมาณ 5% ของผู้ป่วยที่ได้รับยา isoniazid จะมีอาการข้างเคียงที่พบบ่อย คือ เกิดผื่นและอาจมีไข้ร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือดต่ำ ผิวซีด และเกิดการอักเสบของหลอดเลือด ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคประสาทส่วนปลาย เนื่องจากการขาด

อาหาร ดิคลูรา หรือเป็นโรคเบาหวาน ควรได้รับประทาน vitamin B6 เพื่อป้องกันการอักเสบของปลายประสาท นอกจากนี้ยังมีพิษต่อดับทำให้ตับอักเสบได้ และยังพบอาการปวดหลัง ปวดตามข้อ ปากแห้งและแน่นท้อง (ศูนย์เอกสารองค์การอนามัยโลก, 2540)

II. RIFAMPICIN (R หรือ RMP)

Rifampicin หรือ rifampin เป็นยาที่ใช้รักษาทั้งเชื้อ *Mycobacteria* และแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ทั้ง gram positive และ gram negative จัดเป็นยาที่มีประสิทธิภาพสูง และนิยมใช้ในระบบการรักษามือป่วยวัณโรคแบบระยะสั้น ที่ทำให้ใช้เวลารักษาเพียง 6-8 เดือน rifampicin สามารถเพิ่มฤทธิ์ของ streptomycin และ isoniazid เมื่อใช้ร่วมกันในการรักษาวัณโรค (สุรินทร์ พลเสน, 2538) แต่มีราคาแพง และเมื่อใช้ร่วมกับยาบางชนิดได้แก่ choramphenical, corticosteroids, cyclosporine, estrogens, quinine และยาด้านเชื้อรา เป็นต้น ทำให้ปริมาณยาชนิดนั้นในเลือดลดลง ดังนั้นเมื่อใช้ยาเหล่านี้ร่วมกับ rifampicin จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณของยาขึ้นให้เหมาะสม rifampicin จะมีฤทธิ์เป็นทั้งแบบ bactericidal เมื่อเชื่ออยู่ในระยะแบ่งตัว และเป็น bacteriostatic เมื่อเชื่ออยู่ในระยะพัก โดยจะมีผลกับเชื้อวัณโรคทั้งที่อยู่ภายในเซลล์และอยู่นอกเซลล์ มีสูตร โครงสร้างของยา rifampicin ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างยา rifampicin (สุมาลัย สาระยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : Rifampicin ออกฤทธิ์โดยจับกับ β -subunit ของเอนไซม์ RNA polymerase ของเชื้อวัณโรค ซึ่งทำให้ไปยับยั้งขบวนการ transcription จนทำให้เชื้อวัณโรคไม่สามารถสร้างโปรตีนได้ (Levin, 1993)

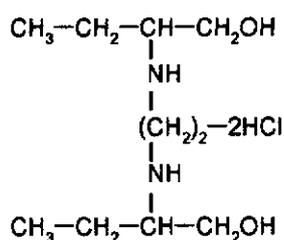
กลไกการดื้อยา : เชื้อวัณโรคจะมีอัตราการดื้อต่อยา rifampicin ตามธรรมชาติเท่ากับ $1:10^7$ มากกว่าร้อยละ 90 ของการดื้อยา rifampicin เกิดจากการผ่าเหล่าของ *rpoB* gene ซึ่งมีหน้าที่สร้าง RNA polymerase โดยการผ่าเหล่าเกิดขึ้นเป็นบริเวณเล็ก ๆ ประมาณ 81 คู่เบส ใกล้ศูนย์กลางของ *rpoB* gene

ทำให้ยาไม่สามารถที่จะจับ β -subunit ของ RNA polymerase ได้ โดยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (เทอดศักดิ์ พราหมณ์นนท์, 2543)

อาการไม่พึงประสงค์ : การใช้ยา rifampicin ทำให้เกิดอาการข้างเคียงน้อยกว่า 4% เมื่อใช้ในขนาดของยาที่รักษาโดยทั่วไป อาการข้างเคียงที่พบบ่อยที่สุด คือ มีผื่น มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน เมื่ออาหาร ท้องอืด ท้องเสีย และมีฤทธิ์กับระบบประสาท ทำให้มีอาการชาตามตัว อ่อนเพลีย ง่วงนอน ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ กล้ามเนื้ออ่อนแรง ผลข้างเคียงต่อระบบเลือดอาจทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำลง และอาจมีอาการโลหิตจางได้ในผู้ป่วยที่ใช้ยาเป็นเวลานาน ๆ นอกจากนี้ยังมีผลต่อดับทำให้เกิดดับอักเสบ มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง และอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยยับยั้งการตอบสนองต่อแอนติเจนของ T-lymphocyte (สุรินทร์ พลเสน, 2538)

III. ETHAMBUTOL (E หรือ EMB)

Ethambutol เป็น synthetic congener ของ 1,2-ethanediamine ซึ่งออกฤทธิ์กับ *M. tuberculosis*, *M. bovis* และ *Mycobacteria* บางชนิด ทนความร้อนและสามารถละลายน้ำได้ดี ถูกนำมาใช้แทนที่ p-aminosalicylic acid ซึ่งมีประสิทธิภาพน้อยกว่าและต้องใช้ในปริมาณสูงในการรักษา ethambutol เป็น bacteriostatic ใช้ได้ผลดีกับเชื้อวัณโรคที่คือต่อยา isoniazid และ streptomycin (สุมาลย์ สาระยา, 2533) โดยยา ethambutol มีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างยา ethambutol (สุมาลย์ สาระยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : Ethambutol จะออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ cell wall ของเชื้อในขั้นตอนการสร้าง arabinogalactan ซึ่งเป็นชั้นของ polysaccharide ที่ยึดกับ mycolic acid โดยยาสามารถจะจับกับเอนไซม์ arabinosyl transferase ที่ควบคุมการสร้าง arabinogalactan (Belanger, 1996) ซึ่ง gene ที่ผลิตเอนไซม์ arabinosyl transferase คือ *embA* gene, *embB* gene และ *embC* gene (Teleti, 1997)

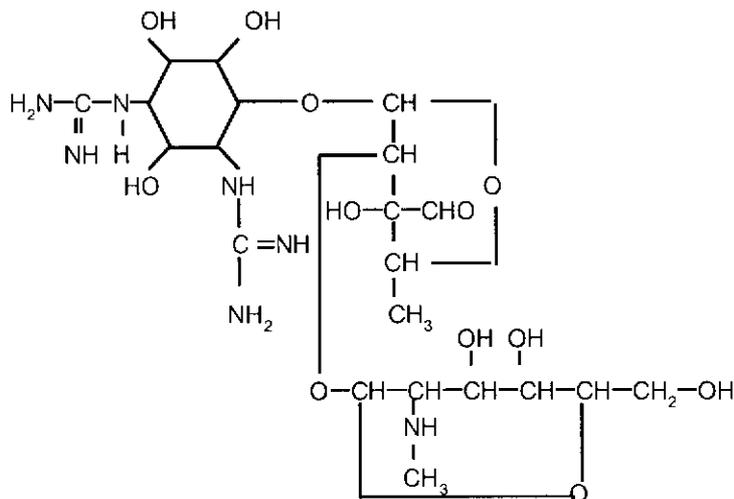
กลไกการคือยา : การคือต่อยา ethambutol ของเชื้อวัณโรคเกิดได้ช้าและเกิดได้ยากมาก และมีอัตราการคือยาน้อยมาก พบว่าการคือต่อยา ethambutol เกิดจากการผ่าเหล่าของ *embB* gene ที่บริเวณลำดับ amino acid ที่ 306 จนทำให้ active site ของเอนไซม์ arabinosyl transferase เปลี่ยนแปลงไป จนยา ethambutol ไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ (เทอดศักดิ์ พราหมณ์นนท์, 2543)

อาการไม่พึงประสงค์ : อาการข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา ethambutol มีน้อยกว่า 1% อาการที่สำคัญ คือ ทำให้ประสาทตาอักเสบ การมองเห็นลดลง ตาบอดสี อาการจะกลับมาเป็นปกติ เมื่อมีการหยุดใช้ยา และพบว่าไตจะมีการขับกรด uric ออกจากร่างกายได้น้อยลง ทำให้มีระดับ urate ในเลือดสูงจึงทำให้ปวดตามข้อ (สุมาลย์ สาระยา, 2533)

IV. STREPTOMYCIN (S หรือ SM)

Streptomycin จัดเป็น broad-spectrum pseudosaccharide antibiotics ใช้รักษาได้ทั้งเชื้อ *Mycobacteria* และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ streptomycin เป็นยาชนิดแรกที่นำมาใช้รักษาวัณโรค ปัจจุบันเนื่องจากเชื้อวัณโรคมีอัตราการดื้อต่อยา streptomycin สูงมาก จึงจำเป็นต้องใช้ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ streptomycin ซึมเข้าสู่เซลล์ไม่ได้ จึงมีฤทธิ์ทำลายเชื้อวัณโรคชนิดที่อยู่ภายนอกเซลล์เท่านั้น โดยจะมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์เป็นแบบ bactericidal ซึ่งยา streptomycin มีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 4

กลไกการออกฤทธิ์ : Streptomycin จะจับกับ 16S rRNA ใน 30S ribosomal subunit ทำให้เกิดการยับยั้งขบวนการ translation จึงไม่เกิดการสร้างโปรตีน หรือเกิดการแปลรหัสของ mRNA ผิดไป ทำให้โปรตีนที่สร้างขึ้นไม่สมบูรณ์ เชื้อจึงไม่สามารถจะนำเอาโปรตีนที่แปลรหัสผิดมาใช้ประโยชน์ได้ (นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา, 2538)



ภาพที่ 4 โครงสร้างยา streptomycin (สุมาลย์ สาระยา, 2533)

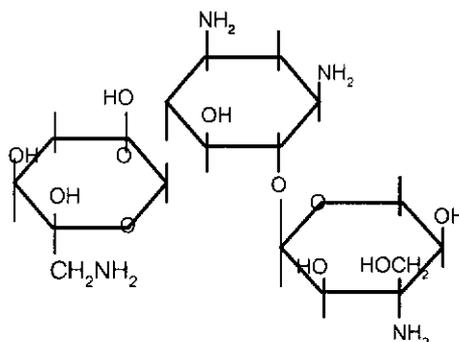
กลไกการดื้อยา : Streptomycin มีอัตราการดื้อยาสูงมากประมาณ $1:10^5$ โดยขบวนการผ่าเหล่าที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ พบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาส่วนใหญ่จะมีเอนไซม์ที่สามารถทำลายฤทธิ์ของยา เช่น aminoglycoside phosphoryltransferase และ aminoglycoside acetyltransferase เป็นต้น (Teletti, 1997) นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าการดื้อยาอาจเกิดจากการผ่าเหล่าของ gene ที่สร้าง ribosomal protein

S12 (*rpsL* gene) และ gene ที่สร้าง 16S rRNA (*rrs* gene) จึงมีผลทำให้ 16S rRNA ของเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนทำให้ streptomycin ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Finken, 1993)

อาการไม่พึงประสงค์ : ส่วนใหญ่จะมีอาการต่อหูและไต ทำให้ไตพิการ เนื่องจากมีการสะสมของยาสูงเกินไป จนไตไม่สามารถกำจัดออกไปได้ แต่เมื่อหยุดใช้ยาอาการจะดีขึ้น ส่วนพิษต่อหูนั้นเกิดเนื่องจากการทำลายประสาท vestibular ทำให้พบว่ามีอาการเวียน อาเจียน หูหนวก ส่วนอาการข้างเคียงอื่น ๆ ที่พบ ได้แก่ มีผื่น มีไข้ และมีอาการชารอบ ๆ ปาก ในหญิงมีครรภ์ไม่ควรใช้ยานี้ เพราะอาจทำให้ทารกในครรภ์หูหนวกได้ (สุรินทร์ พลเสน, 2538)

V. KANAMYCIN (K หรือ KM)

Kanamycin เป็นยาในกลุ่ม aminoglycoside สกัดมาจากเชื้อ *Streptomyces kanamyceticus* ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย gram negative บางชนิด แต่ไม่นิยมสำหรับรักษาการติดเชื้อ *Enterobacteraceae* เพราะเชื้อมีการดื้อต่อยาชนิดนี้ได้ง่ายมาก ปัจจุบันใช้เป็นยาอันดับรองในการรักษาวัณโรค โดยจะต้องใช้ยาร่วมกับยารักษาวัณโรคอื่น ๆ เพราะเป็นยาที่มีฤทธิ์ข้างเคียงที่รุนแรงต่อผู้ป่วย kanamycin มีคุณสมบัติเป็น bactericidal โดยมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างยา kanamycin (สุมาลย์ สารชะยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : Kanamycin มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เป็นยาในกลุ่ม aminoglycoside ออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างโปรตีนของแบคทีเรีย kanamycin จะจับกับ 30S ribosome มีผลยับยั้งการเคลื่อนที่ของ peptidyl RNA ในขบวนการ translocation ยังก่อให้เกิดความผิดพลาดของ codon-anticodon interaction ทำให้อ่านรหัสและแปลรหัสทางพันธุกรรมผิดไป (นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา, 2538)

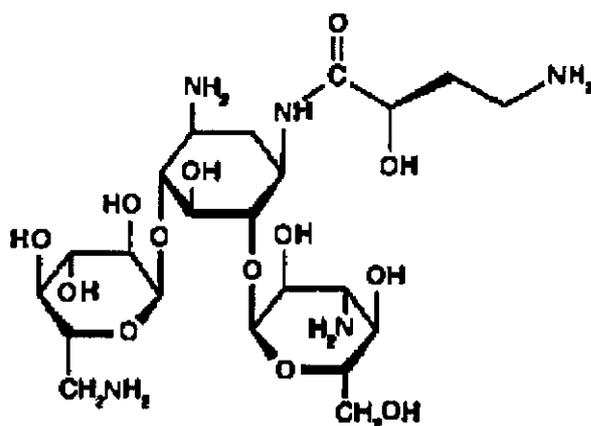
กลไกการดื้อยา : การดื้อต่อยา kanamycin เกิดได้เป็น 3 แบบ คือ การที่เชื้อแบคทีเรียสร้างเอนไซม์บางชนิดมา inactivate ยา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ aminoglycoside เกิดจากขบวนการ

การยับยั้งการนำเข้าสู่ของยาผ่านผนังเซลล์ หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนที่อยู่บน 30S ribosome (นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา, 2538)

อาการไม่พึงประสงค์: Kanamycin ไม่มีพิษต่อดับและระบบเลือด แต่มีพิษต่อระบบไต ทำให้การทำงานของไตลดลง ยาจะสะสมอยู่ที่ proximal tubular cell ทำให้มีโปรตีน และ cast ออกมากับปัสสาวะ และเป็นพิษต่อหู จะมีอาการคล้ายกับการได้รับยา streptomycin คือ มีอาการวิงเวียน อาเจียน และทำให้เกิดการหูหนวกได้ ยังทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง มีอาการกล้ามเนื้อกระตุก (นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา, 2538)

VI. AMIKACIN (AMK)

Amikacin เป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม aminoglycoside เช่นเดียวกับ streptomycin แต่เป็นพิษต่อหูและไตมากกว่า โดยเฉพาะเมื่อต้องใช้ยาคิดต่อกันเป็นระยะเวลานาน amikacin หรือ amikacin sulfate เป็น aminoglycoside กึ่งสังเคราะห์ ได้จากการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของ kanamycin A ที่ $-NH_2$ group ตำแหน่งที่ 1 ของ 2-deozystreptamine ให้เป็น 4-amino-2-hydroxyl-1-oxobutyl side chain ได้เป็น $C_{22}H_{43}N_{50} \cdot 13.2H_2SO_4 \cdot D\text{-Streptomine} \cdot O\text{-}3\text{-amino}3\text{-deoxy-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl-}(1\text{-}6)\text{-}O\text{-}[6\text{-amino-}6\text{-deoxy-}\alpha\text{-D-glucopyranosyl-}(1\text{-}4)](4\text{-amino-}2\text{-hydroxyl-}1\text{-oxobutyl-})\text{-}2\text{-deoxyl-}\text{-}(S)\text{-sulfate}$ ทำให้ยาที่ได้สามารถทนต่อ aminoglycoside-inactivating enzyme ส่วนใหญ่ของแบคทีเรีย และสามารถใช้รักษา การติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อ aminoglycoside ตัวอื่นๆ amikacin สามารถใช้รักษาวัณโรคและการติดเชื้อ nontuberculous mycobacteria หลายชนิด เช่น *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum* และ *M. scrofulaceum* เป็นต้น โครงสร้างของยา amikacin แสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 โครงสร้างยา amikacin (สุมาลย์ สารชะยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : Amikacin ยาที่มีฤทธิ์เป็น bactericidal สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อ *Mycobacterium* โดยยับยั้งการรวมตัวของ 30s และ 50s ribosome

กลไกการดื้อยา : การดื้อยา amikacin ในเชื้อวัณโรคมักพบมี cross-resistance กับ kanamycin เชื้อวัณโรคที่ดื้อ kanamycin ก็จะดื้อต่อ amikacin ด้วย แต่เชื้อที่ดื้อต่อยา streptomycin บางครั้งยังสามารถรักษาได้ด้วยยา amikacin หรือ kanamycin การดื้อยาของ aminoglycoside มีกลไกหลายแบบได้แก่

1. การที่เชื้อสร้าง enzyme มาทำลายโครงสร้างของยา โดย gene ที่ควบคุมการสร้าง inactivating enzymes อยู่บน plasmids โดยเชื้อสร้าง enzyme เช่น acetyltransferase ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยา acetylation ของ amino group ของยา, phosphotransferase ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยา phosphorylation กับ hydroxyl group ของยา หรือ adenytransferase ที่ทำให้เกิด adenylation ของ hydroxyl group ของ aminoglycosides จึงทำให้ยาหมดฤทธิ์ แต่โครงสร้างของ amikacin ซึ่งมี protective side chain จึงทำให้ทนต่อ enzyme ที่ทำลายยาเหล่านี้ ยกเว้นแบคทีเรียที่สร้าง acetyltransferase ชนิด AAC 6' และ adenytransferase ชนิด ANT 4' จะสามารถพัฒนาการดื้อต่อยา amikacin ได้

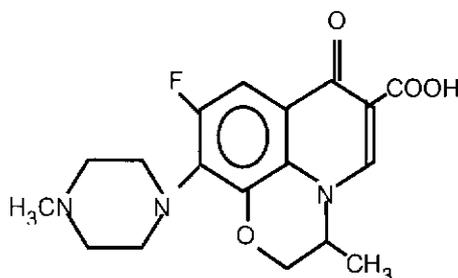
2. ลดการนำเข้าของยา โดยเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์จึงทำให้ยาไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ หรือทำให้ยาเข้าสู่เซลล์น้อยลง

3. เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ ribosomal 30S subunit หรือ S12 ribosomal protein การดื้อยา amikacin และ streptomycin ของเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง target ribosome โดยการกลายพันธุ์ของ *rpsL* gene มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ S12 โปรตีนของ ribosome หรือมี point mutation ของ *rrs* gene ที่ควบคุม 16S rRNA ที่ตำแหน่งต่างๆ เช่น 530 , 915 หรือ 1400 เป็นต้น (Alangaden. et. al. 1998)

อาการไม่พึงประสงค์ : ยาในกลุ่ม aminoglycosides มักเป็นพิษต่อไต พบได้ประมาณร้อยละ 5-10 ของผู้ช้ยา ในผู้ป่วยที่ได้รับยานานๆ ผู้ป่วยมีอายุมาก หรือมีความผิดปกติที่ไตมาก่อน ยาจะทำลาย proximal tubular cells ทำให้ตรวจพบ creatinine, albuminuria ใน serum สูงและพบ white cells , red cells casts ร่วมกับมีภาวะ azotemia และ oliguria พิษต่อไตจะหายไปเมื่อหยุดช้ยา เพราะ proximal tubular cells ที่สูญเสียไปจะสร้างขึ้นมาใหม่ นอกจากนี้ aminoglycosides เป็นพิษต่อประสาทหูทำให้การสูญเสียการได้ยิน, สูญเสียการทรงตัว มีอาการปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน มีการทำลาย cochlear ทำให้หูหนวก อาการเกิดขึ้นประมาณร้อยละ 1-3 ของผู้ช้ยา และเมื่อหยุดยาส่วนใหญ่จะหายไปเอง ยังพบทำให้ยับยั้งการหลังของ neuromuscular transmission blockage มีผลทำให้เกิดกล้ามเนื้อเป็นอัมพาต หายใจขัด อาการข้างเคียงอื่นๆ เช่น เกิดผื่นคัน มีไข้ ปวดศีรษะ คันและชาตามตัว มีอาการคัน ความดันต่ำ เกิดภาวะโลหิตจาง และมีระดับ eosinophil สูง

VI. OFLOXACIN (O)

Ofloxacin เป็นยาในกลุ่ม fluoroquinolone ปัจจุบันถูกนำมาใช้ในกรณีของผู้ป่วย วัณโรคเกิดการดื้อยาชนิดอื่น และจัดเป็นยาที่ใช้ในการรักษาวัณโรคได้เป็นอย่างดี มีผลข้างเคียงต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถนำมารักษาการติดเชื้อทั่ว ๆ ไป จากแบคทีเรียทั้ง gram positive และ gram negative ofloxacin มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์แบบ bactericidal และมีระดับ MIC ของยาค่ำ และออกฤทธิ์ได้กว้าง (broad spectrum) น่าเชื่อถืออย่างรวดเร็ว ยา ofloxacin มีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 โครงสร้างยา Ofloxacin (สมถวิล ทัพพะวัฒนะ และคณะ, 2541)

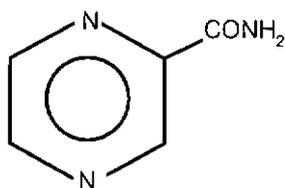
กลไกการออกฤทธิ์ : กลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม fluoroquinolone จะมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกัน คือ มีฤทธิ์ยับยั้งขบวนการจำลอง DNA (DNA replication) โดยจับกับ เอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ATP-dependent supercoiling ของ DNA ของเชื้อ ที่ทำให้ DNA ของเชื้อ ขดตัวลงและฝังอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ได้ เอนไซม์ DNA gyrase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม DNA topoisomerase type II ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น 4 subunit (A_2B_2) โดย subunit A มีคุณสมบัติในการตัดและเชื่อมสาย DNA ส่วน subunit B มีคุณสมบัติเป็น ATPase ที่ควบคุมการสร้างโดย *gyrA* gene และ *gyrB* gene แต่เมื่อยาเข้ายับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase จะทำให้ DNA ของเชื้อไม่สามารถขดตัวได้และฝังตัวอยู่ในนิวเคลียส (สมถวิล ทัพพะวัฒนะ และคณะ, 2541)

กลไกการดื้อยา : การที่เชื้อวัณโรคดื้อยา fluoroquinolones มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงที่ *gyrA* gene ที่สร้างเอนไซม์ gyrase A และจะมีการรวมกลุ่มกันที่บริเวณ conserved region ที่เรียกว่า quinolone resistance-determining region (QRDR) (Heisig, *et al.* 1993) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง amino acid ของเอนไซม์ gyrase A ตำแหน่งที่ 87 จาก aspartic acid เป็น histidine (Cambau, *et al.* 1994) จนทำให้ยาไม่สามารถเข้าไปยับยั้ง DNA gyrase ได้ การดื้อยาอาจเกิดจากโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการขับยาออกนอกเซลล์ (efflux protein, *efpA*) จึงส่งผลทำให้เชื้อดื้อยาได้ (Higgins, *et al.* 1984, Doran, *et al.* 1997)

อาการไม่พึงประสงค์ : พบว่าเมื่อผู้ป่วยจะมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ผื่น มีนงง นอนไม่หลับ และอาจมีอาการทางระบบประสาทด้วย เช่น ชัก ประสาทหลอน โรควิต เป็นต้น (สมศักดิ์ โล่ห์วีระ, 2530)

VIII. PYRAZINAMIDE (Z หรือ PZA)

Pyrazinamide เป็นสารสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างคล้าย nicotinamide สามารถทำลายเชื้อวัณโรคได้ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ โดยจะทำลายเชื้อวัณโรคในสภาวะ semidormancy และออกฤทธิ์ได้ดีที่สภาวะเป็นกรดอ่อน ๆ ซึ่งเป็นสภาวะที่พบใน macrophage (Michison, *et al.* 1985) ยาจะออกฤทธิ์เฉพาะกับเชื้อวัณโรคเท่านั้น โดยไม่มีผลกับเชื้อ *Mycobacteria* ชนิดอื่น ๆ pyrazinamide มีฤทธิ์กำจัดเชื้อได้สูง จึงมักใช้เป็นยาในระบบการรักษาระยะสั้นร่วมกับ isoniazid และ rifampicin เนื่องจาก pyrazinamide จะถูกดูดซึมได้ทั้งหมดที่ส่วนน้ำหล่อไขสันหลัง จึงสามารถใช้รักษาวัณโรคเยื่อหุ้มสมองด้วย pyrazinamide จะออกฤทธิ์แบบ bactericidal ซึ่งมีสูตรโครงสร้างของยา pyrazinamide ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างยา pyrazinamide (สุมาลย์ สาระยา, 2533)

กลไกการออกฤทธิ์ : กลไกการออกฤทธิ์ของ pyrazinamide ยังไม่ทราบแน่ชัด น่าจะเกิดจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการสร้าง pyridine ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยน pyrazinamide เป็น pyrazonic acid ซึ่งเป็น active form ของยาโดยเอนไซม์ pyrazinamidase ทำให้เกิด pH เป็นกรด จนเชื้อวัณโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์, 2543)

กลไกการดื้อยา : เกิดจากการผ่าเหล่าของ gene ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ pyrazinamidase ของเชื้อวัณโรค คือ *pncA* gene ทำให้เชื้อวัณโรคไม่มี pyrazinamidase activity ที่จะเปลี่ยนยาให้เป็นรูป active form ได้ (Scorpio, *et al.* 1997) แต่จากการศึกษายังพบว่ามีเชื้อวัณโรคอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่พบความผิดปกติของ *pncA* gene ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Raynaud และคณะ ว่าความสามารถในการดูดซึมของยาที่จะเข้าสู่เซลล์นั้น มีผลต่อการดื้อยาของเชื้อมาก (Raynaud, *et al.* 1999)

อาการไม่พึงประสงค์ : Pyrazinamide มีพิษต่อตับสูงมาก และยับยั้งการขับกรด uric ในปัสสาวะ ทำให้เกิดกรด uric ในเลือดสูง จนเกิดปวดข้อเฉียบพลันในผู้ป่วยที่เป็นโรค Gout ได้ และพบอาการอื่นๆ อีกได้แก่ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย เกิดเลือดคั่งและมีไข้ร่วมด้วย(สุมาลย์ สาระยา, 2533)

2.6.3 การรักษา Mycobacteriosis

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ nontuberculous mycobacteria ขึ้นกับชนิดของ NTM ถ้าเป็นการติดเชื้อ *M. kansasii* อาจให้ยา เช่นเดียวกับเชื้อวัณโรคแต่ไม่ให้ PAS และ pyrazinamide หรือใช้กลุ่มยาสำรองก็ได้ แต่ถ้าเป็นผู้ป่วย HIV infection ที่ติดเชื้อ MAC การรักษาด้วยระบบยาที่เหมาะสมจะทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตยืนยาวขึ้น โดยมี mean survival ของผู้ที่ได้รับการรักษาเท่ากับ 11.7 เดือน ขณะที่ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษามี mean survival เพียง 5.6 เดือน เชื้อ MAC ส่วนใหญ่ด้านยาที่ใช้รักษาวัณโรค โดยมีรายงานถึงการดื้อต่อยา isoniazid และ pyrazinamide ความเข้มข้นของยาทั้ง 2 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ MAC จะสูงเป็น 10-100 เท่าของความเข้มข้นที่ใช้ระงับการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค เป็นเพราะผนังเซลล์ของ MAC มีคุณสมบัติ lipophilic ทำให้ยาซึมเข้าตัวเชื้อยากขึ้น สำหรับยารักษาวัณโรคชนิดอื่นๆ พบว่าอัตราความไวต่อยา ethambutol, rifampin, amoxicillin และ ciprofloxacin ของเชื้อ MAC เป็นร้อยละ 91, 89, 68 และ 61 ตามลำดับ

ยาที่นิยมใช้ในการรักษา MAC เป็นยาในกลุ่ม macrolide ตัวใหม่ ได้แก่ clarithromycin และ azithromycin ที่ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อปอดได้ในความเข้มข้นสูง และสามารถให้ derivative ของ rifamycin-S ได้แก่ rifabutin ในการรักษาโรคปอดจากเชื้อ MAC ได้ดีกว่า rifampin แต่ rifabutin มีการต้านฤทธิ์กับยาบางตัวที่ใช้ต้องในการรักษา โดยพบว่าการใช้ยา rifabutin จะทำให้ระดับของ zidovudine และ clarithromycin ในกระแสเลือดลดลงและยังมีผลข้างเคียงกับผู้ป่วยทำให้เกิด uveitis (จุฑามณี สุทธิสีสังข์, 2541, 148-163) จากการศึกษาโดยรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ MAC ชนิดแพร่กระจายในผู้ป่วยเอดส์จำนวน 154 คน ด้วย clarithromycin เพียงชนิดเดียวในขนาด 500, 1000 หรือ 2000 mg/day วันละ 2 ครั้ง นาน 2 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อในเลือดได้ $2.7-2.8 \log_{10}/ml$ โดยสามารถให้ยา clarithromycin ร่วมกับยาอื่นได้ เช่น rifabutin, ethambutol ในการรักษา (บุญมี สถาปัตยวงศ์, 115-295) และพบว่าคนไข้โรคเอดส์ที่มี $CD4 < 100 \text{ cells}/mm^3$ ที่ติดเชื้อ MAC แบบแพร่กระจาย เมื่อได้รับ clarithromycin 500 mg /2 ครั้งต่อวัน เมื่อรักษาติดต่อกันนาน 12 เดือน สามารถรักษาและป้องกันอาการต่างๆของ MAC ได้ร้อยละ 69 และสามารถรักษาการติดเชื้ออื่นๆที่พบในผู้ป่วยเอดส์ ได้แก่ *Pneumocystis carinii*, giardiasis และ bacteria ตัวอื่นๆแต่ระหว่างการให้ยา clarithromycin พบอัตราการดื้อต่อ clarithromycin ถึงร้อยละ 58 (Matsiota-Bernard, et. al. 2000) พบว่าการให้ยา clarithromycin สามารถควบคุมภาวะ bacteraemia ในผู้ป่วย AIDS. และ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นและมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น แต่ถ้าไม่ให้การรักษานำจัดเชื้อก็จะเกิดปัญหาการดื้อยาเช่นในกรณีของเชื้อวัณโรค การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดสายพันธุ์ดื้อยาจะเกิด ประมาณ 1.1×10^{-10} เมื่อเชื้อเริ่มดื้อยาก็จะมีผลให้ผู้ป่วยจะกลับมีอาการ bacteraemia อีกครั้ง เรียกว่าเกิด relapsing จึงไม่ควรใช้ยา clarithromycin เพียงชนิดเดียวในการรักษาการติดเชื้อ MAC มีความจำเป็นต้องทำการรักษาโดยใช้

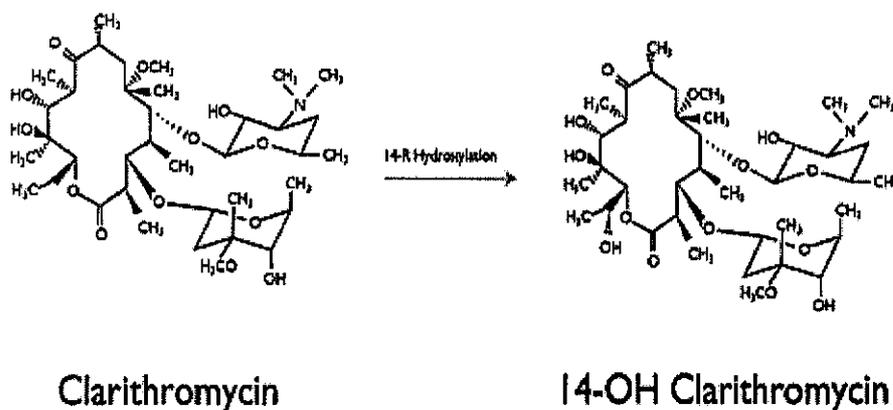
combine drugs ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ เพื่อป้องกันการดื้อยา ยาที่นิยมใช้ร่วมกับ clarithromycin ได้แก่ amikacin, rifampicin, rifabutin, clofazimine and ciprofloxacin และควรต้องตรวจหาสายพันธุ์ดื้อยาของ MAC เพื่อยืนยันว่า clarithromycin ยังมีประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วย โดยตรวจหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อลดเหลือร้อยละ 1 ในระยะเวลา 7 วัน หรือ Minimum inhibitory concentration (MIC) MIC ของ MAC สายพันธุ์ดื้อยา clarithromycin จะมีค่า MIC $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ (Barradell, *et al* 1993, Mascellino, *et al.* 1991, Bermudez, *et al.* 1998, Yajko, *et al.* 1996)

2.6.4 คุณสมบัติของยา clarithromycin

Clarithromycin เป็น macrolide ที่มีการดัดแปลงที่ตำแหน่ง C-6 เพื่อป้องกันขบวนการ Cyclization โดยดัดแปลงกลุ่ม hydroxy ให้เป็นกลุ่ม 6-O-methyl ด้วยกระบวนการ alkylation clarithromycin เป็นยาในกลุ่ม macrolide ที่มีฤทธิ์สูงที่สุดต่อ *Mycobacterium avium* complex : อาจมี MIC 90 เป็น $4 \mu\text{g/ml}$ ซึ่งใกล้เคียงระดับสูงใน serum แต่เนื่องจากระดับยาในเซลล์สูงมาก จึงเป็นที่คาดหวังว่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ (นลินี อิศวโกติ, 2533,209-217) ยามี metabolite ตัวหนึ่งคือ 14- hydroxy metabolite มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้ จึงช่วยเสริมการออกฤทธิ์ และคงระดับสารที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อในร่างกายได้มากและนานขึ้น มีผลต่อแบคทีเรียชนิดทนกรดหลายตัว เช่น *M. leprae*, *M. marinum*, *M. avium* complex และปรสิต เช่น *Toxoplasma gondii* (มาลิน จุลศิริ, 2540,33-55) clarithromycin มีคุณสมบัติในด้านการกระจายตัวเช่นเดียวกับ azithromycin โดยมีค่า volume of distribution ระหว่าง 226-266 ลิตร ระดับสูงความเข้มข้นของยาในปอดสูงกว่าในเลือด 2-6 เท่า ยังพบ 14-hydroxyclarithromycin ในเนื้อเยื่อจะมีระดับความเข้มข้นสูงประมาณครึ่งหนึ่งของยา (บุญมี สถาปัตยวงศ์, 2541,115-127) จากการศึกษาพบว่า clarithromycin ที่ใช้ในผู้ป่วย MAC ติดเชื้อในเลือด พบว่าคือคือยา clarithromycin มีค่า MIC $<8 \mu\text{g/ml}$ (Dube, *et al.* 1999) โครงสร้างของยา clarithromycin แสดงในภาพที่ 9

กลไกการออกฤทธิ์ : Clarithromycin ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของ bacteria โดยยาจะแทรกซึมผ่านผนัง cell ของเชื้อแบคทีเรียและจับกับ 50s ribosomal subunit จึงยับยั้ง translocation ของ aminoacyl transfer-RNA ทำให้การสังเคราะห์ polypeptide ถูกยับยั้งยานี้มีฤทธิ์เป็น bacteriostatic (จุฑามณี สุทธิสีสังข์ ,2541,148-163)

กลไกการดื้อยา : การดื้อในกลุ่ม macrolides เกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ methylase ซึ่งทำให้เกิด methylation ของ adenosim residues ใน ribosomal RNA จึงยับยั้งการจับของยากับ RNA การดื้อยาสามารถเกิดข้ามระหว่างยาในกลุ่ม 14-membered ring เช่น clarithromycin ,erythromycin และกลุ่ม 15-membered ring เช่น azithromycin (จุฑามณี สุทธิสีสังข์ และคณะ ,2541,148-163



ภาพที่ 9. สูตรโครงสร้าง Clarithromycin และ 14-OH Clarithromycin metabolite ของ Clarithromycin (นลินี อัสวโกที, 2533, 209-217)

อาการไม่พึงประสงค์ : Clarithromycin ทำให้เกิดพิษต่อประสาทสมองคู่ที่ 8 อาจทำให้คลื่นเหมือนคนบ้าเมื่อหยุดใช้ มีอาการท้องเสีย อาเจียน ลึ้นรับสัมผัสสารพิษตกติ ถ้าให้ขนาดสูงเป็นสาเหตุของการเจ็บช่องท้องยา มีการระคายเคืองที่ผิวหนังเล็กน้อย ลมพิษ, ปากอักเสบ ติดเชื้อราในช่องปาก ดับอักเสบได้บ้างแต่น้อยมาก (บัญญัติ ปรัชญานนท์ และคณะ, 2542)

2.7 การดื้อยาของเชื้อวัณโรค

สาเหตุหนึ่งที่เป็นปัญหาสำคัญต่อการควบคุมวัณโรคคือการดื้อยาของเชื้อวัณโรค ซึ่งทำให้การรักษาผู้ป่วยไม่มีประสิทธิภาพ การรักษาวัณโรคจำเป็นต้องใช้ยาร่วมกันหลายชนิดและรักษาต่อเนื่องเป็นเวลานาน หากการรักษาไม่ถูกต้อง ไม่ต่อเนื่อง หรือไม่ครบถ้วน จะเกิดปัญหาการดื้อยาเกิดขึ้น (Acquired resistance หรือ Secondary drug resistance) ซึ่งเมื่อเชื้อสายพันธุ์ดื้อยาแพร่ออกไปก็จะทำให้ผู้ป่วยอื่นๆ ติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาไปด้วย (initial resistance) (Mitchison 1980) จากข้อมูลของสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยฯ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 พบอัตราการเกิดการดื้อยาแบบปฐมภูมิ ร้อยละ 24.8 เป็นการดื้อยา isoniazid ร้อยละ 14.6 ดื้อยา streptomycin ร้อยละ 10.2 และ ดื้อยา parazinamide ร้อยละ 4.7 แต่จะพบอัตราการดื้อยาแบบทุติยภูมิ (Secondary drug resistance) สูงมากโดยดื้อต่อ streptomycin ร้อยละ 42.5 ดื้อยา isoniazid ร้อยละ 42.2 ดื้อยา parazinamide ร้อยละ 41 และ ดื้อยา ethambutol ร้อยละ 17 (Nuchprayoon, *et al.* 1969) ระหว่างปี พ.ศ. 2534-2537 อัตราการดื้อยาของวัณโรคเพิ่มจากร้อยละ 17.7 เป็น ร้อยละ 23.2 พบเป็นการดื้อยาชนิดเดียว ชนิด streptomycin เป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาเป็น isoniazid ต่อมาเป็นการดื้อยาแบบ 2 ชนิด คือ isoniazid ร่วมกับ rifampicin(R) ซึ่งยาทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นยาหลักสำคัญที่ใช้รักษาวัณโรค เชื้อที่ดื้อยาทั้ง 2 ชนิดจัดเป็นเชื้อดื้อยาหลาย

ขนาน (multi-drug resistant tuberculosis ; MDR-TB) (สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยฯ และคณะ 2539) เชื้อที่เป็น MDR-TB อาจพบมีการดื้อต่อยาตัวอื่นเพิ่มจากยา 2 ชนิดนี้ เช่น streptomycin หรือ pyrazinamide ในปี พ.ศ. 2535 ประเทศสหรัฐอเมริกาพบอัตราการดื้อยาหลายขนาน ร้อยละ 19.1 ในปี พ.ศ. 2539 มีรายงานการพบเชื้อ MDR-TB ในที่ต่าง ๆ ทั่วโลกแตกต่างกันไปอยู่ระหว่าง ร้อยละ 4-10 (Cohn, *et al.*1996) เชื่อว่า MDR-TB เป็นผลจากการรักษาที่ไม่ถูกต้อง ร่วมกับปัญหาจากผู้ป่วยเป็นโรคเอดส์ที่ตอบสนองต่อการรักษาได้ผลน้อย จึงทำให้เชื้อพัฒนาเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยา ผู้ป่วยวัณโรคจากเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ MDR-TB จะใช้ยา isoniazid ร่วมกับ rifampicin ในระบบยาต้นดังกล่าวในเบื้องต้นรักษาไม่ได้ผลจำเป็นต้องใช้ยาอื่นในการรักษา พบว่าอัตราการรักษาหายของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ MDR-TB มีเพียงร้อยละ 56-88 (Grotton, *et al.* 1997) การเลือกกลุ่มยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคดื้อยามีความสำคัญมากเพราะหากไม่ได้ผลผู้ป่วยจะถึงแก่ชีวิต ถ้าไม่ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ต้องให้ยาที่ผู้ป่วยไม่เคยได้รับ 3-5 ขนาน ถ้าการรักษาได้ผลจะตรวจไม่พบเชื้อใน 3-4 เดือนหลังการรักษาและควรให้ยาต่ออีกอย่างน้อย 18-24 เดือน แต่หากทำการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพเพื่อให้ทราบความไวต่อยาต้านวัณโรคชนิดต่างๆ จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการเปลี่ยนยาให้เหมาะสมกับการรักษาผู้ป่วย กลุ่มยาที่ใช้รักษาเชื้อดื้อยาได้แก่ pyrazinamide, ethambutol, quinolone, β -lactam with β -lactamase inhibitor และ p-aminosalicylic acid , cycloserine หรือ thiacetazone (Nadler, *et al.*1991, Michael and Iseman, 1994) ถึงแม้ว่าการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อวัณโรคจะยุ่งยาก สิ้นเปลือง และใช้เวลานาน แต่ถ้าต้องการให้การควบคุมวัณโรคดื้อยามีประสิทธิภาพ ควรทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยเสมอและควบคุมการรักษาผู้ป่วยทั้งใหม่และเก่าให้มีประสิทธิภาพ

2.8 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ *Mycobacterium*

2.8.1 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อวัณโรค

เป็นประโยชน์เพื่อให้ทราบว่าเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยมีความไวหรือดื้อต่อยาที่ใช้ในการทดสอบ การดื้อยาของเชื้อวัณโรคเกิดจาก spontaneous mutation ที่เกิดขึ้นใน population ของเชื้อวัณโรค ดังนั้นใน population ของเชื้อวัณโรคทั้งหลาย จึงจะมีทั้งเชื้อที่ไวต่อยา และ เชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา โดยสัดส่วนของเชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยามักจะมีเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อได้รับการรักษาด้วยปริมาณยาที่ไม่เพียงพอ เชื้อวัณโรคที่ไวต่อยาจะถูกกำจัด หรือ ยับยั้ง ทำให้ เชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2512 WHO ให้คำจำกัดความสำหรับการที่เชื้อวัณโรคดื้อยาว่าเป็นเชื้อวัณโรคที่มีเชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาในระดับที่เกินกว่าสัดส่วนวิกฤติ (critical proportion) สำหรับยาต้านวัณโรคส่วนใหญ่จะจัดว่าเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยานั้น ถ้ามีสัดส่วนเชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาเกินกว่าร้อยละ 1 เมื่อทำการทดสอบด้วยยาในความเข้มข้นวิกฤติ (critical concentration) ซึ่งเป็นความเข้มข้น

ของยาที่มีผลยับยั้งเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่ไวต่อยาเกือบทั้งหมดโดยไม่มีผลยับยั้งเชื้อวัณโรคสายพันธุ์ที่
 ต่อยา ความเข้มข้นวิกฤติของยาแต่ละชนิดแสดงใน ตารางที่ 8

การทดสอบความไวต่อยาที่ใช้รักษาวัณโรคจะสามารถบอกการลดลงของความไวต่อ
 ยาต้านวัณโรคของเชื้อวัณโรคที่ทำการทดสอบ จนถึงระดับซึ่งมีความแตกต่างจากความไวของเชื้อ
 วัณโรคที่พบในร่างกายของผู้ป่วยที่ไม่เคยสัมผัสยาด้านวัณโรคมามาก่อนจนมีผลต่อการรักษา ดังนั้นการ
 ทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคจึงออกแบบไม่ให้นำมาตรวจหาเชื้อที่ติดมาจากกรกลายพันธุ์ที่เกิด
 ขึ้นเองตามธรรมชาติ และจำเป็นที่จะต้องมีเชื้อมาตรฐานที่ไม่เคยสัมผัสกับยาด้านวัณโรคชนิดใดๆ มา
 ก่อน (wild type strain) เป็นตัวควบคุมการทดสอบ เชื้อมาตรฐานที่ใช้ควบคุมการทดสอบในห้อง
 ปฏิบัติการ คือ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv ซึ่งเป็นเชื้อวัณโรคที่เพาะเลี้ยงได้จากผู้ป่วยวัณโรค
 ก่อนที่จะมีการค้นพบยารักษาวัณโรค (เจริญ ชูโชติถาวร, 2543)

ตารางที่ 8. ความเข้มข้นวิกฤติของยาต้านวัณโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

Drug	Concentration (mg/ml)			
	7H10	7H11	L-J	Radiometric
Isoniazid	0.2	0.2	0.2	0.1
Rifampin	1.0	1.0	40.0	2.0
Streptomycin	2.0	2.0	4.0	6.0
Ethambutol	2.0	7.5	2.0	2.5
PAS	2.0	8.0	0.5	-
Kanamycin	5.0	1.0	20.0	-
Cycloserine	20.0	30.0	30.0	-
Ciprofloxacin	2.0	2.0	-	-
Ofloxacin	2.0	2.0	-	-

(เจริญ ชูโชติถาวร, 2542)

ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคจะมีประโยชน์ในการเลือกและประเมิน
 ระบบยาที่ใช้ในการรักษา ดังนั้นผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคจะต้องให้ผลที่มี
 ความแม่นยำสูงมาก เพราะหากรายงานเป็นเชื้อคือต่อยาชนิดใดจะมีผลทำให้ต้องเปลี่ยนการรักษาจาก
 ระบบยาหลัก ไปใช้ยาในลำดับรองที่มีประสิทธิภาพในการรักษาน้อยกว่า และมีผลข้างเคียงรุนแรง
 มากขึ้น ขณะเดียวกันถ้าไม่ทราบผู้ป่วยติดเชื้อที่คือต่อยาที่กำลังรักษา ก็จะทำให้ผลการรักษาผู้ป่วย
 ล้มเหลว หรือมีโอกาสกลับมาเป็นวัณโรคซ้ำในภายหลัง (เจริญ ชูโชติถาวร, 2543) การทดสอบความ
 ไวต่อยาของเชื้อวัณโรคสามารถทำการทดสอบได้ 2 ลักษณะ คือ

1) Quantitative test เป็นการทดสอบหาระดับของยาค่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรค
 ได้ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถนำเอาข้อมูลมาใช้ในการปรับ

ระดับยาที่ใช้รักษาให้เหมาะสมโดยใช้หลักการทางเภสัชจลศาสตร์ เป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาวิจัย แต่วิธีการทดสอบนี้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้เทคนิคที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน และใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2) Qualitative test เป็นวิธีการทดสอบเพื่อที่จะบอกว่าเชื้อมีความไวหรือคือต่ออายุที่ทดสอบชนิดใดบ้าง การทดสอบแบบวิธี qualitative เป็นวิธีการมาตรฐานที่ปฏิบัติในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายกว่า ไม่ยุ่งยากเหมือนกับวิธี quantitative อีกทั้งยังมีวิธีมาตรฐานเป็นควบคุมการทดสอบได้

การทดสอบความไวต่อยารักษาวัณโรค ยังแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1. Direct susceptibility testing : เป็นการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจต่อยา เพื่อให้ทราบผลอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องรอการเพาะเชื้อก่อน วิธีนี้จะได้ผลกับสิ่งส่งตรวจที่ย้อมพบเชื้อ acid fast bacilli แล้วเท่านั้น วิธีการนี้มีข้อดี คือ เป็นการทดสอบความไวของเชื้อที่เป็นประชากรของเชื้อทั้งหมดที่มีอยู่ในสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโดยตรง การทดสอบโดยตรงนี้จะให้ผลที่รวดเร็วกว่าประมาณ 3-4 สัปดาห์โดยวิธีมาตรฐาน หรือประมาณ 1-2 สัปดาห์โดยวิธีกัมมันตภาพรังสี แต่ข้อเสียของการทดสอบโดยวิธีนี้ คือ สิ่งส่งตรวจที่นำมาทดสอบจะต้องมีปริมาณเชื้อมากเพียงพอที่จะให้ colony ของเชื้อพอเพียงต่อการแปลผล อีกทั้งวิธีนี้อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย จะทำให้ไม่สามารถแปลผลได้

2. Indirect susceptibility testing : หรือการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อวัณโรคโดยทางอ้อม โดยต้องทำการเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาทำการทดสอบ เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการมาตรฐาน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกเพราะเชื้อที่เพาะเลี้ยงจากสิ่งส่งตรวจสามารถเก็บไว้ได้นานและสามารถทำการทดสอบซ้ำได้เมื่อเกิดความผิดพลาดเกิดขึ้น ข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาในการทราบผลการทดสอบ อีกทั้งถ้าผู้ปฏิบัติงานถ้าทำการบดเชื้อจากเชื้อที่เพาะขึ้นจากสิ่งส่งตรวจไม่ดีและไม่ทั่วถึง จะทำให้ไม่ได้ทดสอบกับประชากรของเชื้อทั้งหมดจนทำให้การแปลผลผิดพลาดได้

ในการเลือกวิธีการทดสอบว่าจะใช้วิธีโดยตรงหรือโดยอ้อม ควรพิจารณาตามความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Heifets, 1991) คณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญขององค์การอนามัยโลก ได้แนะนำวิธีการทดสอบการดื้อยาวิธีมาตรฐานไว้ 4 วิธี คือ

I. Resistance ratio : เป็นวิธีที่แนะนำโดยองค์การอนามัยโลก ใช้เปรียบเทียบระดับ Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของยาที่ทำการทดสอบของเชื้อวัณโรคที่ทำการทดสอบกับระดับ MIC ของยาที่ทำการทดสอบของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์มาตรฐาน H37Rv โดยทำการเพาะเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทำการเจือจางแบบ serial two fold dilution และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา บ่มเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ที่ 37°C แล้วอ่านผลถ้าปริมาณ colony ของเชื้อที่ทดสอบ

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียามีปริมาณมากกว่า 20 colonies จะแปลผลว่าเชื้อเจริญได้ในอาหารที่มีระดับยานั้น (positive) ให้อ่านระดับ MIC ของยาจากความเข้มข้นต่ำที่สุดของยาที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารที่ผสมยานั้น แล้วนำระดับ MIC ของเชื้อวัณโรคที่อ่านได้ มาหาอัตราส่วนกับระดับ MIC ของเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน จะได้ค่า Resistance Ratio (R.R) ถ้าค่า R.R มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 8 จะแปลผลว่าเชื้อที่ทดสอบคือต่อยาค้นนั้น ถ้าค่า R.R มีค่าเท่ากับ 4 หรือมากกว่าแต่ไม่ถึง 8 แปลผลว่าเชื้อวัณโรคน่าจะมีการดื้อต่อยาค้นนั้น และถ้าค่า R.R มีค่าเท่ากับ 2 หรือน้อยกว่า สามารถแปลผลได้ว่าเชื้อวัณโรคมีความไวต่อยาค้นนั้น วิธี resistance ratio นิยมใช้ในการทดสอบเพียง 3 ชนิด คือ isoniazid streptomycin และ p-Aminosalicylic acid (PAS) เท่านั้น ส่วนยาที่มีความสำคัญต่อการรักษาวัณโรคอย่าง rifampicin และ ethambutol ไม่มีข้อมูลของการศึกษาถึงอัตราส่วน MIC ของเชื้อวัณโรคต่อยาทั้งสองอย่างกว้างขวางมากนัก ทำให้วิธีการนี้ในปัจจุบันไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (Canetti, et al., 1963)

II. Proportional method : เป็นการทดสอบที่ถือว่าดีที่สุด เพราะเป็นวิธีที่มีความสัมพันธ์กับผลการรักษาทางคลินิกอย่างชัดเจน โดยองค์การอนามัยโลกได้เสนอให้ใช้วิธีนี้ทดสอบบน Lowenstein-Jensen media (L-J medium) เป็นวิธีมาตรฐาน โดยใช้เชื้อวัณโรคที่มีอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์มาทำการทดสอบ ทำการเตรียมเชื้อวัณโรคให้เป็นสารแขวนลอย ใน 0.1% Tween 80 หลังจากนั้นดูดส่วนในสมาทำการปรับระดับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No.1 แล้วทำการเจือจางเป็น 1:100 และ 1:1,000 ต่อจากนั้นนำเชื้อมาทำการทดสอบใน L-J medium ที่มียาในความเข้มข้นที่เหมาะสมและใช้อาหารที่ไม่มียาเป็น control หลังจากบ่มเพาะเชื้อที่ 37°C นาน 3 สัปดาห์ ให้นับจำนวน colony ของเชื้อในอาหารที่มียาและไม่มียา นำมาคำนวณหาสัดส่วนวิกฤตของปริมาณของเชื้อวัณโรคในอาหารที่มียาและไม่มียา ถ้าสัดส่วนวิกฤตมีค่ามากกว่าร้อยละ 1 แปลผลว่าเชื้อคือต่อยาที่ใช้ในการทดสอบ ถ้าสัดส่วนวิกฤตน้อยกว่าร้อยละ 1 แปลผลว่าเชื้อไวต่อยาที่ทำการทดสอบ หลักสำคัญในการทดสอบโดยวิธี proportional คือ การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อและการเจือจางเชื้อลง เพื่อที่จะให้ได้จำนวน colony ที่เพาะเลี้ยงบน L-J medium พอเหมาะ ซึ่งควรจะได้จำนวน colony บน L-J medium ประมาณ 100-150 colonies ใน L-J medium ที่ไม่มียา ถ้าปริมาณของเชื้อที่ใช้ทดสอบมีปริมาณน้อยเกินไปหรือมากเกินไปจะทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ (Canetti, et al., 1963)

III. Absolute concentration : เป็นการตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาซึ่งจะสามารถเพาะเลี้ยงขึ้นบนอาหารที่มียาในปริมาณเหมาะสมได้ โดยใช้ระดับความเข้มข้นวิกฤต (critical concentration) ของยาแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยองค์การอนามัยโลกกำหนดให้ระดับความเข้มข้นความเข้มข้นวิกฤต “เป็นระดับความเข้มข้นของยาที่สามารถใช้แยกแยะระหว่างเชื้อที่ดื้อต่อยาและไวต่อยาออกจากกัน” ซึ่งหาโดยทำการเจือจางยาเป็น serial two-fold dilution ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

แล้วนำเชื้อมาตรฐานที่ไม่เคยได้รับยาต้านวัณโรคมาก่อนไปทดสอบหาค่า MIC ของเชื้อต่อยาชนิดนั้น ระดับความเข้มข้นวิกฤตของยาแต่ละชนิดจะเป็น 4 เท่าของ MIC ของยานั้นเมื่อทดสอบโดยเชื้อมาตรฐานที่ไม่เคยได้รับยาต้านวัณโรคมาก่อน เนื่องจาก Lowenstein-Jensen media ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้ในการทดสอบมีโปรตีนสูงมาก ซึ่งโปรตีนที่มีมากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะจับกับยาที่เติมลงไป ในอาหารนั้น ทำให้ความเข้มข้นของยาลดน้อยลง และการเตรียม Lowenstein-Jensen media ต้องใช้ความร้อนประมาณ 85°C เป็นเวลานาน ซึ่งยาบางชนิดที่ทนความร้อนไม่ได้จะสูญเสียประสิทธิภาพของยาไปด้วย ในการกำหนดค่าความเข้มข้นของยาจึงมีความจำเป็นอย่างมากที่จะต้องคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี Absolute concentration ทำโดยการเตรียมเชื้อให้เป็นสารแขวนลอย จากนั้นดูดส่วนในสมาทำการปรับระดับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland No.1 หลังจากนั้นเจือจางเป็น 1:50 นำเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้วมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาและไม่มียา หลังจากทำการเพาะบ่มเชื้อที่ 37°C นาน 4 สัปดาห์ ถ้าจำนวน colony ของเชื้อวัณโรคที่ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียามีปริมาณมากกว่า 20 colonies เมื่อเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียามีจำนวน colony ประมาณ 2,000 colonies จะแปลผลว่าเชื้อที่นำมาทดสอบคือต่อยาชนิดนั้น เพราะเมื่อนำมาคำนวณกลับจะพบว่าค่าสัดส่วนวิกฤตจะมากกว่าร้อยละ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี proportional วิธี absolute concentration มีข้อดี คือ สามารถจะทดสอบได้ง่ายกว่า และไม่สิ้นเปลืองอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (Canetti, *et. al.* 1963)

IV. Radiometric method : ในปัจจุบันจัดเป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่งในการทดสอบการคือยาของเชื้อวัณโรค ที่อาศัยหลักการเดียวกับ proportional method แต่มีความรวดเร็วกว่าโดยสามารถทราบผลได้ประมาณ 7-10 วัน วิธีนี้ทำการทดสอบโดยใช้เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Middlebrook 7H-9 ที่มีกรด palmitic ที่ทำการ label ด้วย สารกัมมันตภาพรังสี C^{14} เป็นแหล่ง carbon เมื่อเติมยาและเชื้อที่ใช้ทดสอบในปริมาณที่เหมาะสม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7-10 วัน ตรวจวัดการเจริญของเชื้อในขวดที่มียาเทียบกับขวดที่ไม่มียา โดยทำการวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสี beta ที่เกิดขึ้น จากการสร้างก๊าซ carbon dioxide ที่มี C^{14} ที่เกิดจากการที่เชื้อใช้กรด palmitic แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ สารที่ใช้ในการทดสอบเป็นสารกัมมันตภาพรังสีซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการได้ (Siddigi, 1989)

แม้ว่าการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคมีความจำเป็น และเป็นประโยชน์กับผู้ป่วย แต่วิธีการทดสอบที่มีในปัจจุบันยังมีข้อเสีย คือ

- a. ใช้เวลาทดสอบนานประมาณ 3-8 สัปดาห์ ซึ่งไม่ทันต่อความต้องการ
- b. เชื้อวัณโรคที่จะนำมาทำการทดสอบต้องมีอายุที่เหมาะสมและมาจากหลาย ๆ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะถ้าเชื้อที่ไม่ทั่วถึงอาจจะไม่ได้ทดสอบประชากรของเชื้อคือยาที่ปนมากับเชื้อที่ไวต่อยาต้านวัณโรค

- c. ผู้ปฏิบัติการจะต้องมีความชำนาญเป็นอย่างมากเพื่อให้การทดสอบถูกต้องแม่นยำ
- d. ต้องทำการปรับระดับความเข้มข้นของยาหลายระดับ และมีหลายขั้นตอน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการทดสอบ
- e. ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคต้องใช้อาหารเพาะเชื้อจำนวนมาก จึงสิ้นเปลืองต้องใช้ทุนทรัพย์สูง

เนื่องจากปัญหาดังกล่าวข้างต้น และผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่ยากจน จึงพบว่าในขณะนี้ไม่สามารถทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยทุกคน องค์การอนามัยโลก แนะนำให้ประเทศที่กำลังพัฒนาทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค เฉพาะในผู้ป่วยบางกลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยง ได้แก่ (เจริญ ชูโชติถาวร, 2543)

- i. ผู้ป่วยวัณโรคล้มเหลว หลังจากรักษาวัณโรคด้วยสูตรยาใด ๆ
- ii. ผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับการรักษาด้วยยาอย่างไม่สม่ำเสมอ
- iii. ผู้ป่วยวัณโรคใหม่ที่มีประวัติเคยได้รับการรักษาด้วยยารักษาวัณโรคมาก่อน
- iv. ผู้ป่วยวัณโรคที่กลับมาเป็นวัณโรคซ้ำ หลังเคยได้รับการรักษาวัณโรค
- v. ผู้ป่วยวัณโรคที่เคยมีประวัติว่าใกล้ชิดกับผู้ป่วยวัณโรคที่ติดต่อยาวัณโรคมาก่อน
- vi. ผู้ป่วยวัณโรคที่มีประวัติติดยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดดำ
- vii. ผู้ป่วยวัณโรคที่มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย

2.8.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ของเชื้อ *Mycobacterium avium* complex

การทดสอบความไวของเชื้อ MAC ต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ นิยมทำการทดสอบแบบ quantitative test เป็นการทดสอบหาระดับของยาต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อวัณโรคได้ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) วิธีที่นิยมใช้ในการหาค่า MIC ของยาที่ทดสอบได้แก่ วิธี broth macrodilution test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน หลักการของ dilution method คือ การเจือจางสารต้านจุลชีพจากปริมาณมากไปหาน้อย เพื่อดูความเข้มข้นของยาที่แท้จริง หรือใกล้เคียงความจริงที่สุดที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของ bacteria การเจือจางสารต้านจุลชีพทำใน agar หรือ broth ก็ได้ สำหรับการเจือจางใน broth อาจทำใน tube หรือใน microtiter plate มีผู้เรียกวิธีการเหล่านี้ว่า agar dilution , broth dilution และ broth microtiter dilution (พนิดา ชัยเนตร, มาลัย วรจิตร , 2525, 51-60) หลังจากยาถูกเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงใน หรือบนอาหารที่มียาความเข้มข้นต่างๆ เหล่านี้ภายหลังการบ่มเพาะ สังเกตความขุ่นหรือใสของ broth หรือการมีหรือไม่มีเชื้อบน agar แล้วหาค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งไม่ให้เกิดการเจริญเติบโต (มาลิน จุลศิริ, 2542, 33-55) สำหรับ ค่า MIC ของเชื้อ *Mycobacterium* หากจากความเข้มข้นของยาที่ยับยั้งเชื้อมากกว่าร้อยละ 99 หรือ มี percent survival ของเชื้อ น้อยกว่าร้อยละ 1 ภายใน 7 วัน

วิธีมาตรฐานที่ใช้การทดสอบความไวของเชื้อ MAC เพื่อหาค่า MIC มี 2 วิธี

i). Agar dilution test โดยทดสอบบน Muller-Hinton agar pH 7.4 ที่ supplement ด้วย 10% oleic acid-albumin-dextrose catalase (OADC) MIC เฉลี่ยของ MAC ที่มีความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี agar dilution test เท่ากับ 8.0 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ MAC ที่คือต่อยา clarithromycin มี MIC >128 $\mu\text{g/ml}$

ii). Broth dilution test ทำการทดสอบ โดย Middlebrook 7H12 broth pH 7.4 MIC ของ MAC ที่มีความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี broth dilution test เท่ากับ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ MAC ที่คือต่อยา clarithromycin มี MIC >32 $\mu\text{g/ml}$ pH มีผลกับการทดสอบโดยที่ pH 6.8 และ 8.0 MIC ของ MAC ที่มีความไวต่อยา clarithromycin เท่ากับ 1.0 $\mu\text{g/ml}$ และ 4.0 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีทดสอบอื่นๆที่ใช้ในหา MIC ของเชื้อ MAC ได้แก่

a). Radiometric method ผสมยาใน dilution ต่างๆ ในขวดเพาะเชื้อสำเร็จรูปของ BACTEC automatic culture system เพื่อตรวจหาการเจริญของเชื้อ MAC ในอาหารที่ไม่มียาเทียบกับอาหารที่มียาความเข้มข้นต่างๆ และ MIC ของเชื้อที่ไวต่อยา มี break point < 2.0 $\mu\text{g/ml}$ เช่นเดียวกับ broth dilution test

b). E-test[®] เป็นเทคนิคของการทดสอบความไวต่อยาด้านจุลชีพ ที่ให้ผลการทดสอบในเชิงปริมาณ โดยอาศัยหลักการที่ผสมกันระหว่าง dilution test และ diffusion test ทำให้สามารถอ่านผลความไวต่อยาด้านจุลชีพเป็นค่า minimum inhibitory concentration (MIC) โดยใช้แผ่น antibiotic gradient strip ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติก inert บางที่ไม่มีรูพรุน ยาว 60 mm กว้าง 5 mm ด้านหนึ่งของแผ่น E-test[®] จะมียาที่อยู่ในสภาพแห้ง และคงสภาพเคลือบอยู่ โดยมีความเข้มข้นของยาไล่ระดับจากความเข้มข้นมากซึ่งอยู่ตอนบนของ strip เจือจางเป็นความเข้มข้นน้อยที่อยู่ด้านล่าง ความเข้มข้นต่อเนื่องของยาจะมีให้เลือกหลายช่วง โดยช่วงความเข้มข้นของยาจะสอดคล้องกับการเจือจางยาเป็น 15 หลอดของการเจือจางแบบ two-fold dilutions ในการทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution อีกด้านหนึ่งของแผ่น E-test[®] จะมีขีดหรือเส้นแบ่งที่ทำการ calibrate เพื่ออ่านค่า MIC ที่มีหน่วยเป็น $\mu\text{g/ml}$

เมื่อทำการทดสอบจะทำการ inoculate เชื้อที่ปรับความขุ่นบน agar media ที่เหมาะสมเช่นเดียวกับวิธี agar diffusion ก่อนที่จะวางแผ่น E-test[®] บนผิวของ agar media นั้น โดยยาที่มีความเข้มข้นไล่ระดับที่อยู่บนแผ่น E-test[®] จะซึมลงสู่ agar media ทันที ทำให้ agar media ที่อยู่ใต้แผ่น E-test[®] จะมีความเข้มข้นของยาไล่ระดับเช่นเดียวกับแผ่น E-test[®] หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ในระยะเวลาที่กำหนด เชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งจะเจริญจนมองเห็นได้ แต่โดยรอบแผ่น E-test[®] ที่มีความเข้มข้นของยาที่เหมาะสมจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ เกิด inhibition zone ที่มีลักษณะเป็นวงรีรอบแผ่น E-test[®] โดยขอบล่างของ inhibition zone ที่ตัดผ่าน scale บนแผ่น E-test[®] จะแสดงค่า MIC ของยาที่

ความเข้มข้นหน่วยเป็น $\mu\text{g/ml}$ เพื่อให้ผลการทดสอบคงที่ ถูกต้อง และสม่ำเสมอ ยาที่อยู่บนเคลือบบนแผ่น E-test[®] จะต้องทำให้มีความเข้มข้นไล่ระดับกันอย่างสม่ำเสมอ และคงสภาพ (NCCLS, 1993, no.25 – 26)

มีรายงานการใช้ E-test[®] ในการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพสำหรับเชื้อหลายชนิดทั้ง gram negative gram positive bacteria และ yeast เช่น *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* และ *Enterococcus species* รวมทั้ง fastidious bacteria เช่น anaerobes , *Streptococcus pneumoniae* และ *Haemophilus species* เชื้อรา เช่น *Candida spp*(Meletiadiis 2002, Kocazeybek, Arabaci 2002, Terakubo S, et. al. 2001) E-test[®] ถูกนำมาใช้ตรวจหาการดื้อยาของ *M. tuberculosis* เพื่อเป็นวิธีที่รวดเร็ว ซึ่งใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคให้กับผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็วโดยใช้เชื้อ *M. tuberculosis* ที่เพาะเลี้ยงบน Lowenstein-Jensen หรือ Middlebrook agar ให้มีอายุ 4-6 สัปดาห์ จะสามารถอ่านผลความไวต่อยาต้านวัณโรคได้ภายในเวลา 1-2 สัปดาห์ (Sanchez , et. al. 1999) ต่อมา Lebrun และคณะ ประเมินการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC โดยวิธี E-test[®] เทียบกับวิธีมาตรฐาน agar dilution พบว่า E-test[®] ให้ผลการทดสอบเชื้อที่มีความไวต่อยา clarithromycin สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานร้อยละ 70 และให้ผลการทดสอบของเชื้อที่ดื้อยา clarithromycin สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานร้อยละ 100 โดยเชื้อที่มีรายงานผลว่ามีความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี E-test[®] จะต้องมีค่า MIC $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ และเชื้อที่ดื้อต่อยา clarithromycin จะต้องมี MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ และเสนอให้ใช้วิธี E-test[®] ในการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC เพื่อเป็นประโยชน์ในการประเมินความไวของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยอย่างรวดเร็ว (Lebrun, et. al., 1996)

2.9 ผู้ป่วย AIDS กับการติดเชื้อ *Mycobacterium*

เมื่อมีการระบาดของโรคเอดส์ทั่วโลก วัณโรคจัดเป็น opportunistic infections ในผู้ป่วยเอดส์ที่สำคัญมากชนิดหนึ่ง WHO ประเมินว่าถึงกลางปี พ.ศ. 2537 จำนวนผู้ป่วยเอดส์ทั่วโลกจะสูงถึง 16 ล้านคน ประมาณ 1/3 พบเป็นวัณโรค ซึ่งส่วนใหญ่พบในประเทศที่กำลังพัฒนาที่เป็นแหล่งแพร่ระบาดของวัณโรคอยู่แล้ว ทำให้คาดว่าจะมีผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นวัณโรคสูงถึง 5.6 ล้านคน จำนวนนี้ร้อยละ 20 อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้(WHO 1994a) คนปกติเมื่อได้รับเชื้อวัณโรคมีโอกาสติดเชื้อและแสดงอาการเพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ส่วนใหญ่เชื้อจะมีชีวิตในผู้ที่ได้รับเชื้อหลายปีโดยไม่แสดงอาการของโรค แต่ผู้ป่วยเอดส์เนื่องจากการตอบสนองของร่างกายแบบ CMIR ถูกทำลาย เมื่อได้รับเชื้อวัณโรคจะเป็นวัณโรคสูงถึงร้อยละ 50 ส่วนใหญ่เกิดจากการกำเริบของเชื้อที่มีอยู่เดิมในร่างกาย (endogenous infection) แต่อาจมีผลจากการได้รับเชื้อใหม่ (exogenous infection) ก็ได้ เพราะร่างกายไม่สามารถควบคุมเชื้อและมักก่อให้เกิดการติดเชื้อลุกลามที่มีการแพร่ระบาดทั่วร่างกาย(Daley, et al.

1992, Chaisson, et al. 1987) วัณโรคในผู้ป่วยเอดส์จะตรวจพบเชื้อจากเสมหะได้น้อย มักจำเป็นต้องทำการเพาะเชื้อ (Louie, et al. 1989) ถึงแม้พบว่าผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อ HIV จะตอบสนองการรักษาต่อยาต้านวัณโรคได้ดีเช่นเดียวกับในกลุ่มคนปกติเมื่อได้รับการรักษาอย่างสม่ำเสมอและไม่ได้รับเชื้อดื้อยา อาจใช้ยา 2HRZE / 7HR จะพบมีการแพ้ยามากกว่าคนปกติ นอกจากนี้เชื้อวัณโรคจะส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเชื้อ HIV ทำให้การดำเนินไปของโรคเอดส์เร็วขึ้นกว่าปกติ จึงมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 40 และมักเสียชีวิตภายใน 7.4 เดือน ในขณะที่ผู้ป่วยวัณโรคที่ไม่ได้ติดเชื้อ HIV มีอัตราการตายเพียงร้อยละ 4 และอัตราการตายในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ MDR-TB จะสูงถึงร้อยละ 72-89 โดยมักเสียชีวิตภายในระยะเวลาประมาณ 1.5 เดือน (CDC 1991)

2.10 การติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และเชื้อราในผู้ป่วย AIDS

ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจะมีอัตราการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และเชื้อราเพิ่มขึ้น จากรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียในเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ของโรงพยาบาลรามาริบัติ ในปี พ.ศ. 2539 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บ่อยที่สุดได้แก่ *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* และ เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ (มาลัย วรจิตร 2541) ในระหว่างปี พ.ศ. 2531-2536 มีรายงานของโรงพยาบาลศิริราช ถึงการติดเชื้อราหลายโอกาสในเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Cryptococcus neoformans* รองลงมาคือ *Penicillium marneffei*, *Histoplasma*, *Candida* และ *Aspergillus* (สมนีย์ สุขรุ่งเรือง และ อังคนา ฉายประเสริฐ 2541, พรรณกร อิมวิทยา และ จุรี เจียรนัยศิวาลวงศ์ 2541, พรรณกร อิมวิทยา และ ยงค์ รงค์รุ่งเรือง 2541)

2.11 โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์

โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ เป็นโครงการในพระราชประสงค์ของสมเด็จพระศรีนครินทราบรมราชชนนี ให้เป็นบ้านพักผู้ป่วยระยะสุดท้ายโดยวิถีทางพุทธในประเทศไทย จัดตั้งขึ้นในปี พ.ศ. 2535 ในบริเวณวัดพระบาทน้ำพุ อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ได้ให้ที่พำนักและดูแลผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ตั้งแต่ยังไม่แสดงอาการจนถึงผู้ป่วยเอดส์ขั้นสุดท้าย โดยจัดมีบ้านพักให้ผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการประมาณ 2,000 คน และอาคารพยาบาลรวมขนาด 200-300 เตียง สำหรับดูแลผู้เจ็บป่วยขั้นสุดท้ายโดยมีพระสงฆ์โดยการนำของดร.พระครูอาทรประชานาถ แพทย์ พยาบาล และอาสาสมัครให้การดูแลและรักษาผู้ป่วยตามอาการโดยไม่คิดมูลค่า โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์จึงเป็นโครงการที่ต้องอาศัยเงินบริจาคจากผู้มีจิตศรัทธาทั่ว ๆ ไป

จนถึงปัจจุบันโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ได้ดูแลผู้ป่วยเอดส์มากกว่า 10,000 คน และมีผู้ป่วยเสียชีวิตไปแล้วมากกว่า 3,000 คน ผู้ป่วยที่เข้าโครงการมาจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีทั้ง

ชายและหญิง ตั้งแต่เด็กเล็กจนถึงผู้สูงอายุ เนื่องจากบุคลากรที่ช่วยดูแลผู้ป่วยมีจำนวนจำกัดทางโครงการจึงสามารถเปิดดูแลผู้ป่วยเอดส์ขั้นสุดท้ายภายในอาคารผู้ป่วยรวมได้เพียง 45-57 เตียง โดยมีผู้ป่วยเอดส์ขั้นสุดท้ายที่แสดงอาการของโรค เข้าออกเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอเนื่องจากผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวมีอัตราการเสียชีวิตเฉลี่ยต่อวัน สูงถึง 2.7 คน

3. วัตถุประสงค์ :

1. ศึกษาอุบัติการณ์ของการป่วยเป็นวัณโรคจากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่สถานดูแลผู้ป่วยโรคเอดส์ วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ในช่วงระยะเวลา 1 ปี
2. ศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *Mycobacterium avium complex* และ *Mycobacterium species* ต่าง ๆ จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่สถานดูแลผู้ป่วยโรคเอดส์ วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ในช่วงระยะเวลา 1 ปี
3. วิจัย *Mycobacterium tuberculosis Mycobacterium avium complex* และ *Mycobacterium species* ต่าง ๆ ที่แยกได้โดยวิธี conventional method และ Molecular technique
4. ศึกษาความไวต่อยาต้านวัณโรคของ *Mycobacterium tuberculosis* ที่แยกได้เพื่อหาความชุกของเชื้อวัณโรคคือยาหลายชนิด (multiple drug resistant) และหารูปแบบความไวต่อยาต้านจุลชีพ เพื่อนำไปสู่การเลือกใช้ยาที่เหมาะสม
5. ศึกษาความไวต่อยา clarithromycin ของ *Mycobacterium avium complex* ที่แยกได้เพื่อหาความชุกของสายพันธุ์คือยา
6. ศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ และเชื้อราจากเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการใช้นานกว่า 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุให้เกิด bacteremia หรือ fungimia ในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์นอกเหนือจากเชื้อวัณโรค

4. ประโยชน์และการนำไปใช้ :

4.1 ด้านระบาดวิทยา

- 4.1.1 เผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยา ให้ทราบถึงอัตราการป่วยเป็นวัณโรคปอดในผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าพักรักษาตัวในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ที่มีรายได้น้อยจากส่วนต่างๆของประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการดูแลและจัดการผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรคได้อย่างเหมาะสม และเป็นแนวทางเพื่อให้บุคลากรที่ดูแลผู้ป่วยเอดส์ระวังตนเองจากเชื้อวัณโรค ทั้งเป็นข้อมูลทางด้านสาธารณสุขให้ส่วนราชการที่เกี่ยวข้องหาเพื่อหาแนวทางควบคุม ป้องกัน และรักษาการติดเชื้อวัณโรคในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์
- 4.1.2 เผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยา ให้ทราบถึงอัตราการป่วยเป็นวัณโรคในระยะแพร่กระจายในผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าพักรักษาตัวในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการดูแล

แลและจัดการผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรคได้อย่างเหมาะสม ทั้งเป็นข้อมูลทางด้านสาธารณสุข ุขให้ส่วนราชการที่เกี่ยวข้องหาเพื่อหาแนวทางรักษาการติดเชื้อวัณโรคในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์

4.1.3 เผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยา ให้ทราบถึงความชุกของการติดเชื้อและชนิดของเชื้อ non-tuberculous mycobacteria ที่สามารถแยกได้จากเสมหะผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าพักรักษาตัวในโครงการ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย

4.1.4 เผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อที่คือต่อต้านวัณโรคต่างๆทั้งแบบปฐมภูมิ และทุติยภูมิ เพื่อให้ทราบความชุกของการติดเชื้อ MDR-TB ในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ เพื่อให้เห็นถึงความสำคัญของการทดสอบความไวต่อต้านวัณโรค

4.1.5 เผยแพร่ข้อมูลทางระบาดวิทยา ให้ทราบถึงความชุกของการติดเชื้อและชนิดของแบคทีเรีย และเชื้อราอื่นๆ ที่สามารถแยกได้จากเลือดผู้ป่วยเอดส์ในโครงการ ที่มีอาการไข้นานกว่า 2 สัปดาห์ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย

4.2 ด้านการรักษาและควบคุมโรค

4.2.1 จาก susceptibility patterns ต่อต้านวัณโรคชนิดต่างๆ ของกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ สามารถเป็นข้อมูลในการปรับปรุงการใช้ยาเพื่อรักษาผู้ป่วยต่อไป

4.2.2 จาก MIC ของยา clarithromycin ของ *M. avium* complex ที่แยกได้ จะทราบว่าสายพันธุ์ของ *M. avium* complex ที่พบในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย ยังมีความไวต่อยานี้หรือไม่ เนื่องจากปัจจุบันยา clarithromycin เป็นยาสำคัญที่เลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วย

4.2.3 จากผลการย้อมโดยตรงและการเพาะเชื้อเพื่อหาเชื้อ *M. tuberculosis* และ non-tuberculous mycobacteria รวมทั้งผลความไวต่อต้านจุลชีพของเชื้อ *M. tuberculosis* และ *Mycobacterium avium* complex จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยให้ได้รับการรักษาอย่างรวดเร็ว จึงช่วยควบคุมการแพร่กระจายของโรค

4.2.4 ใ้บุคลากรและอาสาสมัครที่ดูแลผู้ป่วยเอดส์หาแนวทางป้องกันตนเอง และผู้ป่วยอื่นๆ จากเชื้อวัณโรค

4.3 ด้านการศึกษาวิจัย

4.3.1 ติ พิมพ์ผลงานทางวิชาการในวารสารที่เป็นที่ยอมรับอย่างน้อย 1 เรื่อง

4.3.2 เก็บรักษาเชื้อที่แยกได้เพื่อทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

อาจเป็นโอกาสในการแยกเชื้อ nontuberculous mycobacteria species ต่างๆ ที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือ

1 . Analytical balance (A200S)	Sartorius
2 . Autoclave (H-88 LL)	Enshinki
3 . Automatic pipette (10-50 ml)	Nichiryo
4 . Automatic pipette (10-50, 200-1000 μ l)	Nichiryo
5 . BACT /Alert	Organon Teknika
6 . BACTEC fluorescent 9240	Becton Dickinson
7 . Chest Freezer -20°C	Singer
8 . CO2 incubation (EG 115 IR)	Jouan
9 . Deep Freezer	Kelvinator
10 . Deep freezer -70°C (UC109)	Kelvinator
11 . Digital pH meter (8417)	Hanna
12 . Fume hood	Trane Intl.Co.,Ltd.
13 . Fluorescent Microscope รุ่น BX 60	NIKON
14 . Horizontal gel electrophoresis (AF – 6100)	ATTO
15 . Hot air Oven (U50)	Memmert
16 . Hot plate stirrer	Thermolyne
17 . Laminar air flow cabinet (Bio 48)	Faster
18 . Microcentrifuge (spectrafuge 16 M)	Labnet
19 . Microscope (Alphaphot2)	Nikon
20 . pH meter	Hanna
21 . Pipette boy	Tecnomarra
22 . Polaroid camera	GelCam
23 . Power supply (ELED – PHOE 400)	KW PACK
24 . Refrigerated centrifuge (GR4.11)	Jouan
25 . Smart flame	Gibthai Co. ,Ltd.
26 . Spectrophotometer (Spectronic 21)	Milton Roy Co

27 . Trip balance	OHAUS
28 . UV transilluminator	Viber Lourmat
29 . Vortex mixer (Genie-2)	Scientific Industries
30 . Water bath	Grant
31 . Water bath (350T)	Memmert
32 . Thermal cycler (PTC – 200)	MJ Research
33 . เครื่องทำลายไข่ม (Neospark)	Neoplat Co.,Ltd

2. อุปกรณ์

1. Amber glass bottle (100, 500 ml)	Pyrex
2. Beaker (50, 100, 500, 1000, 2000 ml)	Pyrex
3. Bio Freeze vials (2 ml)	Costar
4. Calibration inoculating loop (0.01 ml)	Calibrated Delivery
5. Centrifuge tube (50 ml)	Falcon
6. Cylinder (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Pyrex
7. Erlenmeyer flask (250, 500, 1000 ml)	Pyrex
8. Examination latex glove	Dula latex
9. Face mash	Bio Safe
10. Forceps	Hilbro Stainless
11. Freezing boxes	USA/Scientific Plastic
12. Funnel	Pyrex
13. Glass bead (diameter 2 mm)	Normschliff Geratebau
14. Glass slide	Sail BRAND
15. McCartney bottle	American Scientific Product
16. Millipore membrane (syringe filter, 0.22 μ)	Gelman Sciences
17. Microcentrifuge tube (1.5 ml และ 0.2 ml)	USA/Scientific Plastic
18. Parafilm M	3M
19. Pasture pipette	Pyrex
20. Pipet tip	USA/Scientific Plastic
21. Screw cap test tube (16 x 150, 13 x 150 mm)	Pyrex
22. Serological pipette	Pyrex
23. Stop watch	Smiths
24. Syringe	Terumo Corp

- | | |
|---|------------------|
| 25. Vacutainer® Blood Collection Set | Becton Dickinson |
| 26. Volumetric flask (50, 100, 250, 500 ml) | Pyrex |
| 27. Wash bottle (500 ml) | Nulgene |

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- | | |
|--|--------------------|
| 1 . Agar | BBL |
| 2 . Albumin Dextrose Catalase (ADC) | BBL |
| 3 . Bacto urea agar base | BBL |
| 4 . Dextrose | Merck |
| 5 . Dobos Tween – albumin | BBL |
| 6 . Lowenstein Jensen media, powdered base | BBL |
| 7 . MacConkey agar without crystal violet | BBL |
| 8 . MB/BacT systems | Organon Teknika |
| 9 . MB/BacT antibiotic supplement | Organon Teknika |
| 10 . Middlebrook 7H10 agar, powdered base | Difco Laboratories |
| 11 . Middlebrook 7H9 broth, powdered base | Difco Laboratories |
| 12 . BACTEC Myco/F lytic blood culture | Becton Dickinson |
| 13 . Oleic acid-albumin-dextrose complex | Difco Laboratories |
| 14 . Peptone | Merck |
| 15 . Trypticase soy agar | BBL |
| 16 . Hemoglobin | BBL |
| 17 . Sabouraud dextrose agar | BBL |
| 18 . MacConkey agar with crystal violet | BBL |
| 19 . Mueller Hinton Agar | BBL |
| 20 . GC agar base | BBL |

4. ผู้ป่วย

ผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าร่วมโครงการเป็นผู้ป่วยเอดส์ที่อยู่ในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 - มกราคม 2545 จากผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มคือผู้ป่วยในอาคารพยาบาล มี 2 หน่วย คือ บ้านวลัยลักษณ์ และ โรงพยาบาล และผู้ป่วยบ้านพักที่แบ่งเป็น zone ต่าง ๆ ที่พบพยาบาลเฉพาะในกรณีเจ็บป่วย

4.1 การคัดเลือกผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ

A. ผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกของวัณโรคที่ปอดอย่างใดอย่างหนึ่งต่อไปนี้ ไอเรื้อรัง หรือไอเป็นเลือด, เจ็บหน้าอก, เหนื่อยหอบ, น้ำหนักลด, เหงื่อออกตอนกลางคืน และมีไข้เรื้อรัง

B. ผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อในกระแสโลหิต โดยมีอาการไข้นานกว่า 1 สัปดาห์ หรือมีอาการทางคลินิกของวัณโรคนานกว่า 2 สัปดาห์

4.2 ประวัติผู้ป่วย

ทำการสอบประวัติผู้ป่วยและบันทึกข้อมูล ได้แก่ ชื่อ รหัส อาการ ประวัติการป่วยเป็นวัณโรค การได้รับยาต้านวัณโรคในช่วงระยะเวลา 1 เดือน และประวัติการใช้ยาต้านวัณโรค ในอดีต เพื่อให้ทราบการดื้อยาที่เกิดขึ้นเป็นชนิด acquired resistance หรือ initial resistance

5. สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจ แบ่งเป็น 2 ประเภท

5.1 เสมหะ

เก็บเสมหะจากผู้ป่วยเอดส์ทั้งหมดในโครงการที่แสดงอาการติดเชื้อที่ปอดดังข้อ 5.1 มาไม่ต่ำกว่า 2 สัปดาห์ เก็บเสมหะผู้ป่วยตอนเช้า 1-3 วันต่อกัน ใส่ภาชนะสะอาดปากกว้างที่มีฝาปิดมิดชิด ทำความสะอาดด้านนอกของภาชนะ ดิจฉลาก ชื่อ รหัส และวันที่เก็บ เก็บใส่ถุงพลาสติก 2 ชั้น เก็บที่ 4°C นำส่งห้องปฏิบัติการทุก 3 วัน พร้อมแบบสอบถามและใบยินยอม

5.2 เลือด

จากผู้ป่วยเอดส์ทั้งหมดที่อยู่ในโครงการ ที่แสดงอาการไข้นานกว่า 1 สัปดาห์ หรือมีอาการของวัณโรค เจาะเลือด ด้วย Vacutainer® Blood Collection Set ใส่ขวด BACTEC Myco/F lytic blood culture 5 ml ดิจฉลาก ชื่อ รหัส และวันที่เก็บ เก็บที่อุณหภูมิห้อง นำส่งห้องปฏิบัติการภายในวันเดียวกัน พร้อมแบบสอบถามและใบยินยอม

6 การเพาะเชื้อจากเสมหะ

6.1 การเตรียมเสมหะก่อนการเพาะเชื้อ

ทำการกำจัดสารปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ และละลายเสมหะด้วยด้วย N-Acetyl-L-Cystine-NaOH (NALC-NaOH) (Kent & Kubica 1985) ดังนี้

6.1.1 การเตรียมน้ำยาเคมี

i. NALC-NaOH : ชั่ง 0.5 g ของ NALC นำมาละลายใน 2.9% sodium citrate 50 ml และ 4% NaOH 50 ml ก่อนใช้งาน

ii. 0.067 M Phosphate buffer pH 6.8 :

- Stock disodium phosphate: ละลาย 9.47 g anhydrous Na_2HPO_4 ในน้ำกลั่น 1L

- Stock monopotassium phosphate : ละลาย 9.07 g KH_2PO_4 ใน น้ำกลั่น 1 L

- ผสม stock disodium phosphate กับ stock monopotassium phosphate ปริมาตร

1:1 ปรับ pH เท่ากับ 6.8

6.1.2 ถ่ายเสมหะ 5-10 ml ใส่หลอด centrifuge tube ขนาด 50 ml เติม NALC-NaOH ในอัตราส่วน 1:1 ปิดฝาให้สนิท เขย่าด้วย vortex mixer 20 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที

6.1.3 เติม sterile phosphate buffered pH 6.8 ให้ได้ปริมาตร 45 ml นำไป centrifuge ที่ 3,000 x g 15 นาที ให้ได้ 95% sediment เทส่วนใสออกใส่ในภาชนะที่ป้องกันการกระเด็นที่มี 5% phenol

6.1.4 เติม 1 ml sterile phosphate buffered pH 6.8 ผสมให้เข้ากัน นำตะกอนไปเพาะเชื้อ และ ย้อม acid fast stain โดยวิธี Ziehl-Neelsen

6.1.5 ภาชนะใส่เสมหะเก็บไปทำการฆ่าเชื้อ โดย autoclave 121°C 30 นาที

6.2 การเพาะเชื้อ (Tortoli , et. al, 2000)

ติดผลจากข้อผู้ป่วย รหัส วันที่ บนขวดอาหารเหลวสำเร็จรูป MB/BacT systems (Organon Teknika) ที่เติม MB/BacT antibiotic supplement และ Lowenstein-Jensen medium (L-J) 1 ขวด ดังนี้

6.2.1 เติม 0.2 ml ของ sediment ของเสมหะที่เตรียมในข้อ 7.1.4 ใส่บน L-J และ เติม 0.5 ml ของ sediment ลงในขวด MB/BacT

6.2.2 นำขวด MB/BacT ไปบ่มเชื้อที่ 37°C ใน BACT /Alert จนกว่าเชื้อจะขึ้น

6.2.3 ถ้าเชื้อเจริญในขวด MB/BacT ให้นำไปย้อม acid fast ถ้าพบ acid fast bacilli นำ 0.2 ml เพาะลงใน L-J medium แต่ถ้าพบมีการปนเปื้อนให้ทำ decontamination อีกครั้งก่อนนำมาเพาะใส่ใน L-J

6.2.4 บ่มเชื้อใน L-J ทั้งหมดที่ 37°C ในที่มืด และตรวจดู colony ของเชื้อทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อเชื้อขึ้นเป็น mature colony ให้นำมาวางใต้แสงไฟ 1 ชั่วโมง

6.2.5 บันทึกลักษณะ colony สี ก่อนและหลังถูกแสง และระยะเวลาที่เชื้อขึ้น นำไปแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* โดย conventional method และ PCR-REA

6.3 การเพาะเชื้อจาก Hemoculture (Waite RT, Woods GL, 1998)

ทำการเพาะเชื้อจาก BACTEC Myco/F lytic blood culture เพื่อหาเชื้อ *Mycobacterium* แบคทีเรียและเชื้อรา อื่น ๆ ดังนี้

6.3.1 นำขวด BACTEC Myco/F lytic blood culture ใส่ในเครื่อง BACTEC Automatic culture system ซึ่งจะบ่มเชื้อที่ 37 °C โดยมีการเขย่าขวดเป็นครั้งคราว

6.3.2 เมื่อเชื้อขึ้นนำไปย้อม fluorochrome acid fast stain และ Gram's stain ถ้าไม่พบเชื้อ AFB ให้นำมาย้อมซ้ำทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ก่อนรายงาน การไม่พบเชื้อ AFB

6.3.3 Blood culture ที่พบเชื้อ AFB หรือ hemoculture ที่ บ่มเชื้อไว้นานถึง 8 สัปดาห์ ใช้ เข็มและ syringe ดูด hemoculture 0.2 ml ไปเพาะเชื้อบน L-J medium บ่มเชื้อที่ 37 °C ในที่มืด ตรวจสอบหา colony ของเชื้อ *Mycobacterium* บน L-J medium ทุก สัปดาห์ เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ เมื่อเชื้อขึ้นเป็น mature colony นำมาวางใต้แสงไฟ 1 ชั่วโมง นำเชื้อไปย้อม acid fast ถ้าพบ acid fast bacilli จึง รายงานว่าพบเชื้อ บันทึกลักษณะและสี colony ก่อนและหลังถูกแสง และระยะเวลาที่เชื้อขึ้น นำไป แยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* โดย Conventional method และ PCR-REA

6.3.4 Hemoculture ที่ย้อม Gram's stain พบเชื้อแบคทีเรียให้นำไปเพาะเชื้อบน blood agar MacConkey agar และ chocolate agar บ่มเชื้อที่ 37 °C 24-48 ชม. ถ้าย้อมพบ budding yeast หรือสาหร่าย ให้นำไปเพาะใน Sabouraud dextrose agar บ่มเชื้อที่ 30 °C และ ใน blood agar บ่มเชื้อที่ 37 °C 1-7 วัน เชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อราที่เจริญบน blood agar MacConkey agar และ chocolate agar หรือ Sabouraud dextrose agar ให้นำไปแยกวินิจฉัยต่อไป

6.4 การย้อม acid fast stain โดยวิธี Ziehl-Neelsen (Kent & Kubica 1985)

ทำการย้อม acid fast stain สิ่งส่งตรวจทั้ง direct Examination ย้อมโดยตรงจากเสมหะ Concentration Smear ย้อมตะกอนที่ได้จากการเตรียมเสมหะ ดังนี้

6.4.1 ย้อม Acid fast stain

Strong Ziehl-Neelsen :

- Stock carbol fuchsin: 3 g basic fuchsin ใน 95% ethyl alcohol 100 ml
- ผสม stock carbol fuchsin 10 ml กับ 5 g% phenol 90 ml ใส่ขวดสีชา

Acid alcohol : ค่อย ๆ เติม 3 ml conc. hydrochloric acid ลงใน 95% ethyl alcohol 97 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บใส่ในขวดสีชา

Methylene blue: 0.3 g methylene blue chloride ในน้ำกลั่น 100 ml ใส่ขวดสีชา

6.4.2 จัด slide ที่ใหม่และสะอาดปราศจากไขมันด้วยดินสอเขียนแก้วเป็นพื้นที่ 1x2 cm ติดฉลากชื่อผู้ป่วย รหัส วันที่ smear เสมหะ 1 loop full เป็น direct smear และ หยด sediment 0.1 ml ของเสมหะที่เตรียมในข้อ 6.1.4 smear ในพื้นที่ 1 x 2 cm เป็น concentration smear อย่างละ slide ทิ้งให้แห้งในตู้ biohazard Heat fix

6.4.3 นำไปย้อมโดยวิธี Ziehl-Neelsen โดยนำ slide ไปอังไอน้ำร้อน หยดสี strong Ziehl-Neelsen carbol fuchsin ให้ท่วม smear ประมาณ 5 นาที ระวังอย่าให้สีแห้ง

6.4.4 ล้างออกด้วยน้ำ แล้วล้างออกด้วย acid alcohol จนใส และล้างทิ้งไว้ 1 นาที

6.4.5 หยดสี methylene blue ให้ท่วม smear ประมาณ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วทิ้งแห้งโดยไม่ทำการซับให้แห้ง

6.4.6 ตรวจใต้กล้องกำลังขยาย 1,000 เท่า ตลอดในระยะทาง 2 cm ไปกลับ 3รอบ ระวังไม่ให้ทับ field เดิม จะได้ประมาณ 300 fields

6.4.7 รายงานจำนวนเชื้อ ดังนี้

0	AFB/ 300 fields	Negative
3-9	AFB/ 300 fields	1+
>10	AFB/ 300 fields	2+
10	AFB/ 1 field	3+

6.5 การย้อมสี วิธี Auramine O Fluorescence acid fast stain (Kent & Kubica 1985) :

6.5.1 การเตรียมสีย้อมวิธี Fluorochrome Acid-Fast Stains(Smithwick, 1976)

Auramine-0 solution : 0.3 g Auramine-0 ในน้ำกลั่น 100 ml ที่มี 3 g% phenol เตรียมก่อนใช้งาน

Acid alcohol สำหรับ fluorochrome : ค่อยๆ เติม 0.5 ml concentrated hydrochloric acid (conc. HCl) ลงใน 95% ethanol ซ้ำๆ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml เก็บในขวดสีน้ำตาล

0.5% Potassium permanganate: 0.5 g potassium permanganate ในน้ำกลั่น 100 ml เก็บไว้ในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6.5.2 จีด slide ที่ใหม่และสะอาดปราศจากไขมันด้วย ดินสอเขียนแก้วเป็นพื้นที่ 1x2 cm ติดฉลากชื่อผู้ป่วย รหัส วันที่ ใช้ syringe ดูด hemoculture 0.1 ml smear ในพื้นที่ 1 x 2 cm ทิ้งให้แห้งในตู้ biohazard

6.5.3 Fix ใน 95% methanol แล้วนำไปย้อมด้วย Auramine O solution 15 นาที

6.5.4 ล้างด้วย deionized water แล้วล้างด้วย 0.5% HCl acid alcohol 2 นาที

6.5.5 ล้างด้วย deionized water ย้อมทับด้วย 0.5% potassium permanganate 2 นาที ล้างด้วย deionized water ทิ้งแห้งโดยไม่ทำการซับให้แห้ง

6.5.6 ตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 250-450 เท่า ประมาณ 70 fields

6.5.7 รายงานจำนวนเชื้อ ดังนี้

0	AFB/ 70 fields	Negative
2-18	AFB/ 50 fields	1+
4-36	AFB/ 10 fields	2+
>4	AFB/ 1 field	3+

6.6 การแยกวินิจฉัย *Mycobacterium* sp. โดย Conventional method (Kent & Kubica 1985)

การแยกวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* จาก Nontuberculous mycobacteria โดย conventional method ตามวิธีของ Kent และ Kubica อาศัยคุณสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 3-7 (Kent & Kubica, 1985) โดยอาศัยอัตราการเจริญเติบโต ลักษณะ colony การสร้างรงควัตถุ และการทดสอบชีวเคมี ได้แก่

6.6.1 Arylsulfatase 3 วัน และ 14 วัน

6.6.1.1 อาหารทดสอบ : Middlebrook 7H 9 ที่ supplement with 10% ADC 200 ml 2 flask เติม enzyme substrate stock solution (2.6 g phenolphthalein disulfate เกลือ tripotassium ในน้ำกลั่นที่ต้มแล้ว 50 ml (จะได้สารละลาย 0.08 M) กรองผ่านกระดาษ membrane filter 0.22 μ m)

Arylsulfatase 3 วัน : เติม enzyme arylsulfatase substrate stock solution 2.5 ml / flask ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.001 M แบ่งสารละลายที่ได้ปริมาณ 2 ml ใส่ในหลอด screw cap ขนาด 16 x 125 mm

Arylsulfatase 14 วัน : เติม enzyme arylsulfatase substrate stock solution 7.5 ml / flask ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.003 M แบ่งสารละลายที่ได้ปริมาณ 2 ml ใส่ในหลอด screw cap ขนาด 16 x 125 mm

6.6.1.2 Inoculate ทั้ง 2 หลอดด้วย 1 loop ของเชื้อทดสอบที่เติบโตดีบน L-J medium incubate ที่ 37°C หลังจาก incubate 3 วัน หยด 2N Na₂CO₃ 6 หยด ลงในหลอดหลอดอาหารทดสอบ Arylsulfatase 3 วัน หลังจาก incubate 14 วัน หยด 2N Na₂CO₃ 6 หยด ลงในหลอดอาหารทดสอบ Arylsulfatase 14 วัน

การอ่านผลการทดลอง : Positive : เปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือแดง เมื่อเติม 2N Na₂CO₃ solution
Negative : สีไม่เปลี่ยนแปลง

6.6.2 Heat Stable Catalase Test :

เจียเชื้อทดสอบลงใน screw cap tube ที่มี 0.5 ml ของ 0.067M phosphate buffer, pH 7 นำไป incubate ใน water bath อุณหภูมิ 68°C 20 min ปลอຍให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 0.5 ml Tween-peroxide mixture (10% Tween 80 กับ 30% hydrogen peroxide ในอัตราส่วน 1:1) ปิดฝาหลวมๆ ดูการเกิดฟอง ระหว่างดูห้ามเขย่าหลอด หลอดที่ negative ให้ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีก่อน

การอ่านผลการทดลอง Positive : มีฟองเกิดขึ้น
Negative : ไม่เกิดฟอง

6.6.3 Niacin Test

เติมน้ำกลั่น หรือ saline ที่ปราศจากเชื้อจำนวน 1 ml ลงใน L-J slant ที่จะทำการทดสอบ ใช้เข็มเขี่ย จิ้มลงในเนื้อ media หลาย ๆ ครั้ง วางหลอดเอียง เพื่อให้ของเหลวคลุมผิวหน้า slant ทิ้งไว้ ≥ 15 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่อยู่บน slant นำไป autoclave หลังจากนั้น ดูดของเหลว 0.5 ml ใส่ลงใน screw cap tube ที่สะอาด เติม 4% aniline และ 10% cyanogen bromide อย่างละ 0.5 ml ดูการเปลี่ยนสีของสารละลายทันที

การอ่านผลการทดลอง Positive : เกิดสีเหลือง
Negative : สีไม่เปลี่ยนแปลง

6.6.4 Nitrate Reduction Test

เจียเชื้ออายุ 4 สัปดาห์ จาก culture ที่อยู่บน L-J medium ลงในหลอด screw cap tube ขนาด 16x125 mm ที่มีน้ำกลั่น sterile 0.2 ml เติม 2 ml sterile nitrate reduction test medium (0.85 g NaNO₃ ใน 0.022M phosphate buffer, pH 7.0 100 ml) เขย่าให้เข้ากันบ่มที่ 37°C 2 ชม. เติม nitrate reagent I (50% HCl) 1 หยด, nitrate reagent II (0.2% sulfanilamide) 2 หยด และ nitrate reagent III (0.1% N-naphthylethylenediamine dihydrochloride) 2 หยด ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้เติมผงสังกะสี (zinc dust) เล็กน้อย เขย่าอ่านผล

การอ่านผลการทดลอง

เมื่อเติมน้ำยา nitrate	Positive : ให้สีชมพูอ่อน(±) ถึง สีแดง(5+)
เมื่อเติม zinc dust	Positive : น้ำยาจะใสไม่เปลี่ยนสี
	Negative : เปลี่ยนเป็นสีแดง

6.6.5 การเจริญบน MacConkey

นำเชื้อ 1 loop จาก broth culture ที่เตรียมไว้มา inoculate บน MacConkey ที่ไม่มี crystal violet ให้เป็น spiral โดยเริ่มจากกลาง plate วนออกไปจนถึงขอบโดยใช้ turn table incubate ที่ 28°C ไม่ต้อง incubate ใน CO₂ incubator อ่านผลที่ 5 และ 11 วัน

6.6.6 Pyrazinamidase

Inoculate เชื้อที่เจริญดีจำนวนมาก ๆ ลงบนผิว Dubos agar incubate 2 หลอด เมื่อ incubate ครบ 4 วัน ให้นำหลอดหนึ่งมาเติม 1% ferrous ammonium sulfate ลงไป 1 ml ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วตรวจดู แถบสีชมพู ในเนื้อ medium หลอดที่ไม่มี band เกิดขึ้นให้นำไปแช่ตู้เย็นนาน 4 ชม. แล้วนำออกมาดู band ถ้าภายใน 4 วัน ให้ผลลบ ก็นำหลอดที่เหลือที่ incubate ไว้ 7 วัน มาทดสอบเช่นเดียวกับหลอดแรก

การอ่านผลการทดลอง	Positive : เกิดแถบสีชมพู (pink band) ในเนื้อวุ้น
	Negative : ไม่มีแถบสีชมพูเกิดขึ้น

6.6.7 การเจริญใน 5% NaCl

ใส่ suspension ของเชื้อที่เจริญกำลังดี 0.1 ml ลงบน slant ของ L-J media ที่มี 5% NaCl และ control ที่ไม่ผสม NaCl incubate ที่ 28°C ตรวจดูการเจริญทุกสัปดาห์ จนถึง 4 สัปดาห์

การอ่านผลการทดลอง	Positive : เชื้อเจริญทั้งในหลอดที่มี NaCl และหลอด control
	Negative : เชื้อเจริญเฉพาะหลอดที่เป็น control เท่านั้น

6.6.8 Tellurite Reduction Test

ใส่เชื้อที่เจริญดีจำนวนมาก ๆ ลงใน 7H-9 medium incubate ที่ 35°C 7 วัน หยดสารละลาย 0.2% potassium tellurite 1 หยด ลงใน test medium เขย่า นำกลับไปที่ incubate ที่ 35°C ต่อไปอีก 3 วัน ช่วงนี้อย่ำเขย่าหลอดเมื่อ incubate ครบ 3 วันนำมาตรวจดูเซลล์ที่ตกตะกอนที่อยู่ก้นหลอด อย่ำเขย่าหลอดระหว่างตรวจผล

การอ่านผลการทดลอง Positive : มีตะกอนสีดำของ metallic tellurium เกิดขึ้น
Negative : ไม่เกิดตะกอนสีดำ

6.6.9 Tween Hydrolysis

ใส่เชื้อที่เจริญกำลังดี 1 loop ลงใน sterile tween hydrolysis substrate (0.5% Tween 80 ใน 0.067 M Phosphate buffer pH 7.0 ที่มี 0.002% neutral red) incubate 35°C สังเกตผลในวันที่ 1, 5 และ 10 ขณะดูไม่เขย่า tube

การอ่านผลการทดลอง Positive : สี substrate เปลี่ยนเป็นชมพูแดง
Negative : สีของ substrate สีเหลืองดำหลังจาก incubate นาน 10 วัน

6.6.10 Urease Test

ใส่เชื้อ 1 loop ลงใน urease broth incubate ที่ 35°C อ่านผล 1, 3 และ 7 วัน

การอ่านผลการทดลอง Positive : สี broth เปลี่ยนจาก เหลืองเป็นสีชมพูเข้ม หรือแดง
Negative : สีของ broth ไม่เปลี่ยนแปลง

7 การแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* โดยการ Amplification of 16S-23S Ribosomal DNA Spacer (Sansila et al., 1998)

7.1 การเตรียม chromosomal DNA

เปรียบเทียบการสกัด chromosomal DNA ของ *Mycobacterium* ด้วยวิธีที่ต่างกัน 3 วิธี คือ

7.1.1 การสกัด Chromosomal DNA โดยการต้ม (Khosavi, et al. 1998)

ชุดเชื้อที่ได้แยกได้บน L-J medium 1 loop ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 500 µl นำไปต้มที่ 100°C นาน 15 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนที่ใสใส่หลอดใหม่ เก็บไป DNA solution ที่ -20°C

7.1.2 การสกัด Chromosomal DNA ด้วย CTAB (Samsila, et al. 1998)

7.1.2.1 ขูดเชื้อที่แยกได้บน L-J medium 1 loop ใส่ใน microcentrifuge tube ที่มี TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 400 μ l นำไปอุ่นใน water bath 80°C นาน 20-30 นาที

7.1.2.2 เติม lysozyme (10 mg/ml; filter sterile) 50 μ l mix incubate ที่ 37°C 1 คืน

7.1.2.3 เติม 10% SDS จำนวน 70 μ l และ 0.1 % proteinase K 5 μ l เขย่าเบาๆนำไป incubate ที่ 65°C 10 นาที

7.1.2.4 เติม 5 M NaCl 100 μ l และ CTAB : NaCl 100 μ l ผสมด้วย vortex mixer จนสารละลายเป็นสีขาว

7.1.2.5 เติม chloroform solution (chloroform : isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1) จำนวน 750 μ l เขย่าเบาๆนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที

7.1.2.6 นำส่วนใสใสหลอดใหม่ เติม isopropanol หรือ absolute ethanol 450 μ l นำไป incubate ที่ -20°C นาน 30 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 15 นาที

7.1.2.7 เทส่วนใสทิ้งเติม 70% cold ethanol 250 μ l นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm ทำซ้ำ 2 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทิ้งให้ได้ตะกอน DNA แห้ง

7.1.2.8 ละลายตะกอนด้วย TE buffer 20 μ l และเก็บ DNA solution ที่ -20°C

7.1.3 สกัด chromosomal DNA วิธี mechanical lysis (Palittapongarnpim et al. 1993)

7.1.3.1 ขูดเชื้อที่แยกได้ที่เจริญบน L-J medium 1 loop ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มี 0.5 ml siliconized acid-washed glass beads ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 425-600 μ m นำไป vortex 1 นาที แช่น้ำแข็ง 1 นาที ทำสลับกัน 10 ครั้ง

7.1.3.2 เติม 300 μ l ของ TE buffered และ 500 μ l ของ saturated phenol solution pH 8.0 ผสมเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 10 นาที

7.1.3.3 นำส่วนใสด้านบนไป extract DNA โดยเติม phenol : chloroform solution ในปริมาณที่เท่ากัน จนกระทั่งไม่เกิดตะกอนที่รอยต่อของ phenol : chloroform solution แล้วนำไป extract ซ้ำด้วย chloroform solution

7.1.3.4 ตกตะกอน DNA โดยเติม cold absolute ethanol (-20°C) ปริมาตรเป็น 2 เท่าละลายตะกอนที่ได้ใน 50 μ l ของ TE buffered นำไป treated ด้วย 100 μ g/ml ของ RNAase ที่ 37°C 30 นาที เก็บ DNA solution ที่ -20°C

7.2 ตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ DNA

การประเมินความเข้มข้นของ DNA ด้วย spectrophotometer โดยทำการวัด absorbance ของ DNA ที่สกัดได้ที่ความยาวคลื่น 260 nm ที่ OD = 1 จะมี DNA 50 µg/ml จากนั้นทำการตรวจ purity ของ DNA ที่สกัดได้ โดยการวัด absorbance ที่ 280 nm และคำนวณสัดส่วนของค่า absorbance ที่ 260/280 nm

7.3 Amplify 16S-23S rRNA gene spacer

การทำ PCR เพื่อ amplify 16S-23S rRNA gene spacer ซึ่งเป็นส่วนที่มีความจำเพาะใน *Mycobacterium* แต่ละ species โดยวิธีของ Sansila et al. 1998

7.3.1 DNA Primer : ใช้ DNA Primer ในการ amplify 16S-23S rRNA gene spacer 1 คู่ โดยใช้ nucleotide sequence ที่เลือกจาก 3' end ของ 16S rDNA gene (16 SC) และ 5' end ของ 23S rDNA gene (23 SG) ที่เหมือนกันใน *Mycobacterium* แต่ละ species และไม่พบใน bacteria ชนิดอื่น (Sansila et al. 1998) ซึ่งมี sequence ดังนี้

17-mer 16 SC : 5'-TCGAAGGTGGGATCGGC-3'

อยู่ห่างจาก 16S-23S rRNA gene spacer ขึ้นมา 63 bp

18-mer 23 SG : 5'-GCGCCCTTAGACACTTAC-3'

อยู่ห่างจาก 16S-23S rRNA gene spacer ลงมา 2 bp

7.3.2 PCR reaction mixture : การ amplify 16S-23S rDNA spacer ทำใน PCR reaction mixture 50 µl ที่มี 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 200 µM ของ ATP, CTP, GTP และ UTP, 0.1 U Uracil-DNA glycosylase (UDG), 1 µM ของ 16 SC primer และ 23 SG primer , 2.5 U *Taq* polymerase และ 0.2 ng ของ DNA template

7.3.3 PCR conditions : นำ PCR reaction mixture 50 µl ไป incubate ที่ 37°C 10 นาที เพื่อป้องกัน carry-over แล้วจึงทำ PCR 31 cycles โดยแต่ละ cycle เป็นดังนี้ denaturation ที่ 94°C 1 นาที, annealing ที่ 62°C 3 นาที และ extension ที่ 72°C 1 นาที เมื่อครบ 31 cycles incubate ที่ 72°C 20 นาที เพื่อ inactivate UDG

7.3.4 การตรวจหา PCR product ทำโดยผสม 5 μ L PCR product ที่ amplify ได้กับ 2 μ L ของ loading buffer นำไป run electrophoresis บน 20 x 20 cm 3% NuSieve 3:1 agarose gel ใน TBE buffer ที่ 100 volts เป็นระยะทาง 15 cm นำไปย้อมด้วย ethidium bromide โดยมี pBR322 ที่ตัดด้วย *MspI* เป็น molecular weight markers และ ใช้ H37Ra DNA ของ *M. tuberculosis* 2 ng/ μ L เป็น positive control และ *E. coli* DNA 2 ng/ μ L เป็น negative control

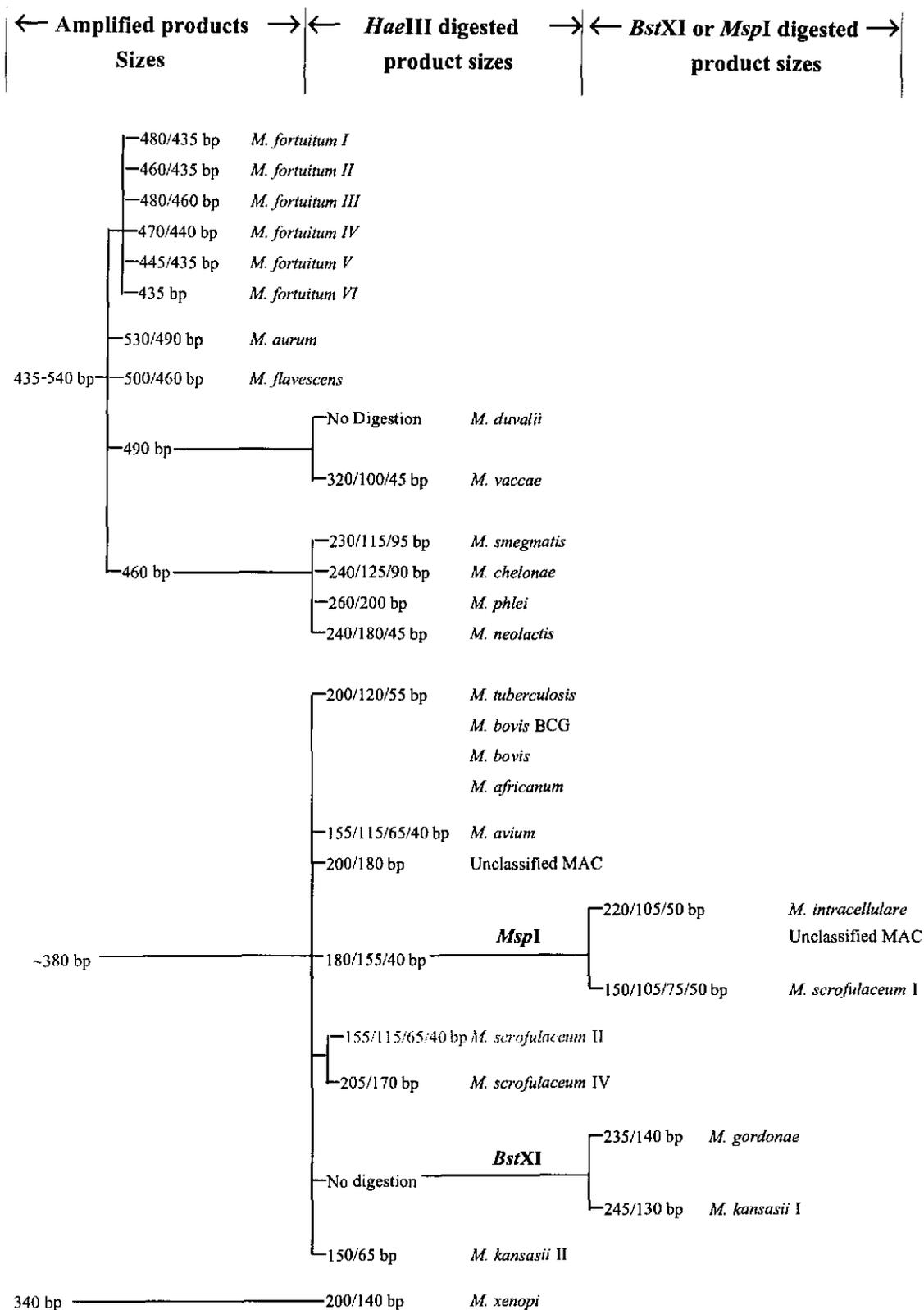
7.4 Restriction Enzyme Analysis (Sansila et al. 1998)

7.4.1 ผสม *HaeIII* restriction enzyme 5 U (0.5 μ L) กับ 17 μ L PCR product และ 2 μ L 10 x restriction buffer incubated ที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง

7.4.2 นำไปหา restriction patterns ถ้าไม่สามารถ identified ได้ จึงนำมาตัดด้วย *BstXI* หรือ *MspI* ที่อุณหภูมิ 55°C หรือ 37°C ตามลำดับ

7.4.3 ทำการประเมิน restriction patterns โดยเติม 3 μ L loading buffer นำไป run electrophoresis บน 20 x 20 cm 3% NuSieve 3:1 agarose gel ใน TBE buffer ที่ 100 volts 5 ชม. แล้ว ย้อมด้วย ethidium bromide โดยมี pBR322 ที่ตัดด้วย *MspI* เป็น molecular weight markers ใช้ 2 ng/ μ L *M. tuberculosis* H37Rv DNA เป็น positive control และ 2 ng/ μ L *E. coli* DNA เป็น negative control

7.4.4 การแปลผลของ PCR-REA patterns การแยกชนิด species ของ *Mycobacterium* อาศัยขนาดของ PCR product ขนาดของ *HaeIII* digested product และ ขนาดของ *BstXI* หรือ *MspI* digested product ที่แสดงในภาพที่ 10 ให้ทำการทดลองซ้ำ และเปรียบเทียบกับ DNA ของเชื้อมาตรฐานของ *Mycobacterium* species ที่สงสัย ถ้ามีข้อสงสัยไม่สามารถวินิจฉัยได้ ให้ส่งไปทำ nucleotide sequencing ของ 16S-23S rRNA gene spacer เพื่อทำการวินิจฉัยโดยเปรียบเทียบกับ gene bank ต่อไป



ภาพที่ 10 Dendrogram ของการแยก species ของ *Mycobacterium* โดยใช้ PCR-REA patterns ของ 16S-23S rDNA spacer (Sansila et al. 1998)

8 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

8.1 Proportional Method

ทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี Proportional Method ตามวิธีของ Laboratory Center for Disease Control, Canada ที่อ้างถึงโดยธนิดา เจริญทอง, 2540 โดยเตรียมอาหารทดสอบให้มีความเข้มข้นของยาที่กำหนด และหาสัดส่วนของเชื้อที่เจริญในอาหารที่มียาและไม่มียา ยาที่ทำการทดสอบส่วนใหญ่เตรียมใน Lowenstein-Jensen media ยกเว้นยา amikacin ซึ่งจะทำการทดสอบโดยวิธี Proportional Method วิธี Disk method (Heifets,1991)

8.1.1 อาหารทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

8.1.1.1 Lowenstein-Jensen media ผสมยา:

อาหารทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ Lowenstein-Jensen media ที่ผสมยาให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการทดสอบ (critical concentration) แสดงในตารางที่ 9 อาหารที่ทำการทดสอบเตรียมโดยห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานชันสูตร กองวัณโรค กระทรวงสาธารณสุข

ตารางที่ 9. ความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการทดสอบ

DRUG	Critical Concentration (µg / ml)
Isoniazid (INH)	0.2
Rifampicin (RIF)	40.0
Ethambutol (EMB)	2.0
Streptomycin (S)	4.0
Kanamycin (K)	20.0
Ofloxacin (O)	2.0

(Fujiki, Kawai,1986)

8.1.1.2 อาหารทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรควิธี Disk method :

Middlebrook 7H10 medium (M7H10) ที่ไม่มียาต้านวัณโรค และ Middlebrook 7H10 medium ที่มียาต้านวัณโรคชนิด amikacin ในความเข้มข้นที่กำหนด โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ชั่ง Middlebrook 7H10 medium 6 g ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เติมน้ำกลั่นลงไป 300 ml เติม glycerol 1.68 ml sterile ที่ 121°C เป็นเวลา 10 นาที รอให้อุณหภูมิ ลดลงเหลือประมาณ $45-50^{\circ}\text{C}$ จากนั้นเติม OADC Enrichment 30 ml OADC

2. ใช้ forceps sterile คีบ amikacin disk วางลงใน 2 ช่องของ quadrant plate โดยวางให้ disk ยา อยู่ตรงกลางช่องพอดี จากนั้นใช้ serological pipette ขนาด 1 ml ดูด M7H10 media ที่เตรียมไว้ใส่ลง plate ในช่องที่วาง disk ยาไว้ช่องละ 0.5 ml ทิ้งให้ media แข็งตัว เพื่อตรึง disk ยาให้อยู่ตรงกลางช่องไม่เคลื่อนที่ จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 5.0 ml ดูด media มา 4.5 ml เทลงใน plate ช่องที่มี disk ยา 2 ช่อง ก็จะได้ media เป็น 5 ml จากนั้น ดูด media ใส่ลงใน 2 ช่องที่เหลืออยู่ช่องละ 5 ml เสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ media แข็งตัว นำไปเก็บในตู้ incubator เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ยาซึมใน media อย่างสม่ำเสมอ และควรมีการ contaminate ของ bacteria หรือเชื้อราหรือ ไม้ และเก็บ plate ที่ 4°C ได้ไม่เกิน 1 เดือน

8.1.2 การเตรียมเชื้อเพื่อการทดสอบ

8.1.2.1 ใช้ loop เขี่ยเชื้อ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่จะทำการทดสอบ ที่เจริญบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ L-J ที่ 37°C ให้มีอายุ 3-4 สัปดาห์ ประมาณ 1 loopfull โดยเลือกเขี่ยเชื้อจากหลาย ๆ colonies เพื่อใช้เป็นตัวแทนที่ดีในการทดสอบ ใส่ใน screw cap tube ขนาด 16 x 150 mm sterile ที่บรรจุ glass beads ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ประมาณ 7-8 ลูก และเติมสาร 0.1 % Tween 80 sterile 1 หยด นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า vortex mixer นานประมาณ 30 วินาทีจนเชื้อแตกกระจายตัวดี เติมน้ำกลั่น sterile 7 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อที่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่ม ตกตะกอน

8.1.2.2 ดูดเชื้อส่วนบนประมาณ 3 ml ใส่ใน screwcap tube ขนาด 13x100 mm sterile หลอดใหม่ ปรับเทียบความขุ่นโดยใช้น้ำกลั่น sterile เทียบกับความขุ่นมาตรฐาน McFarland No.1 ที่เตรียมโดยเติม 0.1 ml ของ 1% BaCl_2 ใน 9.9 ml ของ 1% H_2SO_4 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 cells / ml เป็น stock เชื้อ

8.1.2.3 ทำการเจือจาง stock เชื้อ เป็น 10^{-2} โดยดูดสารละลายแขวนตะกอนจาก stock เชื้อปริมาตร 50 μl ใส่ในขวด Mc cartney sterile ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากันดี ด้วย vortex mixer จะได้สารละลายแขวนตะกอนเจือจางที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^5 cells/ml

8.1.2.4 ทำการเจือจางต่อ เป็น 10^{-4} โดยดูดสารละลายแขวนตะกอนจากเชื้อที่เจือจางเป็น 10^{-2} ปริมาตร 50 μl ใส่ในขวด Mc cartney sterile ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml เขย่าให้เข้ากันดีด้วย vortex mixer จะได้สารละลายแขวนตะกอนเจือจางที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^3 cells/ml

8.1.3 วิธีการทดสอบ

8.1.3.1 ใช้ calibrated loop ขนาด 0.01 ml ป้ายเชื้อที่เจือจางเป็น 10^{-2} บนชุดอาหารผสมและไม่ผสมยาที่ได้จัดเตรียมไว้แล้ว และ quadrant plate ช่องที่ไม่มียา 1 ช่อง และ ช่องที่มียา 1 ช่อง

8.1.3.2 ใช้ calibrated loop ขนาด 0.01 ml ป้ายเชื้อที่เจือจางเป็น 10^{-4} บนชุดอาหารผสมและไม่ผสมยาที่ได้จัดเตรียมไว้แล้วและ quadrant plate ช่องที่ไม่มียา 1 ช่อง และ ช่องที่มียา 1 ช่อง

8.1.3.3 เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 4 สัปดาห์นำออกมาอ่านแล้วบันทึกผล

8.1.4 การอ่านและบันทึกผลการทดสอบ

อ่านผลการทดสอบของเชื้อที่เจริญบนอาหารผสมยาและไม่ผสมยาโดยใช้หลักการอ่านผลของ Laboratory Center for Disease Control, Canada ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10. การอ่านผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรควิธี Proportional Method โดยวิธีของ LCDC (Laboratory Center for Disease Control, Canada)

จำนวน colony ที่เจริญบนอาหาร	การลงบันทึกผล
> 500 colonies	+3
300 – 500 colonies	+2
> 150 – 300 colonies	+1
< 150 colonies	นับจำนวน colony ทั้งหมด
None	0

นำผลที่ได้มาคำนวณหา %Resistant โดยใช้สูตรดังนี้

$$\% \text{ Resistant} = \frac{\text{จำนวน colonies ที่เจริญบนอาหารที่มียา}}{\text{จำนวน colonies ที่เจริญบนอาหารที่ไม่มียา}} \times 100$$

ถ้าผลการคำนวณ %Resistant $\geq 1\%$ ให้รายงานผลว่าเชื้อคือต่อยาชนิดนั้น

8.1.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

ทำการทดสอบเชื้อ *M. tuberculosis* reference strain H37Rv โดยทำการทดสอบเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ ผลการทดสอบเชื้อมาตรฐานจะต้องพบเชื้อ ในอาหารที่ไม่ผสมยามากกว่า 2,000 colonies และพบเชื้อในชุดอาหารทดสอบที่มียาน้อยกว่า 20 colonies ถ้าให้ผลการทดสอบที่แตกต่าง ต้องทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคใหม่ทั้งหมด

นอกจากนี้ *M. tuberculosis* ที่ทราบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคทั้งสายพันธุ์ที่ไวต่อยา และที่คือต่อยาจำนวน 10 สายพันธุ์จะส่งไปทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคยังห้องปฏิบัติการมาตรฐานของกองวัณโรคเพื่อควบคุมคุณภาพของการทดสอบความไว

9. การทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของเชื้อ *Mycobacterium avium* complex

ทำการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin ของเชื้อ *Mycobacterium avium* complex (MAC) โดยวิธี quantitative method เพื่อหาความเข้มข้นของยาค่าสุดท้ายที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration; MIC) ทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน broth macrodilution test (Heifets, 1996) เปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพแบบรวดเร็ววิธี E-test[®] (Lebrun, et. al., 1996)

9.1 Broth Macrodilution Method (Heifets, 1996)

วิธี broth macrodilution test เป็นวิธีมาตรฐาน ที่ใช้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ MAC ทำการทดสอบโดย

9.1.1 Stock clarithromycin solution : ชั่ง clarithromycin powder purify grade (Abbott Laboratories) 1.024 g ใน flask sterile ขนาด 50 ml โดยใช้ analytical balance ละลาย clarithromycin ด้วย methanol 10 ml อุณหภูมิใน water bath 50 °C เพื่อให้ยาละลายหมด นำมากรองด้วย millipore filter pore size 0.23 µm ได้ stock clarithromycin solution ความเข้มข้น 10.24 mg/ml

9.1.2 Working clarithromycin solution : เจือจาง stock clarithromycin solution 1:20 โดย pipette 0.5 ml stock solution ใส่ใน sterile screw cap tube ขนาด 16 x 150 mm เจือจางด้วย Middlebrook 7H 9 broth (M7H9) 9.5 ml ได้ working clarithromycin solution ความเข้มข้น 512 µg/ml โดยเตรียม working clarithromycin solution 20 หลอด เก็บที่ -70 °C จนกว่าจะใช้งาน

9.1.3 เตรียมเชื้อทดสอบ :

9.1.3.1 ขูดเชื้อ MAC ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L-J ที่ 37 °C ให้มีอายุ 3-4 สัปดาห์ ประมาณ 1 loopfull โดยเลือกเชื้อจากหลาย ๆ colonies เพื่อใช้เป็นตัวแทนที่ดีในการทดสอบ ใส่ใน screw cap tube ขนาด 16 x 150 mm sterile ที่บรรจุ glass beads ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ประมาณ 7 ลูก และเติมสาร 0.1% Tween 80 sterile 1 หยด นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า vortex mixer นานประมาณ 30 วินาทีจนเชื้อแตกกระจายตัวดี เติมน้ำกลั่น sterile 7 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15-30 นาที เพื่อให้เชื้อที่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่มตกตะกอน

9.1.3.2 ขูดเชื้อส่วนบนประมาณ 3 ml ใส่ใน screw cap tube ขนาด 13x100 mm sterile หลอดใหม่ ปรับเทียบความขุ่นโดยใช้น้ำกลั่น sterile เทียบกับความขุ่นมาตรฐาน McFarland No.1 โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer วัดความขุ่น ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 cells / ml เป็น stock เชื้อ MAC

9.1.3.3 นำ stock MAC ไปทำการเจือจาง 1:10 และ 1:100 ตามลำดับ ใน M7H9 broth จะได้สารละลายแขวนตะกอนเจือจางที่มีเชื้ออยู่ประมาณ 10^5 cells/ml

9.1.4 วิธีการทดสอบ :

9.1.4.1 เตรียม sterile screw cap tube ขนาด 16x150 mm 13 หลอด เขียนหมายเลขกำกับ 1-10 และ positive control 2 หลอด control ยา 1 หลอด

9.1.4.2 Serial-two-fold dilution : เติมน้ำกลั่น M7H9 หลอดละ 2 ml ทั้ง 12 หลอด และเติมน้ำกลั่น clarithromycin solution 2 ml ในหลอดที่ 1 เขย่าให้เข้ากันแล้วเจือจางยาแบบ serial-two-fold dilution จนถึงหลอดที่ 10 และ pipette ยาหลอดสุดท้ายใส่หลอด negative control ได้ความเข้มข้นของยาเจือจางระหว่าง 256 – 0.5 µg/ml

9.1.4.3 เติมน้ำกลั่นทดสอบที่เตรียมในข้อ 10.1.3.3 2 ml ใส่หลอดที่ 1-10

9.1.4.4 Positive control หลอดที่ 11 เติมน้ำกลั่นทดสอบ 2 ml ใส่ในหลอดที่มี M7H9 broth 2 ml; หลอดที่ 12 เติมน้ำกลั่นจำนวน 0.1 ml และ เชื้อทดสอบ 0.1 ml ใส่ในหลอดที่มี M7H9 broth 2 ml

9.1.4.5 นำ tube ทั้งหมด incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 อาทิตย์ อ่านค่า MIC ที่ได้จากการทดลอง

9.1.5 การแปลผล :

หลอดที่ขุ่น (เขย่า) แปลว่าเชื้อมีการเจริญเกิดการดีดยา อ่านผลบวก
 หลอดที่ใส (เขย่า) แปลว่าไม่มีการเจริญของเชื้อเชื้อไวต์ด้อยาอ่านผลลบ
 อ่าน ค่า MIC จากความเข้มข้นของยาต่ำที่สุดที่หลอดทดสอบอ่านผลเป็นลบ

9.1.6 การควบคุมคุณภาพการทดสอบความไววิธี macrodilution test

ทำการทดสอบเชื้อมาตรฐาน ATCC 800797 เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ ผลการทดสอบเชื้อมาตรฐานจะต้องเจริญใน positive control ทั้ง 2 หลอด ค่า MIC ของ *Mycobacterium avium* complex ATCC 800797 ที่ pH 6.8 ต้องมีค่าเท่ากับ $4 \mu\text{g/ml} \pm 1$ dilution

9.2 E-test[®] (Lebrun, et. al., 1996)

E-test[®] เป็นการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพที่อาศัยทั้งหลักการ dilution technique และ agar diffusion technique โดยการใช้ antibiotic gradient strip วิธีทดสอบมีดังนี้

9.2.1 เตรียมเชื้อทดสอบ : ให้ได้สารละลายแขวนตะกอนของเชื้อดังวิธีการในหัวข้อ 10.1.3 ให้ได้ความขุ่นเท่า McFarland No. 1 ที่มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^7 cells / ml

9.2.2 การลงเชื้อ : จุ่ม sterile swab ในหลอดเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว บิดน้ำเชื้อส่วนที่มากเกินไปออกพอให้ชื้นอย่าให้แห้งจนเกินไป แล้ว streak plate บน Middlebrook 7H10 agar(M7H10) ที่ supplement ด้วย 10% OADC streak plate 6 ทิศทาง แล้วนำ plate ไปบ่มเชื้อที่ 37°C 1 คืน

9.2.3 การทดสอบ :

นำ plate ที่ลงเชื้อ และบ่มเชื้อ 1 คืน มาวาง E-test[®] strips clarithromycin ความเข้มข้น $0.016\text{-}256 \mu\text{g/ml}$ 1 แผ่น ตรงกึ่งกลางของ plate ปิดขอบ plate ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม ไม่ให้สูญเสียความชื้น นำไป incubate ที่ 37°C ทำการอ่านผลหลังจาก 2 สัปดาห์

9.2.4 การอ่านผล :

หลังจาก incubate ที่ 37°C 2 สัปดาห์ เชื้อ MAC ที่ทดสอบเจริญเต็มที่ จะเกิด colonies คลุม M7H10 agar และเกิด inhibition zone เป็นรูปไข่ ตัดผ่าน scale ที่แสดงความเข้มข้นของยา อ่านค่า MIC จากขอบล่างของ inhibition zone ที่ตัดผ่าน scale ที่แสดงความเข้มข้นบน E-test[®] strip

9.2.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบความไววิธี E-test®

ทำการทดสอบเชื้อมาตรฐาน *Mycobacterium avium* complex ATCC 800797 เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพ ผลการทดสอบค่า MIC ของเชื้อมาตรฐาน *M. avium* complex ATCC 800797 ที่ pH 7.4 มีค่าเท่ากับ 1-2 µg/ml

10. การเก็บ stock เชื้อ *Mycobacterium*

ทำการเก็บ stock เชื้อ *M. tuberculosis*, MAC และ NTM ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ โดยเพาะบน L-J media ให้ได้ colony มาก ๆ ชูดเชื้อที่เจริญบน L-J media ใส่ใน 7H9 medium + 15 % glycerol ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ sterile vial ที่ glass bead 10 เม็ด vial ละ 1 ml ปิดฝาให้สนิท freeze ที่ -20°C และ -70°C

11. การแยกวินิจฉัยแบคทีเรียอื่น ๆ

แบคทีเรียที่เพาะได้จาก hemoculture ของผู้ป่วยเอดส์ที่เจริญบน blood agar, MacConkey หรือ chocolate agar ภายหลังเพาะบ่มเชื้อ 24-48 ชม. ในหัวข้อ 3.4 ให้นำไปย้อม Gram's stain บันทึกลักษณะ colony และลักษณะ cell และนำไปแยกวินิจฉัยเชื้อโดยอาศัยลักษณะ colony ลักษณะ cell และการทดสอบชีวเคมีตามวิธีของ Manual of Clinical Microbiology fifth edition ของ Balows et al. 1991 เพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อที่มักพบเป็นสาเหตุของ septicemia ได้บ่อยในผู้ป่วยโรคเอดส์ได้แก่ เชื้อในกลุ่ม gram negative bacilli : *Salmonella*, เชื้อใน family Enterobacteriaceae อื่นๆ, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas species*, *Acinetobacter* และ *Haemophilus influenzae*; เชื้อในกลุ่ม gram positive cocci : *Staphylococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus*; Gram positive bacilli : *Listeria* และ แบคทีเรียอื่น ๆ

12. การแยกวินิจฉัยเชื้อรา

เชื้อราประเภท yeast และ mold ที่ตรวจพบจาก hemoculture ของผู้ป่วยเอดส์โดยการย้อม Gram's stain หรือ Lactophenol Cotton Blue จะนำไปเพาะเชื้อบน Sabouraud dextrose agar บ่มเชื้อที่ 30°C และ ใน blood agar บ่มเชื้อที่ 37°C 1-7 วัน เชื้อราที่เจริญบน Sabouraud Dextrose Agar หรือ blood agar ให้นำไปแยกวินิจฉัยตามวิธีของ Manual of Clinical Microbiology fifth edition ของ Balows et al. 1991 เพื่อแยกวินิจฉัยเชื้อราที่มักพบเป็นสาเหตุของ septicemia ได้บ่อยในผู้ป่วยโรคเอดส์ได้แก่ *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii*, *Aspergillus* และ *Histoplasma*

บทที่ 3

ผลการดำเนินการ

1. ผู้ป่วย

จากการศึกษาเพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ทั้ง *Mycobacterium tuberculosis* และ Nontuberculous *Mycobacterium* ในเสมหะและเลือดของผู้ป่วยโรคเอดส์ในบ้านพักผู้ป่วยโรคเอดส์ ระยะสุดท้าย ณ โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2545 เมื่อเริ่มการศึกษาในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 มีผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ทั้งหมด 158 คน ตลอดระยะเวลาวิจัยมีผู้ป่วยเอดส์ย้ายเข้าในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์เท่ากับ 1,098 คน แต่มีผู้ป่วยเสียชีวิตและย้ายออกจากโครงการ 792 คน และ 195 คนตามลำดับ โดยมีผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์เฉลี่ยในแต่ละเดือนเท่ากับ 206.69 คน มีผู้ป่วยเอดส์เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ทั้งหมด 325 คน เป็นชาย 209 คน หญิง 116 คน ทั้งนี้มีผู้ป่วยเอดส์ที่แสดงอาการอย่างใดอย่างหนึ่งของวัณโรคและซึนยอมเก็บเสมหะจำนวน 278 คน เป็นชาย 177 คน หญิง 101 โดยมีอัตราส่วนชาย : หญิง เท่ากับ 1.75 : 1 และมีผู้ป่วยเอดส์ที่มีไข้เรื้อรัง > 1 สัปดาห์ หรือแสดงอาการอย่างใดอย่างหนึ่งของวัณโรค และซึนยอมเจาะเลือดเพื่อนำส่ง hemoculture จำนวน 181 คน เป็นชาย 113 คน หญิง 68 คน โดยมีอัตราส่วนชาย : หญิง เท่ากับ 1.66 : 1 โดยมีผู้ป่วยที่นำส่งทั้งตัวอย่างเลือดและเสมหะจำนวน 135 คน เป็นชาย 82 คน หญิง 53 คน จำนวนผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์และจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมหะ และ เลือด ในระยะเวลาที่ทำการศึกษาแสดงในตารางที่ 11

2. การตรวจหาการติดเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะ

การศึกษานี้ผู้ป่วยนำส่งเสมหะ 1-9 ครั้ง โดยได้รับเสมหะทั้งสิ้น 822 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 278 คน ผู้ป่วยนำส่งเสมหะ 1-9 ครั้ง โดยมีผู้ป่วยนำส่งเสมหะ 1 ครั้ง 16 คน, 2 ครั้ง 32 คน, 3 ครั้งมากที่สุด 212 คน, 4 ครั้ง 1 คน, 5 ครั้ง 3 คน, 6 ครั้ง 13 คน และ 9 ครั้ง 1 คน คิดเป็นร้อยละ 5.71, 11.43, 76.43, 0.36, 1.07, 4.68 และ 0.36 ตามลำดับ จำนวนผู้ป่วยทั้งหมดและจำนวนเสมหะของผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 จำนวนผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษณ์ิเวศน์วัดพระบาทน้ำพุและจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมหะ ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2545

เดือน	ผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ(คน)				ผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ(คน)				ผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture(คน)			
	ผู้ป่วย	รับใหม่	กลับ	ตาย	ชาย	หญิง	รวม	%	ชาย	หญิง	รวม	%
ต.ค. 43	158	64	10	36	10	7	17	10.76	0	0	0	0.00
พ.ย. 43	176	63	19	61	9	6	15	8.52	3	3	6	3.41
ธ.ค. 43	159	62	8	50	4	0	4	2.52	0	0	0	0.00
ม.ค. 44	163	80	29	54	9	6	15	9.20	10	9	19	11.66
ก.พ. 44	160	65	22	58	8	4	12	7.50	4	1	5	3.13
มี.ค. 44	137	112	13	43	10	5	15	10.95	2	0	2	1.46
เม.ย. 44	193	83	9	54	4	3	7	3.63	0	0	0	0.00
พ.ค. 44	213	72	10	56	0	0	0	0.00	0	0	0	0.00
มิ.ย. 44	219	72	21	61	28	19	47	21.46	0	0	0	0.00
ก.ค. 44	209	71	10	41	16	11	27	12.92	20	11	31	14.83
ส.ค. 44	229	81	15	60	11	7	18	7.86	15	12	27	11.79
ก.ย. 44	235	66	5	45	14	5	19	8.09	11	8	19	8.09
ต.ค. 44	251	83	7	53	27	9	36	14.34	12	2	14	5.58
พ.ย. 44	274	56	5	55	12	10	22	8.03	12	7	19	6.93
ธ.ค. 44	270	68	12	65	15	9	24	8.89	14	10	24	8.89
ม.ค. 45	261				0	0	0	0.00	11	5	16	6.13
รวม		1,098	195	792	177	101	278		113	68	181	

ตารางที่ 12 จำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะและจำนวนเสมหะที่นำส่ง

จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	จำนวนเสมหะที่นำส่ง (ครั้ง)						
	1	2	3	4	5	6	9
ชาย 177 63.67%	8 2.88%	19 6.83%	135 48.56%	1 0.36%	3 1.08%	10 3.60%	1 0.36%
หญิง 101 36.33%	8 2.88%	13 4.68%	77 27.70%	0 0.00%	0 0.00%	3 1.08%	0 0.00%
รวม 278 100.00%	16 5.76%	32 11.51%	212 76.26%	1 0.36%	3 1.08%	13 4.68%	1 0.36%

2.1 ประวัติผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ

2.1.1 อายุผู้ป่วย

จากการสำรวจแบบสอบถามผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ พบว่ามีอายุระหว่าง 21-63 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 34.50 ปี ผู้ป่วยชาย มีอายุระหว่าง 21-63 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 35.17 ปี ผู้ป่วยหญิงมีอายุระหว่าง 21-54 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 33.31 ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุในช่วง 30-39 ปี และ 20-29 ปี คิดเป็นร้อยละ 42.81 และ 30.93 ตามลำดับ โดยช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ

อายุ	ช่วงอายุผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ			
	ชาย	หญิง	รวม	%
0-14	0	0	0	0
15-19	0	0	0	0
20-29	46	40	86	30.93
30-39	83	36	119	42.81
40-49	40	20	60	21.58
50-59	7	4	11	3.96
60 ขึ้นไป	1	0	1	0.36
ไม่ทราบอายุ	0	1	1	0.36
รวม	177	101	278	100

2.1.2 อาการทางคลินิก

ผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าร่วมในงานวิจัยครั้งนี้แสดงอาการทางคลินิกของวัณโรค อย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ น้ำหนักลด มีไข้คือ มีอุณหภูมิสูงกว่า 38°C มาเป็นเวลานานกว่า 1 สัปดาห์ เจ็บหน้าอก เหนื่อยหอบ เหงื่อออกกลางคืน ไอเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ไอเป็นเลือด จากผลการสำรวจอาการสำคัญของผู้ป่วยตามแบบสอบถาม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษามีอาการไอเรื้อรังมากที่สุด 179 คน โดยมีอาการไอเรื้อรังน้อยกว่า 1 สัปดาห์ จำนวน 45 คน ไอเรื้อรังมากกว่า 1 สัปดาห์ จำนวน 39 คน ไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์จำนวน 20 คน และไอเรื้อรังมากกว่า 1 เดือนจำนวน 75 คน คิดเป็นร้อยละ 64.39, 16.19, 14.03, 7.19 และ 26.98 ตามลำดับ ในจำนวนนี้มีอาการไอมีเลือดจำนวน 15 คน

คิดเป็นร้อยละ 5.39 มีผู้ป่วยที่มีอาการเหนื่อยหอบจำนวน 124 คน น้ำหนักลดจำนวน 120 คน มีอาการไอจำนวน 100 คน มีอาการเจ็บหน้าอกเป็นจำนวน 93 คน และมีอาการเหงื่อออกตอนกลางคืนจำนวน 82 คน คิดเป็นร้อยละ 44.60, 43.17, 35.97, 33.50 และ 29.45 ตามลำดับ จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมอและมีอาการทางคลินิกของวัณโรคแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมอและมีอาการทางคลินิกของวัณโรค

ผู้ป่วย (คน)	จำนวนผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกของวัณโรค (คน)										
	น้ำหนัก ลด	มีไข้ หอบ	เจ็บ หน้าอก	เหงื่อออก กลางคืน	ไอเรื้อรัง				รวม	ไอ เป็นเลือด	
					<1 สัปดาห์	>1 สัปดาห์	>2 สัปดาห์	>1 เดือน			
278	120	100	124	93	82	45	39	20	75	179	15
%	43.17	35.97	44.60	33.50	29.45	16.19	14.03	7.19	26.98	64.39	5.39

2.1.3 การได้รับยาต้านวัณโรค

จากการสำรวจการได้รับยาต้านวัณโรคตามแบบสอบถาม พบผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยครั้งนี้เคยได้กำลังรับยาวัณโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือเคยได้รับยาในระยะเวลา 1-6 เดือน ก่อนเก็บเสมอจำนวนทั้งสิ้น 60 คน คิดเป็นผู้ป่วยที่เคยได้รับยา ร้อยละ 21.58 ของผู้ป่วยทั้งหมด และมีผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามว่าเคยได้รับยาต้านวัณโรคเพียงชนิดเดียว 4 คน คิดเป็นร้อยละ 1.49 โดยได้รับยา isoniazid เพียงชนิดเดียว 2 คน และได้รับยา rifampicin เพียงชนิดเดียว 2 คน คิดเป็นร้อยละ 0.73 ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านวัณโรค 2 ชนิด มีจำนวน 9 คน คิดเป็นร้อยละ 3.24 โดยพบว่าได้รับยา isoniazid ร่วมกับ rifampicin 7 คน คิดเป็นร้อยละ 2.52 มีผู้ที่ได้รับยา isoniazid ร่วมกับ ethambutol และ isoniazid ร่วมกับ streptomycin อย่างละ 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.36 ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านวัณโรคร่วมกัน 3 ชนิดมี 5 คน คิดเป็นร้อยละ 1.80 โดยได้รับยา isoniazid , rifampicin และ ethambutol 2 คน คิดเป็นร้อยละ 0.73 isoniazid, rifampicin และ pyrazinamide 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.36 และ isoniazid, ethambutol และ pyrazinamide 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.36 ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านวัณโรคร่วมกัน 4 ชนิด มีจำนวน 42 คน คิดเป็นร้อยละ 15.11 โดยได้รับยา isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยจำนวน 5 คน เคยได้รับยาต้านวัณโรคมามากกว่า 1 ปี โดยได้รับยา isoniazid และ rifampicin 1 คน isoniazid, rifampicin, และ ethambutol 1 คน และ isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide 3 คน จำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมอและตอบแบบสอบถามว่าได้รับยาต้านวัณโรคชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 จำนวนผู้ป่วยที่เคยได้รับยารักษาวัณโรค

ผู้ป่วยทั้งหมด	จำนวนผู้ป่วย (คน)													รวมเคยได้รับยา
	ไม่เคยรับยา	ไม่แน่ใจ	ไม่มีข้อมูล	รับยา >1 y	ได้รับยา 1 ชนิด	ได้รับยา 2 ชนิด	ได้รับยา 3 ชนิด	ได้รับยา 4 ชนิด						
	H	R	HR	HE	HS	HRE	HRZ	HEZ	HREZ					
278	194	15	4	5	2	2	7	1	1	2	2	1	42	60
%	69.78	5.39	1.49	1.80	0.73	0.73	2.52	0.36	0.36	0.73	0.73	0.36	15.11	21.58

H = isoniazid, E = ethambutol, R = rifampicin, S = streptomycin, Z = pyrazinamide, y = year

2.2 ผลการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะโดยการย้อม

จากการย้อมจากเสมหะโดยตรงด้วยวิธี Ziehl-Neelsen acid fast stain พบว่า จากเสมหะ 822 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 278 คน ตรวจพบ acid fast bacilli (AFB) 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.87 ของเสมหะทั้งหมด จากผู้ป่วยเอดส์ 18 คน คิดเป็นร้อยละ 6.48 จากผู้ป่วยทั้งหมด และพบว่า ตรวจพบ AFB จากการย้อมตะกอนเสมหะเข้มข้น หลังจากการทำ digestion-decontamination 110 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.38 ของเสมหะทั้งหมด จากผู้ป่วยเอดส์ 66 คน คิดเป็นร้อยละ 23.74 จากผู้ป่วยทั้งหมด โดยพบว่าเสมหะของผู้ป่วย 210 คน ตรวจไม่พบ AFB คิดเป็นร้อยละ 75.53 ผลการย้อมเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์เพื่อตรวจหา AFB แสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการย้อมเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์

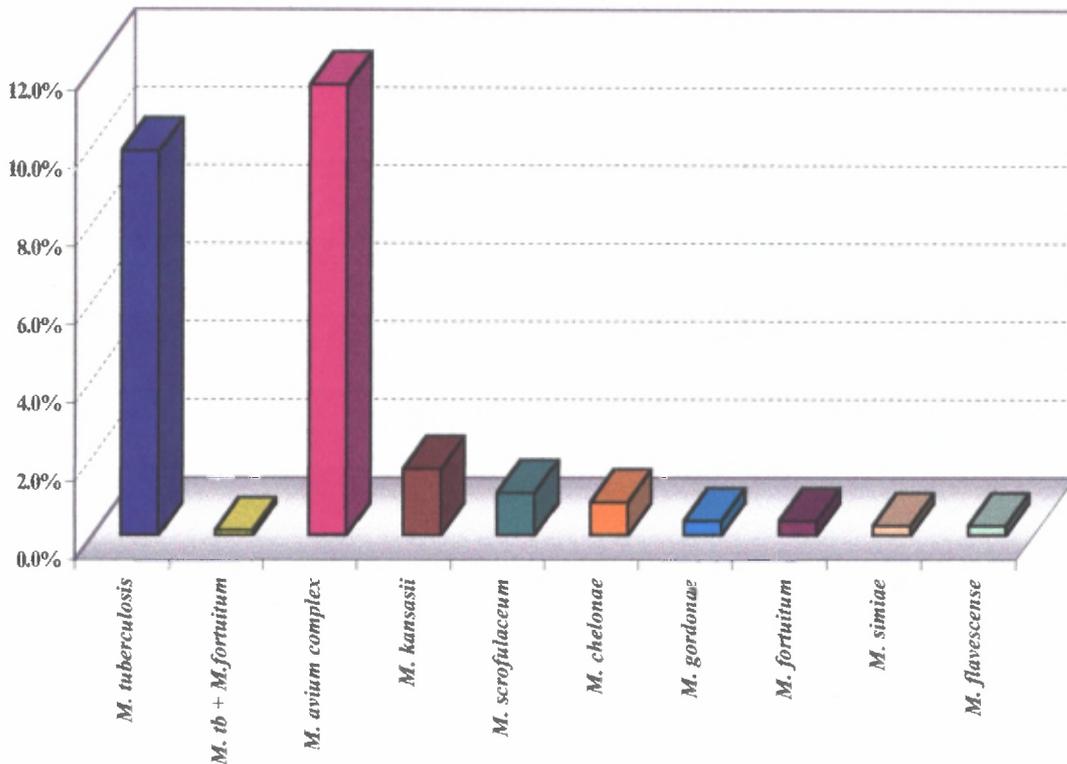
ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	ผลการย้อมเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ (คน)						
	Direct Smear		Concentrate Smear		วิธีใดวิธีหนึ่ง		
	AFB Positive	AFB Negative	AFB Positive	AFB Negative	AFB Positive	AFB Negative	
ชาย	177	10	167	42	135	43	134
หญิง	101	8	93	24	77	25	76
รวม	278	18	260	66	212	68	210

2.3 ผลการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะโดยวิธี conventional method

การเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะใน MB/BACT[®] และ L-J medium และการวินิจฉัยด้วยวิธีของ Centers for Disease Control (Kent and Kubica, 1985) โดยอาศัย อัตราการเจริญเติบโต ลักษณะ colonies การสร้างรงควัตถุ การเกิด cord formation และการทดสอบชีวเคมี พบว่าจากเสมหะ 822 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 278 คน ตรวจพบ *Mycobacterium* 217 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.40 ของเสมหะทั้งหมด โดยตรวจพบ *M. tuberculosis* 82 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.98 ของเสมหะทั้งหมด ในจำนวนนี้พบเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมกับ *M. fortuitum* ในเสมหะ 1 ตัวอย่าง และพบเป็นเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria (NTM) 136 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.55 ของเสมหะทั้งหมด โดยตรวจพบเชื้อ *M. avium* complex 95 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.56 ของเสมหะทั้งหมด และพบ *M. kansasii* 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.70), *M. scrofulaceum* 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.09), *M. chelonae* 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.85), *M. fortuitum* และ *M. gordonae* พบเชื้อละ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.36), และ พบเชื้อ *M. flavescens* และ *M. simiae* เชื้อละ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.24) ผลการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะผู้ป่วย โรคเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ แสดงในตารางที่ 17 และภาพที่ 11

ตารางที่ 17 ผลการวินิจฉัย *Mycobacterium* species ที่แยกจากเสมหะ โดยการทดสอบชีวเคมี

Organisms	Culture Positive	
<i>M. tuberculosis</i> :	81	9.85%
Nontuberculous Mycobacteria:		
<i>M. avium</i> complex	95	11.56%
<i>M. kansasii</i>	14	6.45%
<i>M. scrofulaceum</i>	9	4.15%
<i>M. chelonae</i>	7	3.23%
<i>M. fortuitum</i>	3	1.38%
<i>M. gordonae</i>	3	1.38%
<i>M. flavescens</i>	2	0.92%
<i>M. simiae</i>	2	0.92%
M. tb + NTM :		
M.tb + <i>M. fortuitum</i>	1	0.46%
	217	26.40%



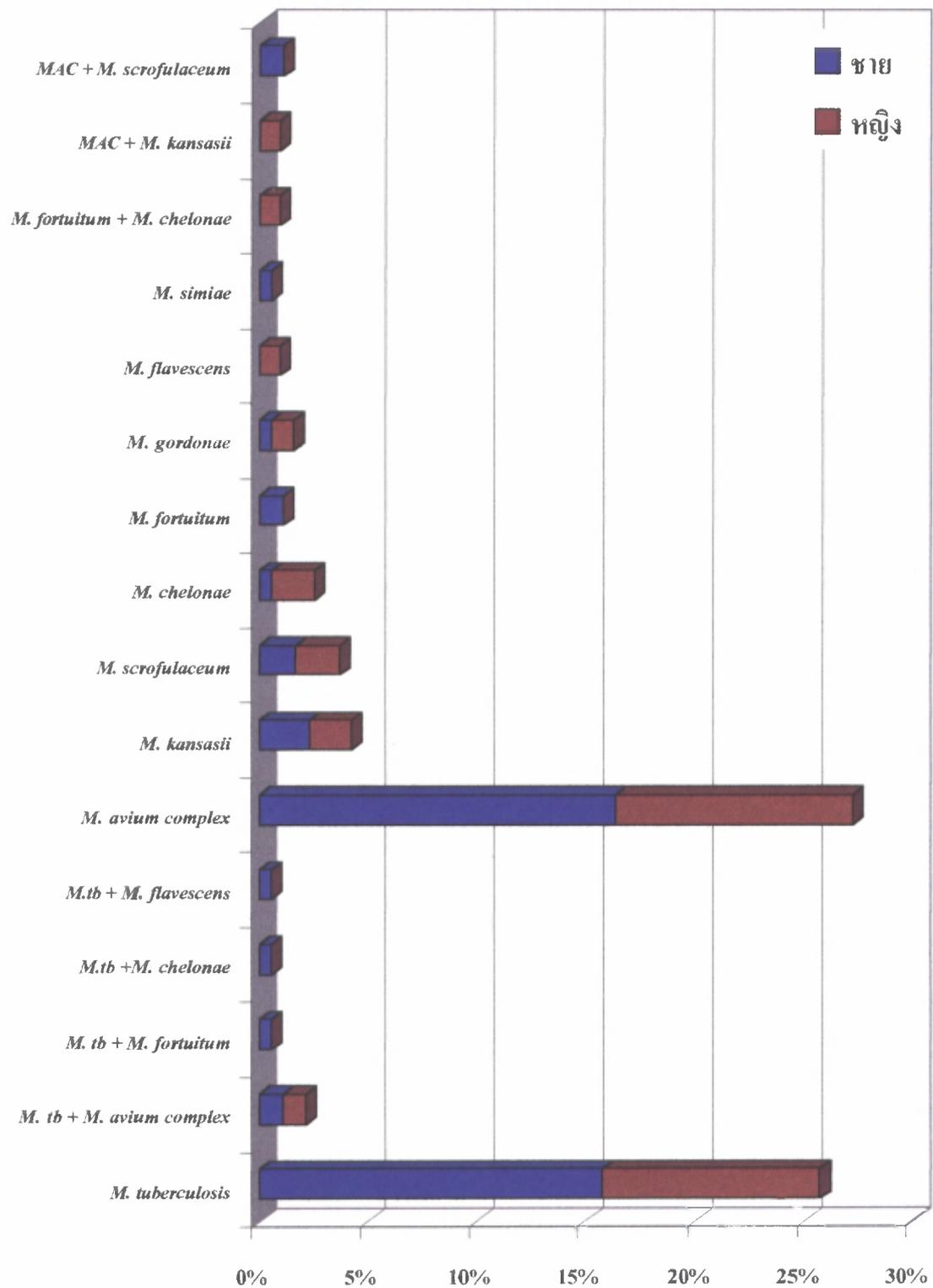
ภาพที่ 11 ร้อยละของเชื้อ *Mycobacterium* species ต่างๆ ที่แยกจากเสมหะ และวินิจฉัยด้วยการทดสอบชีวเคมี

การเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะจากผู้ป่วย 278 คน ตรวจพบ *Mycobacterium* จากผู้ป่วยเอดส์ 107 คน คิดเป็นร้อยละ 38.49 จากผู้ป่วยทั้งหมด โดยตรวจพบ *M. tuberculosis* (MTB) จากผู้ป่วย 44 คน คิดเป็นร้อยละ 15.83 จากผู้ป่วยทั้งหมด โดยตรวจพบเฉพาะเชื้อ MTB 38 คน คิดเป็นร้อยละ 13.67 ของผู้ป่วยทั้งหมด และพบเชื้อ MTB ร่วมกับ NTM อื่น 6 คน คิดเป็นร้อยละ 2.16 โดยตรวจพบเชื้อ MTB ร่วมกับ MAC ในผู้ป่วย 3 คน คิดเป็นร้อยละ 1.08, พบ MTB ร่วมกับ *M. fortuitum*, MTB ร่วมกับ *M. chelonae* และ MTB ร่วมกับ *M. flavescens* ในผู้ป่วยอย่าง 1 คน คิดเป็นร้อยละ 0.36 ของผู้ป่วยทั้งหมด

พบ NTM ในผู้ป่วย 70 คน คิดเป็นร้อยละ 25.18 โดยพบเชื้อ MAC อย่างเดียวในผู้ป่วย 40 คน (ร้อยละ 14.39), พบ *M. kansasii* 6 คน (ร้อยละ 2.16), *M. scrofulaceum* 5 คน (ร้อยละ 1.80), *M. chelonae* 3 คน (ร้อยละ 1.08), *M. fortuitum* และ *M. gordonae* เชื้อละ 2 คน (ร้อยละ 0.72) พบ *M. flavescens* และ *M. simiae* เชื้อละ 1 คน (ร้อยละ 0.36) ตรวจพบ NTM มากกว่า 1 ชนิด 4 คน แยกได้เชื้อ MAC ร่วมกับ *M. scrofulaceum* 2 ราย (ร้อยละ 0.72) , MAC ร่วมกับ *M. kansasii* 1 ราย (ร้อยละ 0.36) และ *M. fortuitum* ร่วมกับ *M. chelonae* 1 ราย (ร้อยละ 0.36) ผลการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ แสดงในตารางที่ 18 และภาพที่ 12

ตารางที่ 18 ผู้ป่วยที่แยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* species จากเสมหะ โดยการทดสอบชีวเคมี

<i>Mycobacterium</i> species	ชาย (คน)		หญิง (คน)		รวม (คน)	
<i>M. tuberculosis</i>	28	15.82%	10	9.90%	38	13.67%
M. tb + NTM	5	2.82%	1	0.99%	6	2.16%
<i>M. tb</i> + <i>M. avium</i> complex	2	1.13%	1	0.99%	3	1.08%
<i>M. tb</i> + <i>M. fortuitum</i>	1	0.56%	0	0.00%	1	0.36%
<i>M.tb</i> + <i>M.chelonae</i>	1	0.56%	0	0.00%	1	0.36%
<i>M.tb</i> + <i>M.flavescens</i>	1	0.56%	0	0.00%	1	0.36%
NTM	43	24.29%	21	20.79%	64	23.02%
<i>M. avium</i> complex	29	16.38%	11	10.89%	40	14.39%
<i>M. kansasii</i>	4	2.26%	2	1.98%	6	2.16%
<i>M. scrofulaceum</i>	3	1.69%	2	1.98%	5	1.80%
<i>M. chelonae</i>	1	0.56%	2	1.98%	3	1.08%
<i>M. fortuitum</i>	2	1.13%	0	0.00%	2	0.72%
<i>M. gordonae</i>	1	0.56%	1	0.99%	2	0.72%
<i>M. flavescens</i>	0	0.00%	1	0.99%	1	0.36%
<i>M. simiae</i>	1	0.56%	0	0.00%	1	0.36%
<i>M. fortuitum</i> + <i>M. chelonae</i>	0	0.00%	1	0.99%	1	0.36%
MAC + <i>M.kansasii</i>	0	0.00%	1	0.99%	1	0.36%
MAC + <i>M.scrofulaceum</i>	2	1.13%	0	0.00%	2	0.72%
Culture Positive	75	42.94%	32	31.68%	107	38.85%
Culture Negative	102	57.06%	69	68.32%	170	61.15%
รวมผู้ป่วยทั้งหมด	177		101		278	



ภาพที่ 12 ร้อยละของผู้ป่วยเอดส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* sp. ต่างๆ จากเสมหะ และวินิจฉัยโดยการทดสอบชีวเคมี

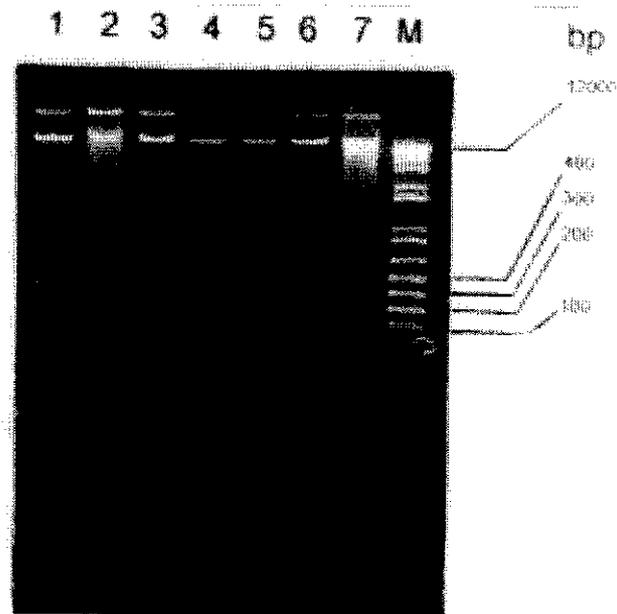
2.4 ผลการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะโดยวิธี REA-PCR

2.4.1 การสกัด Chromosome

การพิสูจน์แยกชนิดเชื้อ *Mycobacterium* spp. ซึ่งเพาะแยกได้จากผู้ป่วยโรคเอดส์ นอกจากทดสอบชีวเคมีได้นำมาทำการยืนยันผลการแยกวินิจฉัยโดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer และ restriction enzyme analysis โดยทำการสกัด chromosomal DNA ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. ที่แยกได้ โดยใช้วิธี ต้ม , mechanical lysis และ วิธี enzymatic lysis เทียบกับ เชื้อมาตรฐาน *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv และ H37Ra จากการสกัด chromosomal DNA ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. 30 สายพันธุ์ที่แยกได้ และ *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv และ H37Ra โดยใช้วิธีต้ม, mechanical lysis และ วิธี enzymatic lysis พบว่าทั้งสามวิธีสามารถนำมาใช้สกัด chromosomal DNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้ DNA ที่มีความเข้มข้นประมาณ 1-3 µg/µl และมีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนเพียงเล็กน้อย ดังภาพที่ 13 และเมื่อนำ chromosomal DNA ที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี มาทำการ amplify ในส่วนของ 16S-23S rDNA spacer พบว่าให้ amplified product ตามต้องการคณะผู้ทำการวิจัยจึงเลือกวิธีการสกัดมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้ คือ วิธี mechanical lysis เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้เวลาในการสกัดสั้นกว่าวิธี enzymatic lysis และให้ผลการ amplify product ในส่วนของ 16S-23S rDNA spacer ที่มี purity ดีกว่าวิธีการต้ม

2.4.2 ผลการแยกเชื้อ *Mycobacterium* sp. โดย PCR-REA

เมื่อนำ chromosome ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. 217 ตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี mechanical lysis มาทำการแยกวินิจฉัยโดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer และ restriction enzyme analysis พบว่าสามารถแยกวินิจฉัยเชื้อได้ตรงกับ การทดสอบชีวเคมี 195 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.72 ของตัวอย่างเสมหะทั้งหมด หรือเป็นร้อยละ 89.86 ของเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด ผลการแยกวินิจฉัยได้เป็น *Mycobacterium* 8 species คือ *M. tuberculosis* complex 81 สายพันธุ์ (ร้อยละ 9.85), *M. avium* complex 82 สายพันธุ์ (ร้อยละ 9.98) ซึ่งสามารถแยกได้เป็น *M. avium* 59 สายพันธุ์ (ร้อยละ 7.18), *M. intracellulare* 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.36) และ Unclassified MAC 20 สายพันธุ์ (ร้อยละ 2.43) และวินิจฉัยเป็น *M. kansasii* 14 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.70) *M. scrofulaceum* 7 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.85) *M. chelonae* 6 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.73) *M. fortuitum* 4 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.49) และแยกได้เชื้อ *M. gordonae* และ *M. flavescens* ชนิดละ 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.12) ดังแสดงในตารางที่ 19 และแผนภาพที่ 14



ภาพที่ 13 Agarose gel electrophoresis of *Mycobacterium* chromosomal DNA extracted by boiling method, enzymatic lysis method and mechanical lysis method

Lane M: 1 kb plus DNA marker

Lane 1: Uncut λ -DNA

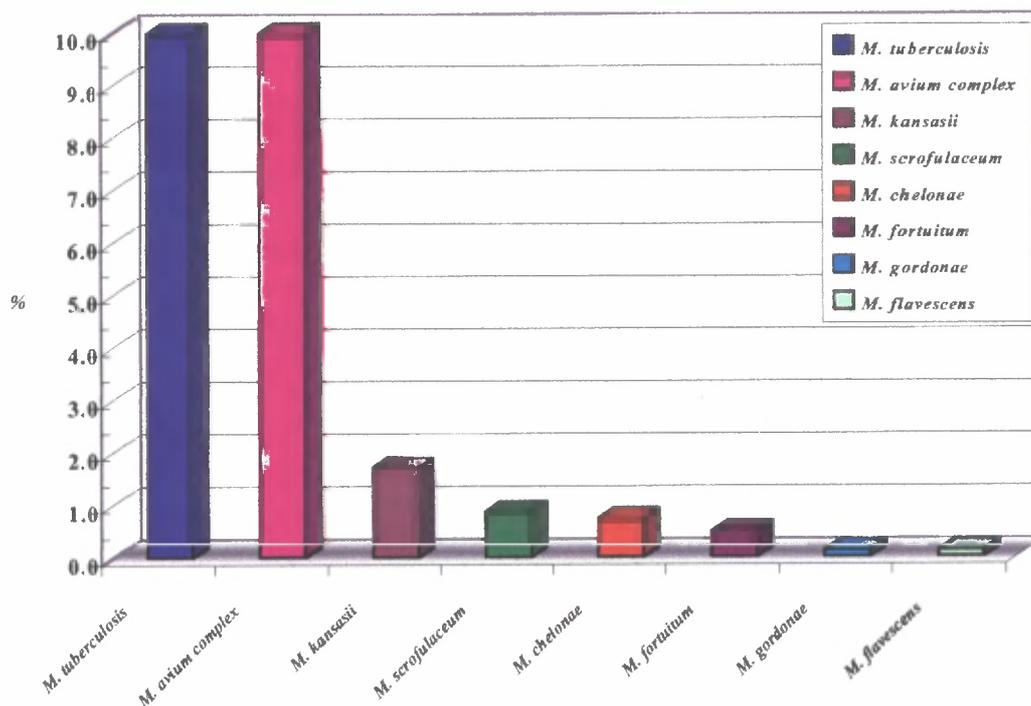
Lane 2, 7: *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA by boiling method

Lane 3-4: *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA enzymatic lysis method

Lane 5-6: *M. tuberculosis* H37Ra chromosomal DNA mechanical lysis method

ตารางที่ 19 ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* sp ที่แยกจากเสมหะ โดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer ร่วมกับ restriction enzyme analysis เทียบการทดสอบชีวเคมี

Microorganisms	No. of Isolates	Amplified Length (bp)	Restriction Patterns (bp)		
			<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Bst</i> XI
<i>M. tuberculosis</i>	81	380	200/120/55	-	-
<i>M. avium</i> complex	81				
<i>M. avium</i>	58	380	155/115/65/40	-	-
<i>M. intracellulare</i>	3	380	180/155/40	220/105/50	-
Unclassify MAC	20	380	200/180	-	-
<i>M. kansasii</i>	14	380	380	-	245/130
<i>M. scrofulaceum</i>	7	380	180/155/40	150/105/75/50	-
<i>M. chelonae</i>	6	460	240/125/90	-	-
<i>M. fortuitum</i>	4	480/460	-	-	-
<i>M. gordonae</i>	1	380	380	-	235/140
<i>M. flavescens</i>	1	500/460	-	-	-
รวม	195				
Unidentified <i>Mycobacterium</i>	22				



ภาพที่ 14 ร้อยละของเชื้อ *Mycobacterium* species ต่างๆ ที่แยกจากเสมหะ และวินิจฉัยด้วยการทดสอบชีวเคมี และ PCR-REA ให้ผลตรงกัน

Chromosome ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. 217 ตัวอย่างที่สกัดโดยวิธี mechanical lysis มาทำการแยกจีโนมิจนัยโดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer (interspacer region; ISR) gene ด้วย primer 1 คู่ ; 16 SC และ 23 SG primer พบว่า *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* และ *M. gordonae* มี amplified product ขนาด 380 bp ขณะที่ amplified product ของ ISR gene ของ *M. chelonae* มีขนาด 460 bp, *M. fortuitum* มีขนาด 480/460 bp และ *M. flavescens* มีขนาด 500/460 bp

เชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. tuberculosis* complex ทุกตัวอย่างมี amplified product ขนาด 380 bp และเมื่อนำมาตัดด้วย restriction enzyme *HaeIII* จะได้ DNA fragments ที่มีขนาดต่างกัน 3 ขนาด คือ 200, 120 และ 55 bp ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. tuberculosis* สายพันธุ์ H37Rv จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในภาพที่ 15

สำหรับตัวอย่างเชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. avium* complex *M. intracellulare* และ Unclassified MAC พบว่ามี PCR product ขนาด 380 bp เท่ากัน แต่เมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *HaeIII* *M. avium* complex จะมี restriction fragment 4 ขนาด ประกอบด้วย 155, 115, 65 และ 40 bp ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. avium* ATCC 25291 จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการดังแสดงในภาพที่ 16 ในขณะที่ *M. intracellulare* มี Enzyme *HaeIII* restriction fragments 3 ขนาด คือ 180, 155 และ 40 bp เมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *MspI* จะได้ DNA fragments 3 ขนาด คือ 220, 105 และ 50 bp ซึ่งผลที่ได้จะเหมือนกับ restriction pattern ของ *M. intracellulare* ที่แสดงโดย dendrogram ของ Sansila et. al. 1998 ในภาพที่ 10 เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. intracellulare* ATCC 13950 จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ดังแสดงในภาพที่ 18 สำหรับ Unclassified MAC จะได้ DNA fragments 2 ขนาด คือ 200 และ 180 bp ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้จะเหมือนกับ restriction pattern ของ Unclassified MAC ที่แสดงโดย dendrogram ของ Sansila et. al. 1998 ในภาพที่ 10 ดังแสดงในภาพที่ 16

เชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. kansasii* มี amplified product ขนาด 380 bp ซึ่งเมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *HaeIII* พบว่าจะไม่มีการตัด เกิด DNA ขนาดเท่าเดิมคือ 380 bp แต่เมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *BstXI* จะมี DNA fragments 2 ขนาด คือ 245 และ 130 bp ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. kansasii* ATCC 12478 จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการดังแสดงในภาพที่ 17

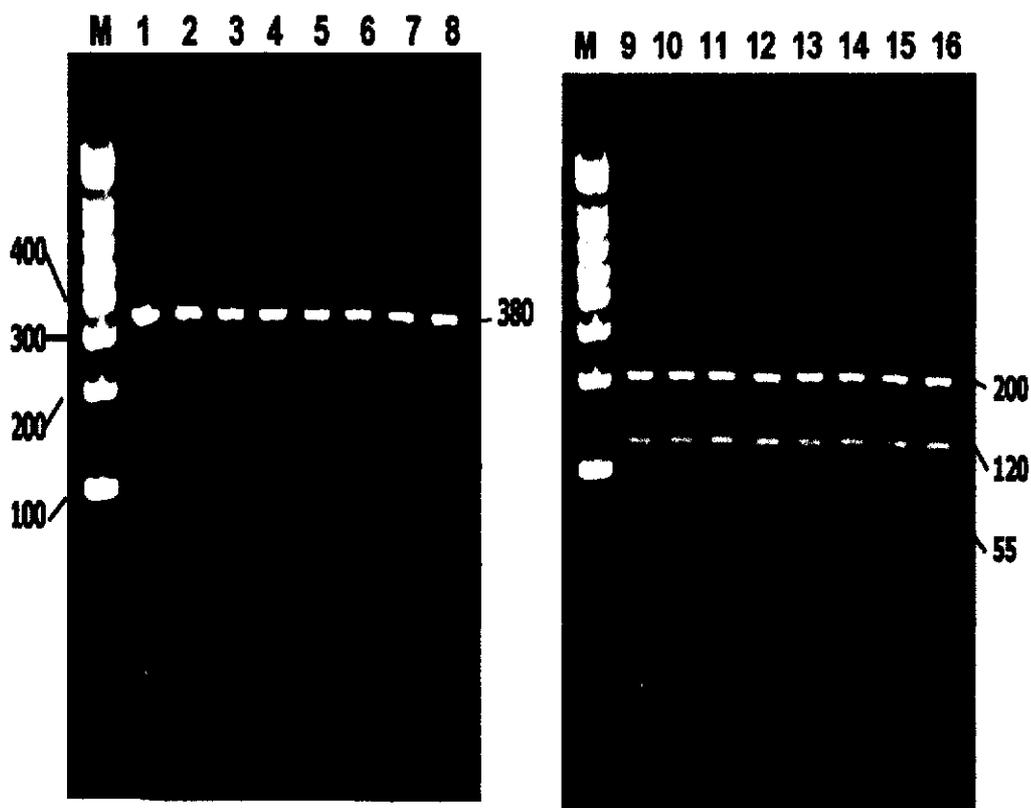
เชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. scrofulaceum* I มี amplified product ขนาด 380 bp ซึ่งเมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *HaeIII* พบว่าจะมี DNA fragments จำนวน 3 ขนาด คือ 180, 155 และ 40 bp เหมือนกับ REA pattern ของ *M. intracellulare* แต่เมื่อนำ amplified product ขนาด 380 bp มาตัดด้วย Enzyme *MspI* จะมี DNA fragments จำนวน 4 ขนาด คือ 155, 105, 75 และ 50 bp ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบ

เทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. scrofulaceum* ATCC 19981 จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการดังแสดงในภาพที่ 18

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ 6 สายพันธุ์ มี amplified product ขนาด 460 bp เมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *Hae*III จะมี restriction pattern เป็นแบบเดียวกับเชื้อมาตรฐาน *M. chelonae* ATCC 0019 โดยมี DNA fragments จำนวน 3 ขนาด คือ 240, 125 และ 90 bp ดังแสดงในภาพที่ 19

พบเชื้อ 4 ตัวอย่าง ที่มี amplified product 2 ขนาด 480 และ 460 bp โดยมี amplified product เหมือนกับ amplified product ของ *M. fortuitum* III ที่แสดงโดย dendrogram ของ Sansila et. al. 1998 ภาพที่ 10 และมีขนาด amplified product เหมือนกับเชื้อมาตรฐาน *M. fortuitum* ATCC 6841 ดังแสดงในภาพที่ 20

เชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. gordonae* และ *M. flavescens* มีเชื้อละ 1 ตัวอย่าง โดยเชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. gordonae* มี amplified product ขนาด 380 bp ซึ่งเมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *Hae*III พบว่าจะไม่มีการตัด ทำให้ได้ DNA ขนาดเท่าเดิมคือ 380 bp แต่เมื่อนำมาตัดด้วย Enzyme *Bst*XI จะมี DNA fragments 2 ขนาด คือ 235 และ 140 bp ซึ่งเมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. gordonae* 330 จะมีลักษณะเหมือนกันทุกประการดังแสดงในภาพที่ 21 และ เชื้อที่วินิจฉัยเป็น *M. flavescens* มี amplified product 2 ขนาดคือ 500 และ 460 bp เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลการทำ PCR-REA ของเชื้อมาตรฐาน *M. flavescens* ATCC 23025 ดัง ภาพที่ 22 เหมือนกับ amplified product ของ *M. flavescens* ที่แสดงโดย dendrogram ของ Sansila et. al. 1998 ในภาพที่ 10

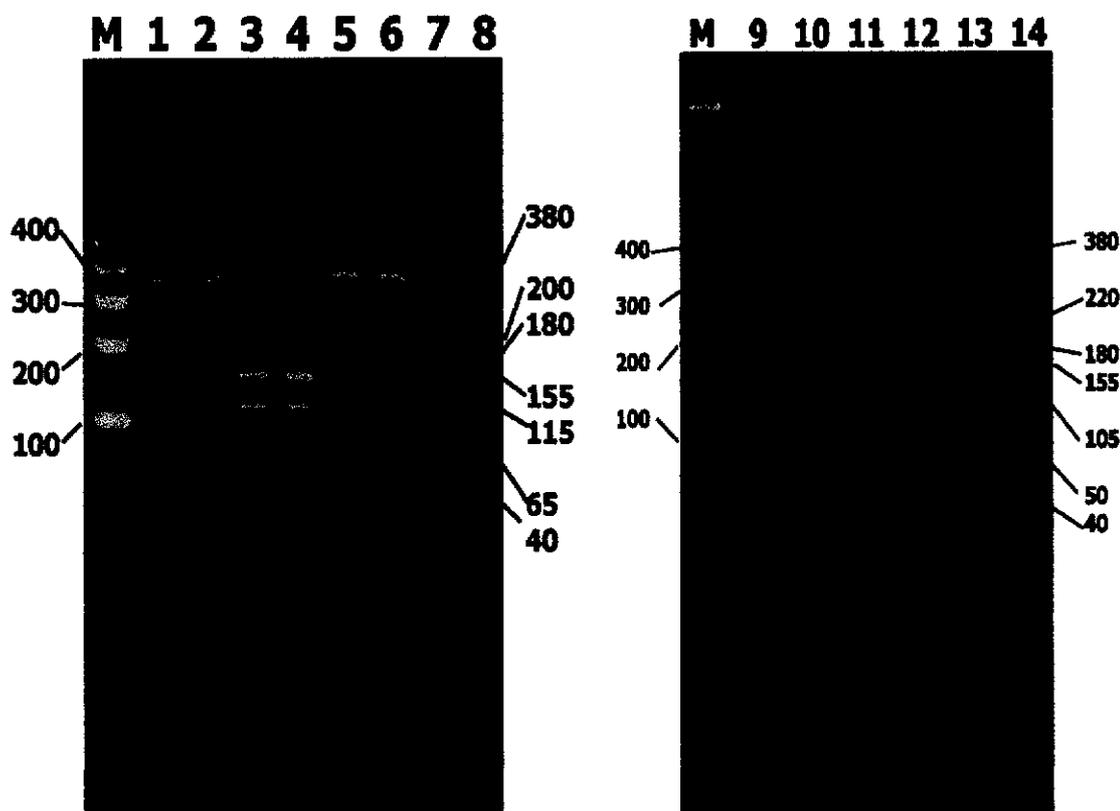


ภาพที่ 15. Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. tuberculosis*

Lane 1-8 Amplified product size of 380 bp of ISR gene of *M. tuberculosis* H37Rv on lane 1; 7 clinical isolates on lane 2-8; S0038, S0052, S0084, S0093, S0182, S0194, and S0203.

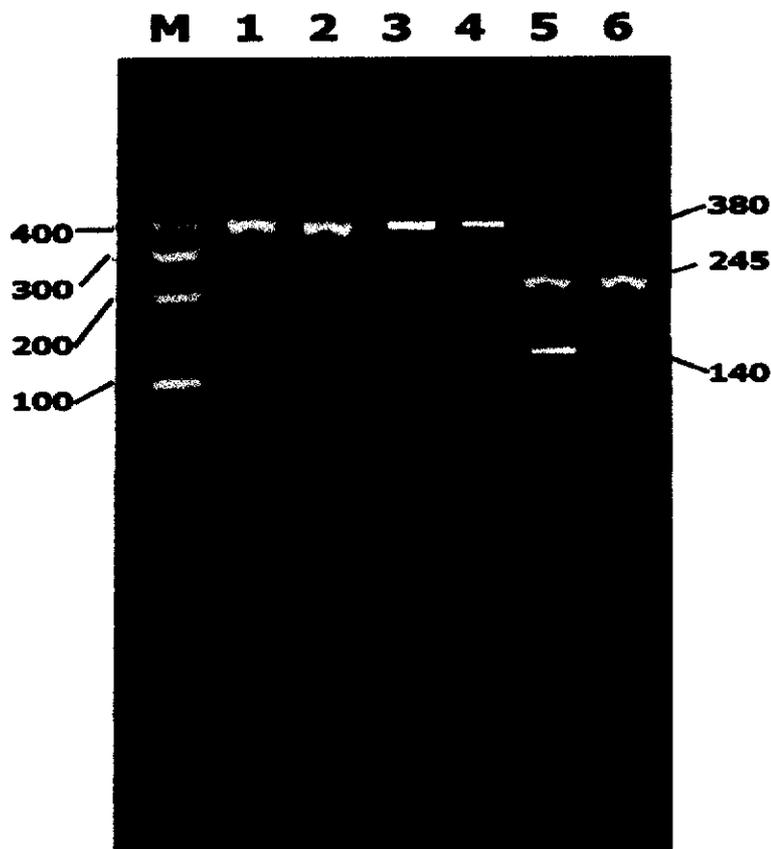
Lane 9-16 Restriction patterns of *Hae*III-digested amplified ISR gene product of 200/120/55 bp of *M. tuberculosis* H37Rv on lane 9; 7 clinical isolates on lane 10-16; S0038, S0052, S0084, S0093, S0182, S0194, and S0203.

Lane M 1 kb plus DNA marker sizes



ภาพที่ 16. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. avium* complex; *M. avium*, *M. intracellulare* and unclassified *M. avium* complex.

- Lane 1-2** Amplified products size 380 bp of ISR gene of *M. avium* ATCC 25291 and a clinical isolate, S0410 , respectively.
- Lane 3-4** Restriction patterns of *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291 and a clinical isolate, S0410 , respectively.
- Lane 5-6** Amplified products size of 380 bp of 16S-23S rDNA spacers of 2 clinical isolates of unclassified *M. avium* complex, S0122 และ S0409.
- Lane 7-8** Restriction patterns of *Hae*III digested products size 200/180 bp of 2 clinical isolates of unclassified *M. avium* complex, S0122 และ S0409.
- Lane 9-10** Amplified products size of 380 bp of ISR gene of *M. intracellulare* ATCC 13950 and a clinical isolate, S0034 , respectively.
- Lane 11, 12** Restriction patterns of *Hae*III digested products size 180/155/40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950 and a clinical isolate, S0034 , respectively.
- Lane 13,14** Restriction patterns of *Msp*I digested product sizes 220/105/50 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950 and a clinical isolate, respectively S0034 , respectively.
- Lane M** 1 kb plus DNA marker sizes



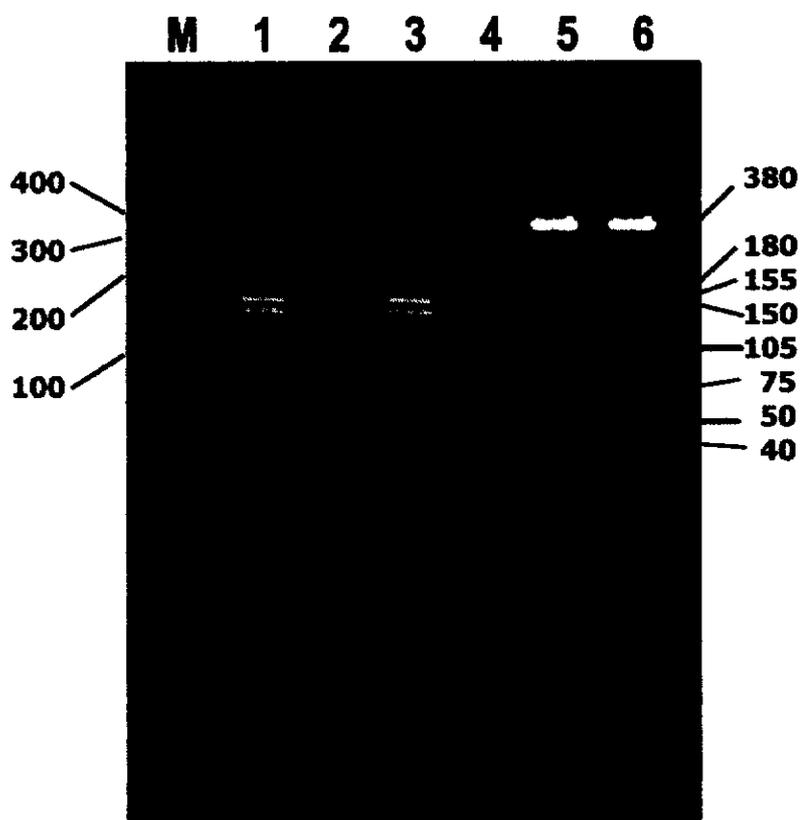
ภาพที่ 17. Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M.kansasii*.

Lane 1,2 Amplified products size of 380 bp of ISR gene of *M. kansasii* ATCC 12478 and a clinical isolate, S0618, respectively.

Lane 3,4 *Hae*III undigested products size of 380 bp of ISR gene of *M. kansasii* ATCC 12478 and a clinical isolate, S0618, respectively.

Lane 5,6 *Bst*XI digested products size 245/130 bp of ISR gene of *M. kansasii* ATCC 12478 and a clinical isolate, S0618, respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker sizes



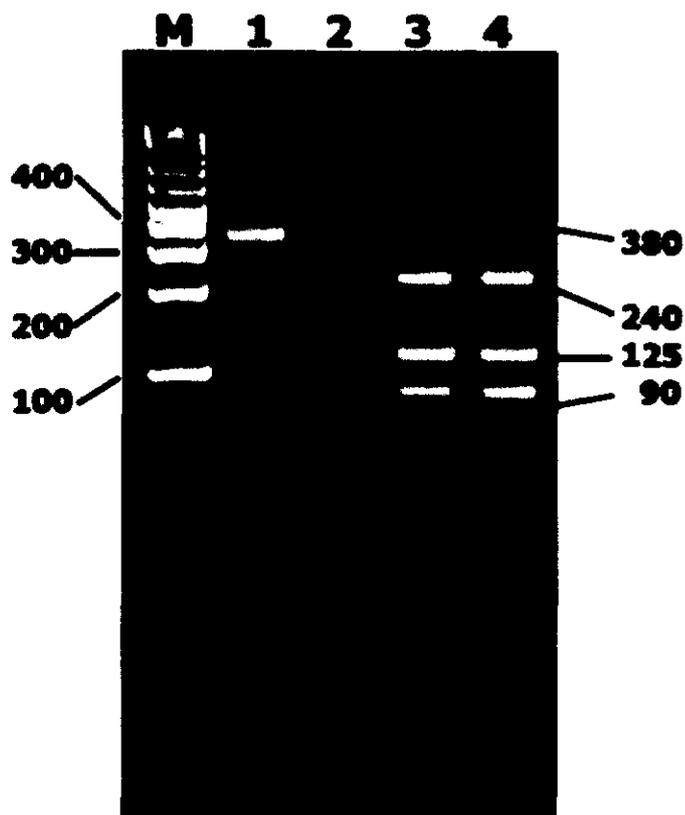
ภาพที่ 18. Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. scrofulaceum*

Lane 5,6 Amplified products size of 380 bp of ISR gene of *M. scrofulaceum* ATCC 19981 and a clinical isolate, S0218, respectively.

Lane 1,3 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. scrofulaceum* ATCC 19981 and a clinical isolate, S0218, respectively.

Lane 2,4 *Msp*I digested product sizes 150/105/75/50 bp of *M. scrofulaceum* ATCC 19981 and a clinical isolate, S0218, respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker

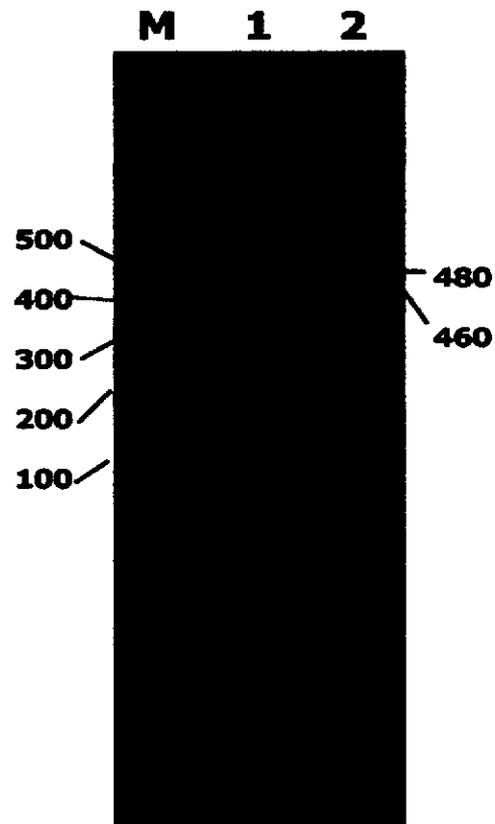


ภาพที่ 19. Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. chelonae*.

Lane 1-2 Amplified products size of 460 bp of ISR gene of *M. chelonae* ATCC 0019 and a clinical isolate, S0415, respectively.

Lane 3-4 *Hae*III digested product sizes 240/125/90 bp of *M. chelonae* ATCC 0019 and a clinical isolate, S0415, respectively.

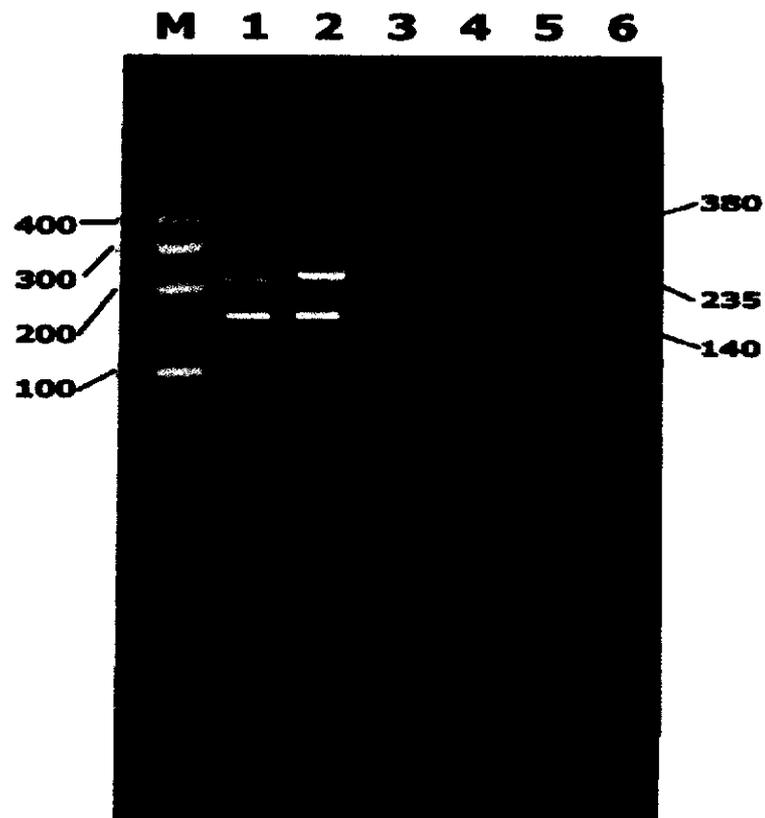
Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 20 Amplified products of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. fortuitum*

Lane 1-2 Amplified products size of 480/460 bp of ISR gene of *M. fortuitum* ATCC 6841 and a clinical isolate, S0015 , respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker



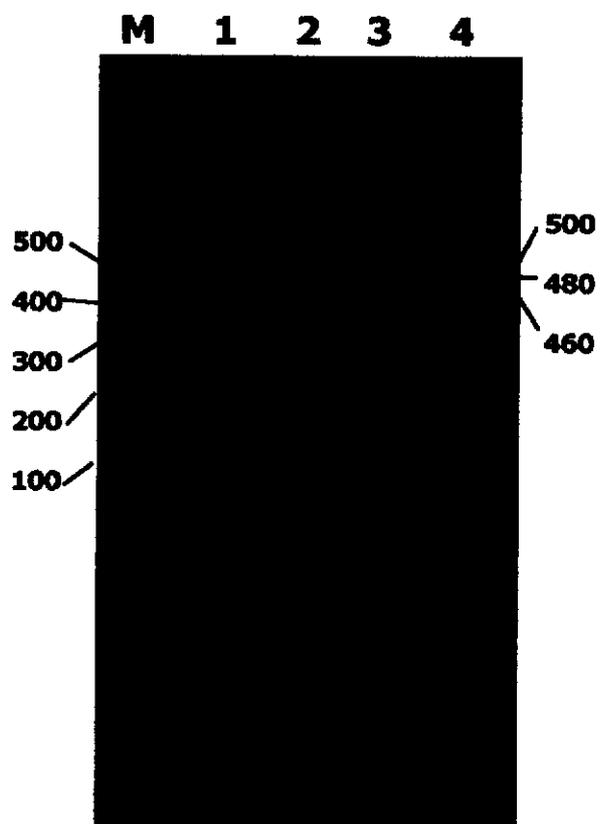
ภาพที่ 21. Amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. gordonae*

Lane 3,4 Amplified products size of 380 bp of ISR gene of *M. gordonae* 330 and a clinical isolate, S0567 , respectively.

Lane 5,6 *Hae*III undigested products size of 380 bp of ISR gene of *M. gordonae* 330 and a clinical isolate, S0567 , respectively.

Lane 1,2 *Bst*XI digested products size 235/140 bp of ISR gene of *M. gordonae* 330 and a clinical isolate, S0567 , respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker sizes



ภาพที่ 22. Amplified products of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. flavescens*.

Lane 1-2 Amplified products size of 500/460 bp of ISR gene of *M. flavescens* ATCC 23035 and a clinical isolate, S0783, respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker sizes

พบว่าเชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกได้จากเสมหะผู้ป่วยเอดส์จำนวน 22 สายพันธุ์ที่ให้การวินิจฉัยโดยวิธี conventional method ซึ่งอาศัยการทดสอบชีวเคมี และการวินิจฉัยโดยวิธี REA-PCR ให้ผลแตกต่างกัน หรือวิธี REA-PCR แยกวินิจฉัยเชื้อไม่ได้เนื่องจากไม่มี pattern ที่ตรงกับ dendrogram ของ Sansila et. al. จะถูกจัดกลุ่มจาก restriction patterns ที่เหมือนกันได้เป็น 8 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 20 และ PCR products of 16S-23S rRNA spacer (interspacer region, ISR) gene ของเชื้อแต่ละกลุ่มจะนำส่ง เพื่อทำการ sequence DNA โดยใช้ 17-mer 16 SC Primer ที่ใช้ในการ amplify 16S-23S rRNA gene spacer เป็น primer DNA sequences of ของ amplified ISR gene ที่วิเคราะห์ได้ จะทำการเปรียบเทียบกับ ISR genes sequences of *Mycobacterium* species ที่ทำการบันทึกไว้ใน GenBank database (www.psc.edu/general/software/packages/genbank/genbank.html) โดยอาศัย ClustalX 1.81 program ซึ่งเป็นโปรแกรมสำหรับเปรียบเทียบ DNA sequence แบบ multiple sequence alignment (Thompson, et al., 1997) จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ phylogenetic analyses ด้วยโปรแกรม PHYLIP 3.6a3 Alpha release program (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/phylip36>) โดยทำการ plot phylogenetic tree แบบ unrooted neighbor-joining method ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกวินิจฉัยไม่ตรงกันทั้ง 8 กลุ่ม เทียบกับ *Mycobacterium* species ต่างๆ ที่ทำการบันทึก ISR gene ไว้ใน GenBank database โดยอาศัยความเหมือนของ DNA sequence ของ ISR gene และคำนวณค่า confidence values สำหรับการจับกลุ่มของเชื้อที่อยู่ในแต่ละแขนงของ phylogenetic tree จากการทดลองจับกลุ่ม 1,000 ครั้ง โดยวิธี bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) ในภาพที่ 23, แสดง phylogenetic tree แบบ no root neighbor-joining tree ที่แสดง DNA alignment ของ ISR gene ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่ผลการแยกวินิจฉัยโดยวิธีการทดสอบชีวเคมี และ PCR-REA ไม่สัมพันธ์กัน กับ *Mycobacterium* species ต่างๆ และแสดงค่า bootstrap values ของแต่ละแขนงของ phylogenetic tree เฉพาะที่มีค่ามากกว่า 70% โดยผลการวินิจฉัยของเชื้อทั้ง 8 กลุ่มโดยการทดสอบชีวเคมี, ขนาด PCR products ของ ISR gene, REA-PCR patterns ของ ISR gene และ species ของ *Mycobacterium* ที่ DNA sequence ของ ISR gene ของเชื้อ 22 สายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงมากที่สุดดังแสดงในตารางที่ 20 ผลการแยกวินิจฉัยของเชื้อทั้ง 8 กลุ่มเป็นดังนี้

กลุ่มที่ 1 : เชื้อที่วินิจฉัยทางชีวเคมีเป็น *M. tuberculosis* 2 สายพันธุ์ เนื่องจากให้ผล Niacin test positive มี PCR products ของ 16S-23S rRNA gene spacer ขนาด 560 bp มี Enzyme *Hae*III restricted pattern ขนาด 210, 160, 150 และ 40 bp ซึ่งแตกต่างจาก PCR-REA pattern ของ *M. tuberculosis* ใน dendrogram ของ Sansila ที่แสดงในภาพที่ 10 และ PCR-REA pattern ของ *M. tuberculosis* H37Rv ดังแสดงในภาพที่ 24 PCR products ของ 16S-23S rRNA gene spacer ของเชื้อในกลุ่มนี้มี DNA sequences เหมือนกับ 16S-23S rRNA spacer gene ของเชื้อ *M. simiae* [Z46426] ดังแสดงใน phylogenetic tree ในภาพที่ 23

เชื้อกลุ่มที่ 2-4 ประกอบด้วยเชื้อที่ให้ผลการทดสอบทางเคมีเหมือนกับเชื้อในกลุ่ม MAC แต่มี REA-PCR patterns ของ ISR gene แตกต่างจาก REA-PCR patterns ของ ISR gene ของ *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellurae* ATCC 13950 and unclassified MAC ที่แสดงใน dendrogram ของ Sansila จาก pattern ของ REA-PCR ของ ISR gene สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มที่มีคุณสมบัติดังนี้

กลุ่มที่ 2 : เชื้อ 1 สายพันธุ์ที่วินิจฉัยโดย conventional method เป็นเชื้อ MAC มี PCR products ขนาด 340 bp และ restricted pattern ของ PCR product ที่ถูกตัดด้วย enzyme *HaeIII* ได้ DNA 2 fragments ขนาด 200 และ 140 bp เหมือนกับ REA-PCR ของ ISR gene ของเชื้อ *M. xenopi* ที่แสดงใน dendrogram ของ Sansila ดังแสดงในภาพที่ 10, 25 ผลของการศึกษา DNA multiple alignment ของ DNA sequence ของ 16S-23S rRNA gene spacer ของ ampification product พบว่ามี alignment กับ ISR gene ของ *M. xenopi* [Y14192] ดังแสดงในภาพที่ 23

กลุ่มที่ 3 : เชื้อที่ผลชีวเคมีวินิจฉัยได้เป็นเชื้อ MAC 2 สายพันธุ์ มี PCR products ของ 16S-23S rRNA gene spacer ขนาด 450 bp โดยมี Enzyme *HaeIII* restricted pattern ขนาด 220, 140 และ 90 bp (ภาพที่ 26) ผลการศึกษา DNA sequences พบว่ามีความเหมือนกับ ISR gene of เชื้อ *M. fortuitum* [AJ291589]. แต่ REA-PCR patterns ของเชื้อทั้ง 2 isolates แตกต่างจาก REA-PCR patterns ของ *M. fortuitum* I-VI ที่แสดงไว้ใน dendrogram ของ Sansila ถึงแม้ว่า products ของ ISR gene of *M. fortuitum* I จะมีขนาด 480/435 bp, *M. fortuitum* II จะมีขนาด 460/435 bp, *M. fortuitum* III จะมีขนาด 480/460 bp, *M. fortuitum* IV จะมีขนาด 470/440 bp, *M. fortuitum* V จะมีขนาด 445/435 bp และ *M. fortuitum* VI จะมีขนาด 435 bp ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ PCR products ของเชื้อทั้ง 2 ในกลุ่มนี้ แต่ PCR products of *M. fortuitum* I-VI ของ Sansila ไม่ถูกตัดด้วย *HaeIII* และ *BstXI*

กลุ่มที่ 4 : เชื้อที่ผลชีวเคมีวินิจฉัยได้เป็นเชื้อ MAC 1 สายพันธุ์ และ *M. flavescens* 1 สายพันธุ์ มี PCR products ขนาด 380 bp โดยมี *HaeIII* restricted pattern ขนาด 190, 110 และ 80 bp. (ภาพที่ 27) ซึ่งผลการศึกษา multiple alignment ของ DNA sequences ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความเหมือนกับ ISR gene ของ *M. gordonae* [L42260]

กลุ่มที่ 5 : เชื้อ 10 สายพันธุ์ที่วินิจฉัยโดย conventional method เป็นเชื้อ MAC 8 สายพันธุ์ และ เชื้อ *M. gordonae* 2 สายพันธุ์ มี PCR products ขนาด 380 bp และ restricted pattern ของ PCR product ที่ถูกตัดด้วย enzyme *HaeIII* ได้ DNA 3 fragments ขนาด 190, 115 และ 75 bp (ภาพที่ 28) ซึ่งแตกต่างจาก REA-PCR ของ ISR ของเชื้อ MAC และเชื้อ *M. gordonae* ที่แสดงใน dendrogram ของ Sansila ผลของ DNA sequence ของ ISR gene ของ ampification product เมื่อเปรียบเทียบกับ gene sequence ของ ISR gene ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่บันทึกใน GenBank พบมี alignment กับ ISR gene spacer ของ *M. avium* สายพันธุ์ RiVM9601918 [AF315833]

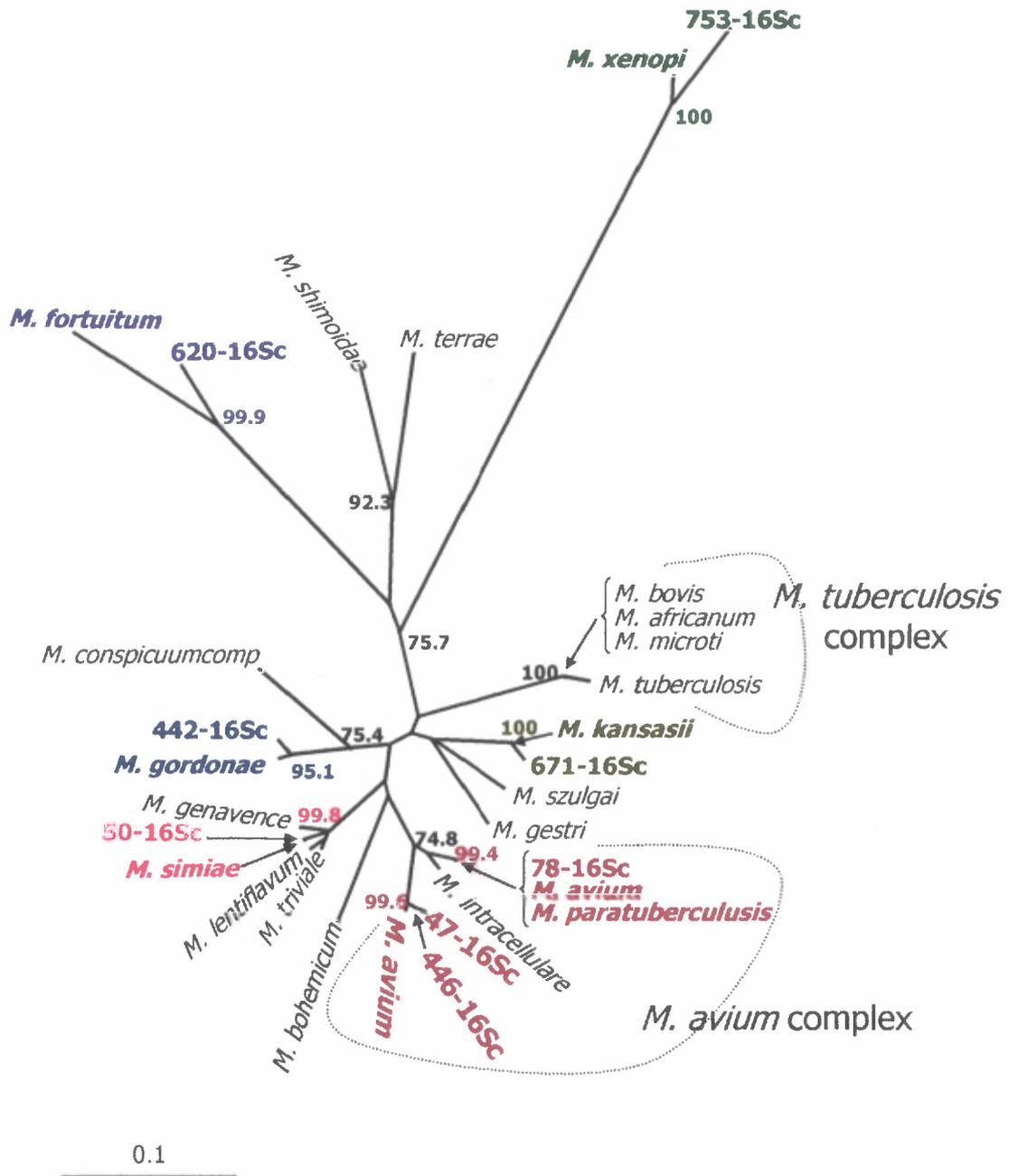
กลุ่มที่ 6 : เชื้อที่วินิจฉัยทางชีวเคมีเป็น *M. scrofulaceum* 2 สายพันธุ์ มี PCR products ของ ISR gene spacer ขนาด 440 bp มี restricted pattern ของ enzyme *HaeIII* ขนาด 190, 90, 70, 60 และ 30 bp แตกต่างจาก REA-PCR ของ ISR ของเชื้อ MAC และเชื้อ *M. scrofulaceum* ที่แสดงใน dendrogram ของ Sansila (ภาพที่ 29) เมื่อเปรียบเทียบ gene sequence ของ ISR gene ของเชื้อ ทั้ง 2 กับ *Mycobacterium* ที่บันทึกใน GenBank พบมี alignment กับ ISR gene spacer ของ *M. avium* สายพันธุ์ RiVM9601918 [AF315833] เช่นเดียวกับ เชื้อในกลุ่มที่ 5 แต่มี PCR-REA แตกต่างกัน

กลุ่มที่ 7 : เชื้อที่ผลชีวเคมีวินิจฉัยได้เป็น *M. chelonae* มี PCR products ของ 16S-23S rRNA gene spacer ขนาด ~ 380 bp และมี Enzyme *HaeIII* restricted pattern ขนาด 155/115/65/40 bp ซึ่งเหมือนกับ REA-PCR pattern ของ ISR gene ของ *M. avium* ATCC 25291 และเหมือนกับ REA-PCR pattern ของ ISR gene ของ *M. avium* ที่แสดงใน dendrogram ของ Sansila (ภาพที่ 30) ซึ่ง PCR products ของ ISR gene มี DNA sequences เหมือนกับ ISR gene ของเชื้อ *M. avium* Myc373 [AF410479]

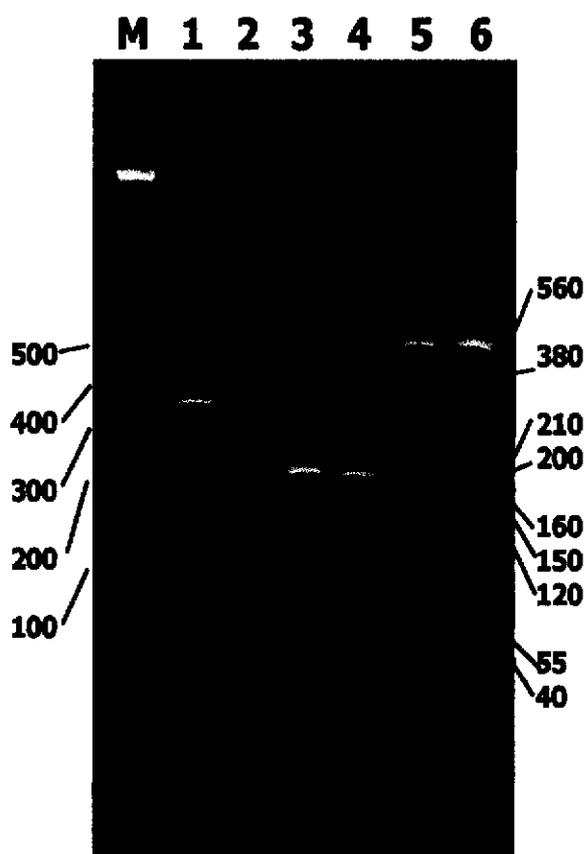
กลุ่มที่ 8 : เชื้อ photochromogens mycobacteria ที่วินิจฉัยทางชีวเคมีเป็น *M. simiae* 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเสมหะผู้ป่วยคนเดียวกัน มี PCR products ของ ISR gene ขนาด 380 bp แต่เมื่อตัดด้วย enzyme *HaeIII* พบมีชิ้นส่วน DNA 4 ขนาด ประกอบด้วย DNA ที่ไม่สามารถถูกตัดด้วย enzyme *HaeIII* ขนาด 380 bp และมี ชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัด 3 ชิ้น ขนาด 200, 120 และ 55 bp คล้ายกับ *HaeIII* restricted patterns ของ *M. tuberculosis* คล้ายว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ 2 ชนิด เมื่อนำไป subculture ของเชื้อทั้ง 2 บน Middlebrook 7H10 agar ได้ isolate colony ของเชื้อ photochromogens mycobacteria ที่มี PCR products ของ ISR gene ขนาด 380 bp ซึ่งไม่สามารถตัดด้วย *HaeIII* enzyme แต่ restricted patterns ของ *BstXI* ขนาด 245 และ 130 bp (ภาพที่ 31) DNA sequences ของ ISR gene ของเชื้อนี้ เหมือนกับ ISR gene ของเชื้อ *M. kansasii*[AB026695].

ตารางที่ 20 ผลการวินิจฉัยโดยชีวเคมี, REA-PCR patterns และความเหมือนของ DNA sequence ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่ผลการแยกวินิจฉัยทางชีวเคมี และ REA-PCR ไม่ตรงกัน

Group	Biochemical Test	No. of Isolates	PCR Product	Enz <i>Hae</i> III				Enz <i>Bst</i> XI	DNA sequence Alignments
I	<i>M. tuberculosis</i> (S0050, S0696)	2	560	210	160	150	40		<i>M. simiae</i> [Z46426]
II	MAC (S0753)	1	340	200	140				<i>M. xenopi</i> [Y14192]
III	MAC (S0620-0621)	2	450	220	140	90			<i>M. fortuitum</i> [AJ291589]
IV	MAC (S0747)	1	380	190	110	80			<i>M. goodnae</i> [L42260]
	<i>M. flavescens</i> (S0442)	1	380	190	110	80			
V	MAC (S0047-0049, S0118, S0572, S0668-0669, S0849)	8	380	190	115	75			<i>M. avium</i> RiVM 9601918 [AF315833]
	<i>M. goodnae</i> (S0455-0456)	2	380	190	115	75			
VI	<i>M. scrofulaceum</i> (S0446-0447)	2	440	190	90	70	60	30	<i>M. avium</i> RiVM 9601918 [AF315833]
VII	<i>M. chelonae</i> (S0078)	1	~380	155	115	65	40		<i>M. avium</i> Myc373 [AF410479]
VIII	<i>M. simiae</i> (S0671-0672)	2	380	380				245 130	<i>M. kansasii</i> [AB026695]
Total		22							

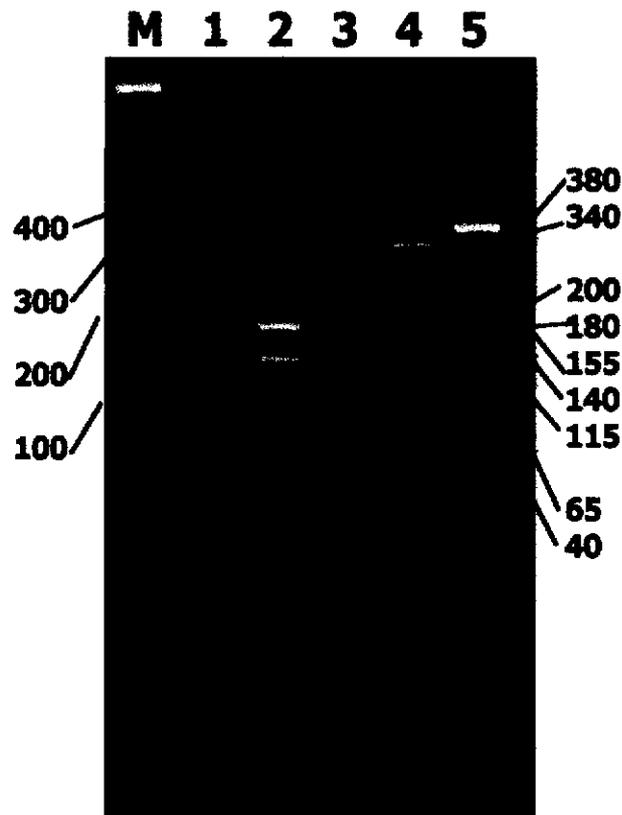


ภาพที่ 23 Phylogenetic tree แบบ no root neighbor-joining tree ที่แสดง DNA alignment ของ gene sequence ของ 16S-23S rRNA spacer gene ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่ผลการแยกวินิจฉัย โดยวิธีการทดสอบชีวเคมี และ PCR-REA ไม่สัมพันธ์กัน กับ *Mycobacterium* species ต่างๆ โดยอาศัยความเหมือนของ DNA sequence ของ ISR gene และแสดงค่า bootstrap values ของแต่ละแขนงของ phylogenetic tree เฉพาะที่มีค่ามากกว่า 70%



ภาพที่ 24. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv with 2 clinical isolates that belong in group 1 unidentified *Mycobacterium* that their ISR gene sequences were closely related to ISR gene of *M. simiae* [Z46426] in the GenBank database.

- Lane 1** Amplified ISR gene product size 380 bp of *M. tuberculosis* H37Rv
- Lane 2** *Hae*III digested product sizes 200/120/55 bp of *M. tuberculosis* H37Rv
- Lane 3,4** *Hae*III digested product sizes 210/160/150/40 bp of 2 Unidentified *Mycobacterium* group 1
- Lane 5,6** Amplified ISR gene product size 560 bp of 2 unidentified *Mycobacterium* group 1
- Lane M** 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 25. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region; ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950 and a clinical isolate that belong in group 2 unidentified *Mycobacterium* that its DNA sequences was closely related to ISR gene of *M. xenopi* [Y14192] in the GenBank database.

Lane 1 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950

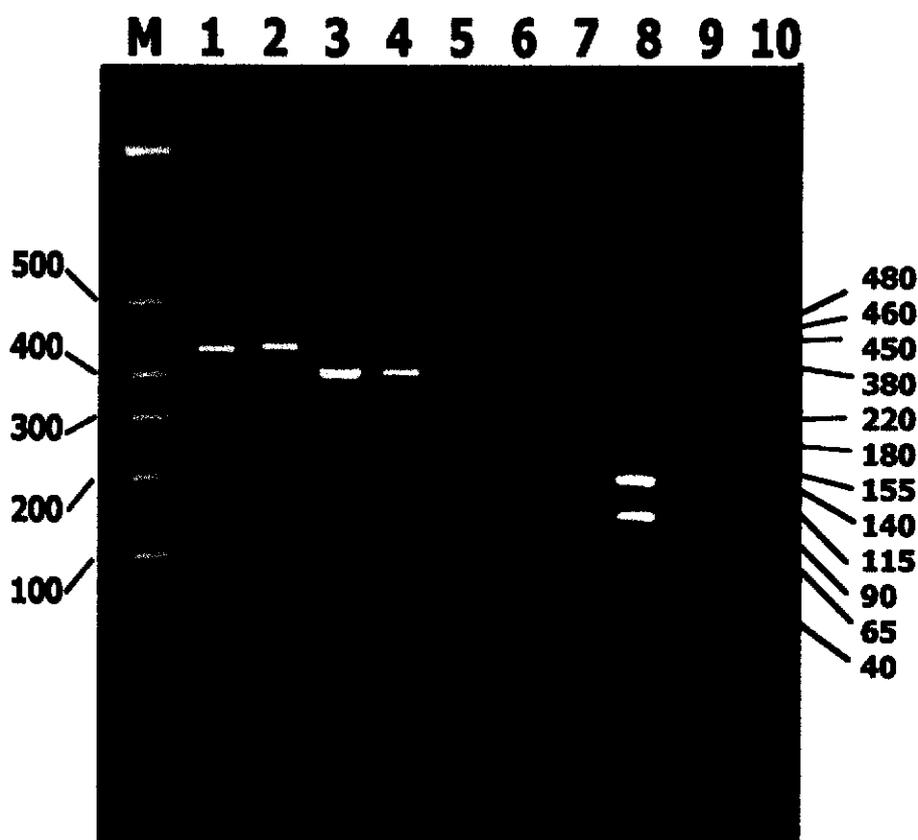
Lane 2 *Hae*III digested product sizes 200/140 bp of an isolate that belong in Group 2 unidentified *Mycobacterium*

Lane 3 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291

Lane 4 Amplified ISR gene product size 340 bp of an isolate that belong in unidentified *Mycobacterium* group 2

Lane 5 Amplified ISR gene product size 380 bp of *M. avium* ATCC 25291

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 26. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. fortuitum* ATCC 6841 and 2 clinical isolates that belong in group 3 unidentified *Mycobacterium* that their DNA sequences were closely related to ISR gene of *M. fortuitum*[AJ291589] in the GenBank database.

Lane 1,2 Amplified ISR gene product size 450 bp of 2 isolates that belong in unidentified *Mycobacterium* group 3

Lane 3,4 Amplified ISR gene product size 380 bp of *M. avium* ATCC 25291 and *M. intracellulare* ATCC 13950, respectively.

Lane 5 Amplified products size of 480/460 bp of ISR gene of *M. fortuitum* ATCC 6841.

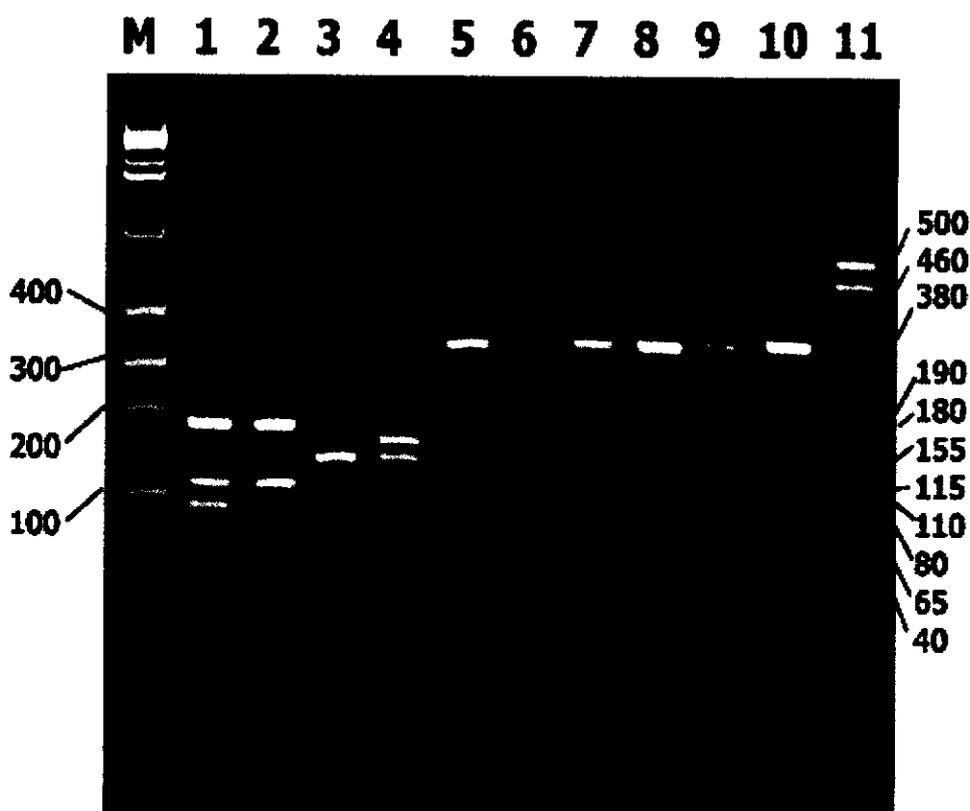
Lane 6,7 *Hae*III digested product sizes 220/140/90 bp of 2 isolates that belong in unidentified *Mycobacterium* group 3

Lane 8 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291

Lane 9 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950

Lane 10 *Hae*III undigested product sizes 480/460 bp of *M. fortuitum* ATCC 6841

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 27. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. flavescens* ATCC 23035 and *M. gordonae* 330 with 2 clinical isolates that belong in group 4 unidentified *Mycobacterium* that their DNA sequences were closely related to ISR gene of *M. gordonae* [L42260] in the GenBank database.

Lane 1,2 *Hae*III digested product sizes 190/110/80 bp of 2 clinical isolates that belong in group 4 unidentified *Mycobacterium*.

Lane 3 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291.

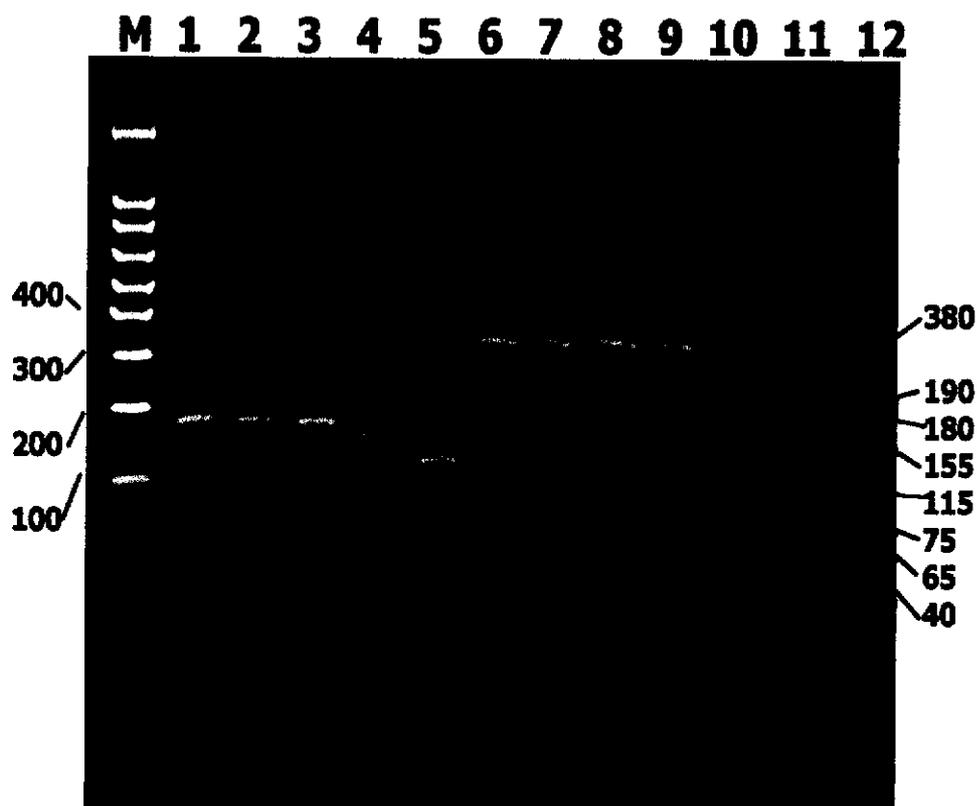
Lane 4 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950.

Lane 5 *Hae*III undigested product sizes 380 bp of *M. gordonae* 330.

Lane 6-10 Amplified products size of 380 bp of ISR gene of 2 isolates of unidentified *Mycobacterium* group 4, *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950 and *M. gordonae* 330, respectively.

Lane 11 Amplified products size of 500/460 bp of ISR gene of *M. flavescens* ATCC 23035

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 28. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950 and *M. goodnae* 330 with 3 clinical isolates that belong in group 5 unidentified *Mycobacterium* that their DNA sequences were closely related to ISR gene of *M. avium* RiVM 9601918 [AF315833] in the GenBank database.

Lane 1-3 *Hae*III digested product sizes 190/115/75 bp of 3 of 10 isolates that belong in group 5 unidentified *Mycobacterium*

Lane 4 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950

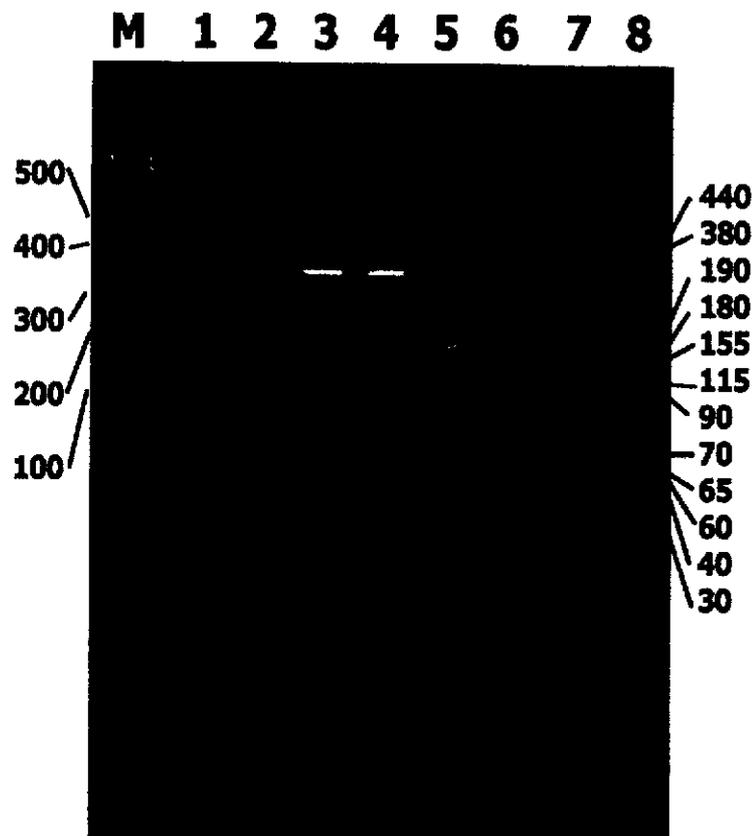
Lane 5 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291

Lane 6 *Hae*III undigested product sizes 380 bp of *M. goodnae* 330

Lane 7-9 Amplified products size of 380 bp of ISR gene of 3 of 10 clinical isolates that belong in group 5 unidentified *Mycobacterium*

Lane 10-12 Amplified products size of ~380 bp of ISR gene of *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. avium* ATCC 25291 and *M. goodnae* 330, respectively.

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 29. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291 and *M. scrofulaceum* ATCC 19981 with 2 clinical isolates that belong in group 6 unidentified *Mycobacterium* that their DNA sequences were closely related to ISR gene of *M. avium* RiVM 9601918 [AF315833] in the GenBank database.

Lane 1,2 Amplified products size of ~440 bp of 16S-23S rDNA spacers of a clinical isolate that belong in group 6 unidentified *Mycobacterium*.

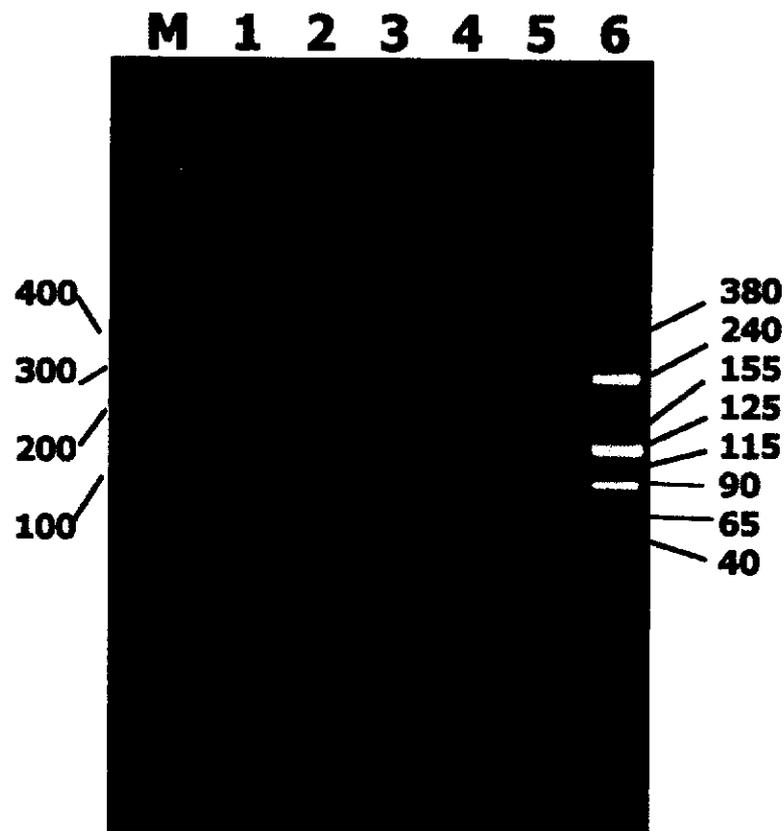
Lane 3,4 Amplified products size of ~380 bp of 16S-23S rDNA spacers of *M. avium* ATCC 25291 and *M. scrofulaceum* ATCC 19981, respectively.

Lane 5,6 *Hae*III digested product sizes 190/90/70/60/30 bp of a clinical isolate that belong in group 6 unidentified *Mycobacterium*

Lane 7 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291

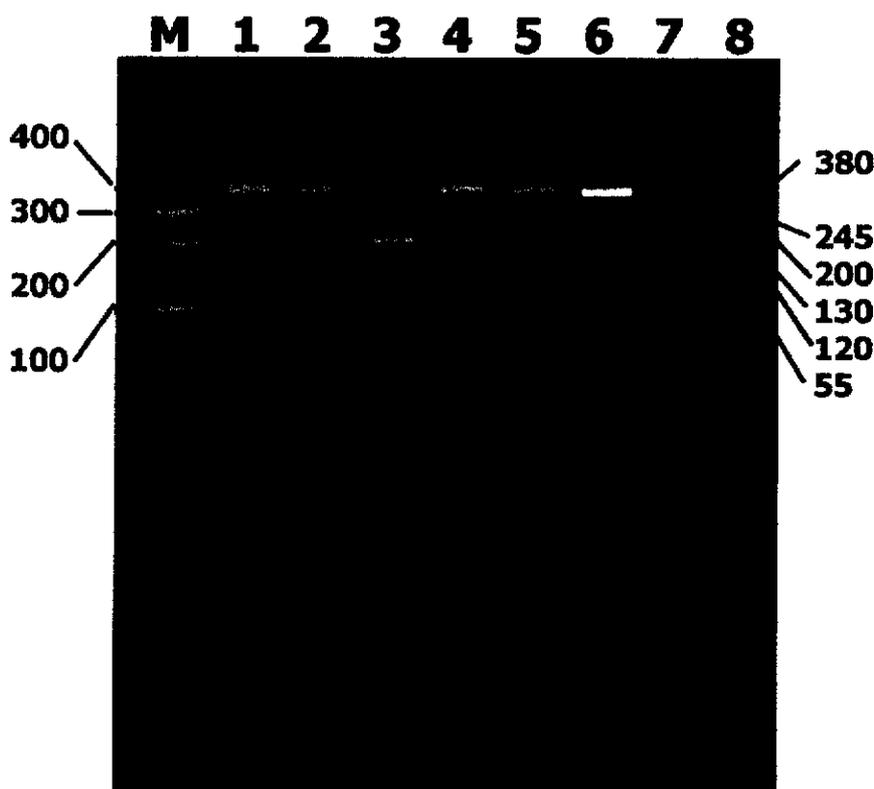
Lane 8 *Hae*III digested product sizes 180/155/40 bp of *M. scrofulaceum* ATCC 19981

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 30. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. avium* ATCC 25291 and *M. chelonae* ATCC 0019 with a clinical isolate that belong in group 7 unidentified *Mycobacterium* that their DNA sequences were closely related to ISR gene of *M. avium* Myc373 [AF410479] in the GenBank database.

- Lane 1** Amplified products size of ~380 bp of 16S-23S rDNA spacers of a clinical isolate that belong in group 7 unidentified *Mycobacterium*
- Lane 2** *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of a clinical isolate that belong in group 7 unidentified *Mycobacterium*
- Lane 3** *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291
- Lane 4** Amplified products size of ~380 bp of 16S-23S rDNA spacers of *M. avium* ATCC 25291
- Lane 5** Amplified products size of 460 bp of ISR gene of *M. chelonae* ATCC 0019.
- Lane 6** *Hae*III digested product sizes 240/125/90 bp of *M. chelonae* ATCC 0019.
- Lane M** 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 31. Comparison of amplified products and restriction patterns of 16S-23S rDNA spacers (interspacer region;ISR) gene of *M. kansasii* ATCC 12478 and *M. tuberculosis* H37Rv with one of the clinical isolates that belong in group 8 unidentified *Mycobacterium*, before and after subculture. DNA sequences of ISR gene of pure culture of an isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium* was closely related to ISR gene of *M. kansasii* [AB026695] in the GenBank database.

Lane 1 Amplified products size of ~380 bp of ISR gene of a clinical isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium*, before subculture.

Lane 2 *Hae*III digested product sizes 380/200/120/55 bp of a clinical isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium*, before subculture.

Lane 3 *Hae*III digested product sizes 200/120/55 bp of *M. tuberculosis* H37Rv.

Lane 4 Amplified products size of ~380 bp of ISR gene of a clinical isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium*, after subculture.

Lane 5,6 *Hae*III undigested product sizes 380 bp of a clinical isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium*, after subculture, and *M. kansasii* ATCC 12478.

Lane 7,8 *Bst*XI digested product sizes 245/130 bp of a clinical isolate in group 8 unidentified *Mycobacterium*, after subculture, and *M. kansasii* ATCC 12478.

Lane M 1 kb plus DNA marker

2.5 การเปรียบเทียบผลการย้อม Acid fast stain กับการเพาะเชื้อ

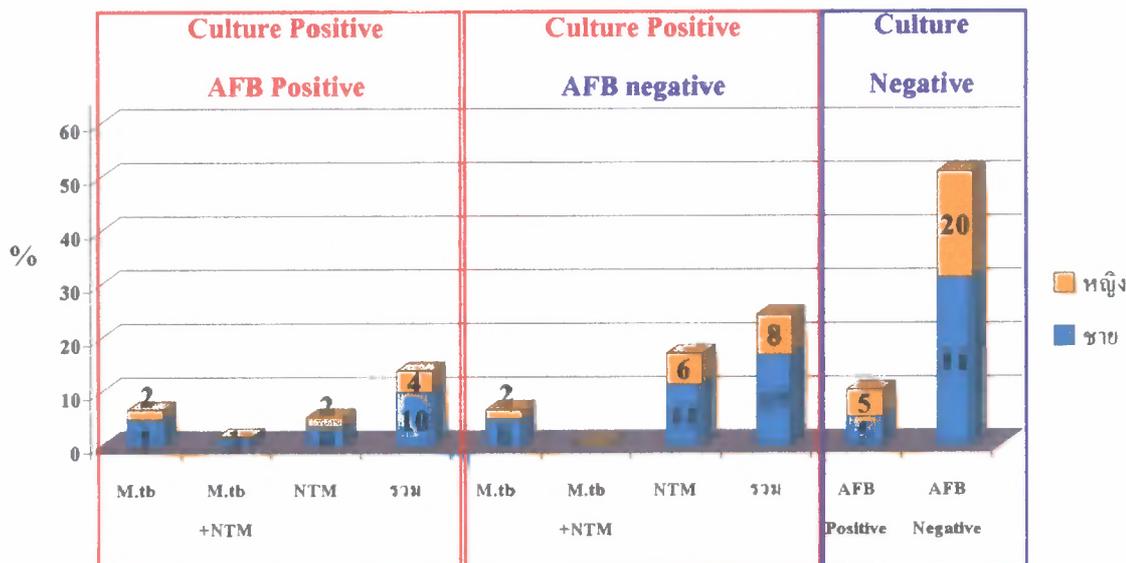
เมื่อเปรียบเทียบผลการย้อมหาเชื้อ acid fast bacilli (AFB) จากเสมหะ โดยตรงและเสมหะที่ทำ การเตรียมที่มีความเข้มข้นกับการเพาะเชื้อพบว่าเสมหะของผู้ป่วยที่สามารถตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* โดยการเพาะแยกเชื้อ 107 ราย ย้อมพบ AFB positive จากเสมหะของผู้ป่วย 39 ราย ซึ่งเป็นชาย 28 คน หญิง 11 คน คิดเป็นร้อยละ 14.03, 10.07 และ 3.96 ตามลำดับ ตรวจไม่พบ AFB จากเสมหะของผู้ป่วย 68 ราย ซึ่งเป็นชาย 47 คน หญิง 21 คน คิดเป็นร้อยละ 24.46, 16.91 และ 7.55 ตามลำดับ เสมหะของผู้ป่วยที่เพาะ ไม่พบเชื้อ *Mycobacterium* มีจำนวน 171 ราย ในจำนวนนี้ย้อมพบ AFB positive 29 ราย และย้อมไม่พบเชื้อจำนวน 142 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.43 และ 51.08 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าผลการย้อมและการเพาะเชื้อให้ผลสอดคล้องกัน 181 ราย หรือ ร้อยละ 65.11 การเปรียบเทียบ ผลการย้อม acid fast stain และ ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ Nontuberculous Mycobacteria (NTM) จากเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ แสดงในตารางที่ 21 และภาพที่ 32

2.6 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อ กับการได้รับยาต้านวัณโรค

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อกับการได้รับยา ต้านวัณโรค พบว่าจากผู้ป่วย 278 คน เพาะแยกเชื้อได้ *M. tuberculosis* 29 คน ไม่เคยได้รับยา 20 คน ไม่แน่ใจ 2 คน ไม่มีข้อมูล 2 คน และเคยได้รับยาต้านวัณโรค 5 คน เพาะแยกเชื้อได้ NTM 34 คน ไม่ เคยได้รับยา 29 คน และเคยได้รับยาต้านวัณโรค 5 คน เพาะแยกเชื้อได้ *M. tuberculosis* ร่วมกับ NTM 3 คน ไม่เคยได้รับยา 2 คน และเคยได้รับยาต้านวัณโรค 1 คน เพาะเชื้อไม่ขึ้น 212 คน ไม่เคยได้รับยา 143 คน ไม่แน่ใจ 13 คน ไม่มีข้อมูล 2 คน เคยได้รับยามานานกว่า 1 ปี 5 คน และเคยได้รับยาต้านวัณ โรค 54 คน จากการสอบประวัติพบผู้ป่วยที่กำลังกินยาต้านวัณโรคที่แยกเชื้อ *Mycobacterium* จาก เสมหะได้มี 11 คน พบเชื้อจากการย้อมเสมหะ 6 คน ในจำนวนนี้แยกได้ *M. tuberculosis* 5 คน ซึ่งพบ เชื้อ *M. fortuitum* ร่วมด้วย 1 คน และแยกได้เชื้อ *M. chelonae* 1 คน พบผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อโดยการ ย้อมแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นสอบประวัติว่ากำลังกินยาต้านวัณโรคมี 8 คน ตรวจพบเชื้อโดยการย้อมจาก เสมหะแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นแต่ไม่ได้แจ้งประวัติว่ากินยาต้านวัณโรค 31 คน ผลการเพาะแยกเชื้อจาก เสมหะเปรียบเทียบกับ การได้รับยาต้านวัณโรค แสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 21 ผลการย้อม Ziehl-Neelsen acid fast stain และ ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* (*M.tb*) และ Nontuberculosis Mycobacterium (NTM) ของเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์

ผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	ผลการผลการเพาะเชื้อ และ ผลการย้อม acid fast stain									
	Culture Positive								Culture Negative	
	AFB Positive				AFB Negative				AFB	
	M.tb	M.tb + NTM	NTM	รวม	M.tb	M.tb + NTM	NTM	รวม	Positive	Negative
ชาย	14	4	10	28	14	1	32	47	15	87
177	5.04%	1.44%	3.60%	10.07%	5.04%	0.36%	11.51%	16.91%	5.40%	31.29%
หญิง	5	1	5	11	5	0	16	21	14	55
101	1.80%	0.36%	1.80%	3.96%	1.80%	0.00%	5.76%	7.55%	5.04%	19.78%
รวม	19	5	15	39	19	1	48	68	29	142
278	6.83%	1.80%	5.40%	14.03%	6.83%	0.36%	17.27%	24.46%	10.43%	51.08%
รวม 107 คน									รวม 171 คน	



ภาพที่ 32 ร้อยละของผู้ป่วยเอดส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะ โดยการเพาะเชื้อ เทียบกับการย้อมพบ AFB

ตารางที่ 22 ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ Nontuberculosis *Mycobacterium* จากเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ และการได้รับยาต้านวัณโรค

ผลการเพาะเชื้อ	จำนวนผู้ป่วย (คน)													
	ไม่พบ รับยา	ไม่ แน่ใจ	ไม่มี ข้อมูล	รับยา >1 y	ได้รับยา		ได้รับยา		ได้รับยา		ได้รับยา		รวมเคย ได้รับยา	
					1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด						
				H	R	HR	HE	HS	HRE	HRZ	HEZ	HREZ		
<i>M.tb</i>														
38	25	2	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	8	10
NTM														
63	49	2	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	9	11
<i>M.tb</i> + NTM														
6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
No growth														
171	115	11	2	4	2	1	6	1	1	2	1	0	24	38
รวม 278	194	15	4	5	2	2	7	1	1	2	2	1	42	60

2.7 ผลการเพาะเชื้อกับจำนวนเสมหะที่นำส่ง

จากเสมหะของผู้ป่วยที่สามารถเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* 66 ราย มีผู้นำส่งเสมหะให้ตรวจหาเชื้อตั้งแต่ 1-6 ครั้ง เมื่อเทียบสัดส่วนของจำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ 1-6 ครั้ง พบว่าสัดส่วนของการตรวจพบเชื้อในผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ 1-2 ครั้ง น้อยกว่าผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ 3-6 ครั้ง โดยพบเชื้อร้อยละของจำนวนเสมหะที่นำส่ง 1 และ 2 ครั้ง เท่ากับ 6.25 และ 15.63 ตามลำดับ ขณะที่ผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ 3-6 ครั้ง พบเชื้อร้อยละของจำนวนเสมหะที่นำส่ง 3-6 ครั้ง 23.58, 100.00, 66.67 และ 61.54 ตามลำดับ ขณะที่พบว่ามิผู้ป่วยชายที่ตรวจไม่พบเชื้อจากเสมหะ 1 ราย ส่งเสมหะยืนยันการตรวจไม่พบเชื้อถึง 9 ครั้ง ซึ่งพบว่าในผู้ป่วย 66 ราย นำส่งเสมหะ 220 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อเพียง 146 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.36 ดังนั้นหากส่งเสมหะตรวจหาการติดเชื้อ *Mycobacterium* จำนวน 1-2 ครั้งจะลดโอกาสตรวจพบเชื้อ โดยเฉพาะในคนไข้โรคเอดส์ที่มีภูมิคุ้มกันตามระบบ CMIR ต่ำ ทำให้การเกิดโพรงแผลในปอดลดลง มีปริมาณเสมหะลดลง และมีเชื้อในเสมหะลดลง ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ Nontuberculosis *Mycobacterium* (NTM) ของเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์ตามจำนวนเสมหะที่นำส่ง แสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ Nontuberculosis Mycobacterium (NTM) ของเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์ตามจำนวนเสมหะที่นำส่ง

จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (คน)	จำนวนเสมหะที่นำส่ง (ครั้ง)						
	1	2	3	4	5	6	9
Culture Positive 107	6 2.16%	10 3.60%	76 27.34%	1 0.36%	2 0.72%	11 3.96%	1 0.36%
<i>M. tuberculosis</i> 38	4 1.44%	2 0.72%	28 10.07%	1 0.36%	0 0.00%	3 1.08%	0 0.00%
<i>M. tuberculosis</i> + NTM 6	0 0.00%	0 0.00%	4 1.44%	0 0.00%	0 0.00%	2 0.72%	0 0.00%
NTM 63	2 0.72%	8 2.88%	44 15.83%	0 0.00%	2 0.72%	6 2.16%	1 0.36%
Culture Negative 171	10 3.60%	22 7.91%	136 48.92%	0 0.00%	1 0.36%	2 0.72%	0 0.00%
รวม 278	16	32	212	1	3	13	1

3. การตรวจหาการติดเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด

3.1 ประวัติผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture

i. อายุผู้ป่วย

จากการสำรวจแบบสอบถามผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ พบว่ามีอายุระหว่าง 19-63 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 35.06 ปี ผู้ป่วยชาย มีอายุระหว่าง 22-63 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 35.25 ปี ผู้ป่วยหญิงมีอายุระหว่าง 19-54 ปี โดยมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 34.75 ปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอายุในช่วง 30-39 ปี 20-29 ปี และ 40-49 คิดเป็นร้อยละ 45.05, 25.27 และ 23.08 ตามลำดับ โดยช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture แสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ช่วงอายุของผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture

อายุ	ช่วงอายุผู้ป่วยที่นำส่งเลือด			
	ชาย	หญิง	รวม	%
0-14	0	0	0	0
15-19	0	1	1	0.55
20-29	27	19	46	25.41
30-39	55	27	82	45.30
40-49	23	18	41	22.65
50-59	6	3	9	4.97
60 ขึ้นไป	1	0	1	0.55
ไม่ทราบอายุ	1	0	1	0.55
รวม	113	68	181	100

ii. อาการทางคลินิก

ผู้ป่วยเอกสัที่ตรวจหาการติดเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด เป็นผู้ที่มีอาการไข้คือ มีอุณหภูมิสูงกว่า 38°C มากกว่า 1 สัปดาห์ หรือแสดงอาการทางคลินิกของวัณโรคอย่างใดอย่างหนึ่ง ได้แก่ น้ำหนักลด เจ็บหน้าอก เหนื่อยหอบ เหงื่อออกกลางคืน ไอเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ไอเป็นเลือด จากผลการสำรวจอาการสำคัญของผู้ป่วยตามแบบสอบถาม พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษามีอาการไข้ จำนวน 72 คน คิดเป็นร้อยละ 39.77 สำหรับอาการทางคลินิกของวัณโรคพบผู้ป่วยมีอาการไอเรื้อรังมากที่สุด 103 คน โดยมีอาการไอเรื้อรังน้อยกว่า 1 สัปดาห์ 28 คน ไอเรื้อรังมากกว่า 1 สัปดาห์ 24 คน ไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ 4 คน และไอเรื้อรังมากกว่า 1 เดือน 47 คน คิดเป็นร้อยละ 56.91, 15.46, 13.26, 2.21 และ 25.97 ตามลำดับ ในจำนวนนี้มีอาการไอมีเลือดปนจำนวน 10 คน คิดเป็นร้อยละ 5.52 มีผู้ป่วยที่มีอาการเหนื่อยหอบจำนวน 77 คน น้ำหนักลดจำนวน 70 คน มีอาการเจ็บหน้าอกเป็นจำนวน 64 คน และมีอาการเหงื่อออกตอนกลางคืนจำนวน 43 คน คิดเป็นร้อยละ 42.54, 38.67, 35.36 และ 23.76 ตามลำดับ จำนวนผู้ป่วยเอกสัที่นำส่ง hemoculture และมีอาการไข้ หรืออาการทางคลินิกของวัณโรคแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเลือดและมีอาการทางคลินิกของวัณโรค

ผู้ป่วย ทั้งหมด (คน)	จำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่แสดงอาการของวัณโรค (คน)										
	มีไข้	น้ำหนัก ลด	หอบ	เจ็บ หน้าอก	เหงื่อออก กลางคืน	ไอเรื้อรัง				รวม	ไอ เป็นเลือด
						<1 สัปดาห์	>1 สัปดาห์	>2 สัปดาห์	>1 เดือน		
181	72	70	77	64	43	28	24	4	47	103	10
%	39.78	38.67	42.54	35.36	23.76	15.47	13.26	2.21	25.97	56.91	5.52

iii. การได้รับยาต้านวัณโรค

จากการสำรวจการได้รับยาต้านวัณโรคตามแบบสอบถาม พบผู้ป่วยที่เข้าร่วมวิจัยครั้งนี้เคยได้กำลังรับยาวัณโรคชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือเคยได้รับยาในระยะเวลา 1-6 เดือน ก่อนเก็บเสมหะ มีจำนวนทั้งสิ้น 49 คน คิดเป็นจำนวนผู้ป่วยที่เคยได้รับยา ร้อยละ 27.07 ของผู้ป่วยทั้งหมด และมีผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามว่าเคยได้รับยาต้านวัณโรคเพียงชนิดเดียว 3 คน คิดเป็นร้อยละ 1.66 โดยได้รับยา isoniazid เพียงชนิดเดียว 2 คน และได้รับยา rifampicin เพียงชนิดเดียว 1 คน คิดเป็นร้อยละ 1.10 และ 0.55 ผู้ป่วยที่ได้รับยา isoniazid ร่วมกับ rifampicin 4 คน คิดเป็นร้อยละ 2.21 ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านวัณโรคร่วมกัน 3 ชนิดมี 6 คน คิดเป็นร้อยละ 3.31 โดยได้รับยา isoniazid, rifampicin และ ethambutol 3 คน และได้รับ isoniazid, rifampicin และ pyrazinamide 3 คน คิดเป็นร้อยละ 1.66 ผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านวัณโรคร่วมกัน 4 ชนิด คือ isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide 36 คน คิดเป็นร้อยละ 19.89 นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยจำนวน 6 คน เคยได้รับยาต้านวัณโรคมากกว่า 1 ปี โดยได้รับยา isoniazid และ rifampicin 1 คน; isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide 4 คน; และ isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide และ streptomycin 1 คน จำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะและตอบแบบสอบถามว่าได้รับยาต้านวัณโรคชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 จำนวนผู้ป่วยที่นำส่ง hemoculture ที่เคยได้รับยารักษาวัณโรค

ผู้ป่วย ทั้งหมด	จำนวนผู้ป่วย (คน)										รวมเคย ได้รับยา		
	ไม่เคย รับยา	ไม่ แน่ใจ	ไม่มี ข้อมูล	รับยา >1 y	ได้รับยา 1 ชนิด		ได้รับยา 2 ชนิด		ได้รับยา 3 ชนิด			ได้รับยา 4 ชนิด	ได้รับยา 5 ชนิด
					H	R	HR	HRE	HREZ	HREZS			
181	111	9	5	6	2	1	4	3	3	36	1	49	
%	61.3	5.0	2.8	3.3	1.1	0.6	2.2	1.7	1.7	19.9	0.6	27.1	

H = isoniazid, E = ethambutol, R = rifampicin, S = streptomycin, Z = pyrazinamide, y = year

3.2 ผลการตรวจหา *Mycobacterium* จาก Hemoculture โดยวิธี conventional method

เชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกจาก BACTEC™ Myco/F lytic blood culture และนำมาเพาะเชื้อใน LJ medium ทำการวินิจฉัยโดยวิธีของ Centers for Disease Control (Kent and Kubica, 1985) พบว่า hemoculture จากผู้ป่วย 181 ราย ตรวจพบ *Mycobacterium* 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.47 ของผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่ง hemoculture ทั้งหมด โดยตรวจพบ *M. tuberculosis* 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.42 พบเป็น *M. avium* complex ในผู้ป่วย 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.50 พบเชื้อ *M. kansasii* 1 ราย ผลการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะผู้ป่วยโรคเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ผลการเพาะแยกเชื้อ *Mycobacterium* จากเลือดผู้ป่วยโรคเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ

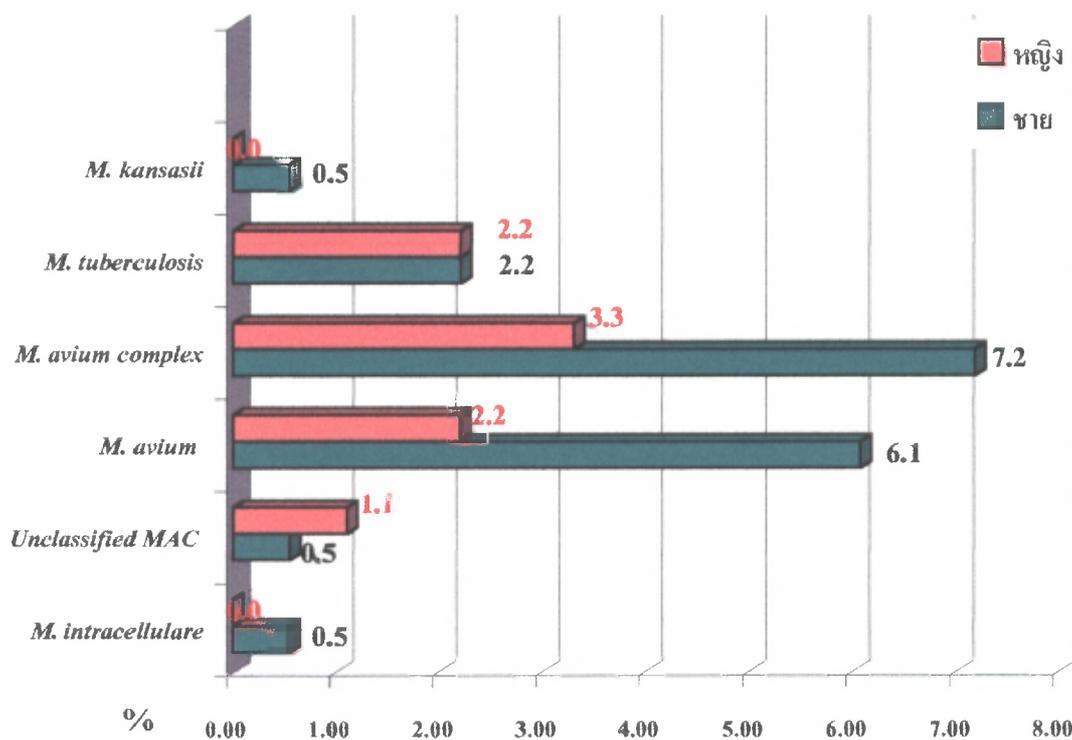
ผลการเพาะแยกเชื้อ	ผู้ป่วยโรคเอดส์ (คน)					
	ชาย		หญิง		รวม	
Culture Positive						
<i>M. tuberculosis</i>	4	2.21%	4	2.21%	8	4.42%
<i>M. avium</i> complex	13	7.18%	6	3.31%	19	10.50%
<i>M. kansasii</i>	1	0.55%	0	0.00%	1	0.55%
รวม	18	9.94%	10	5.52%	28	15.47%
Culture Negative	95	52.49%	58	32.04%	153	84.53%
รวมผู้ป่วยทั้งหมด	114		68		181	

3.3 ผลการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือดโดยวิธี REA-PCR

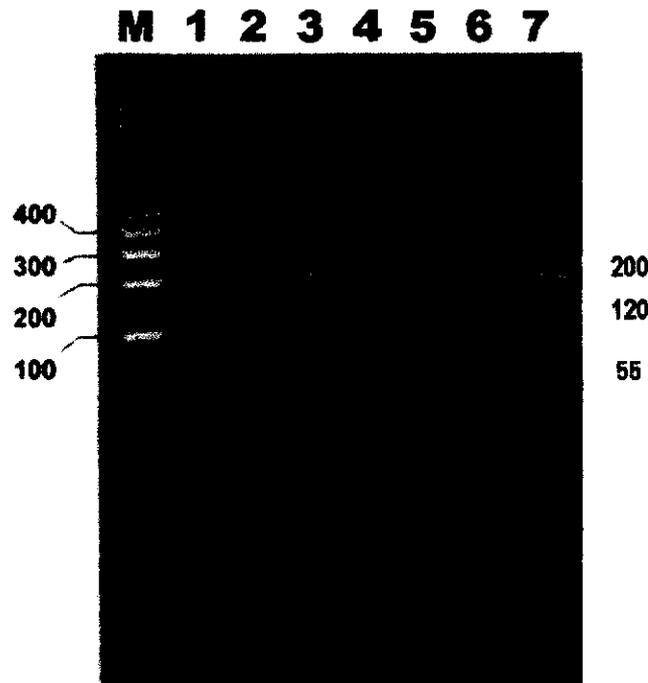
เมื่อนำ chromosome ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. ที่สกัดโดยวิธี mechanical lysis มาทำการแยกวินิจฉัยโดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer และ restriction enzyme analysis พบว่าสามารถแยกวินิจฉัยเชื้อทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ได้เป็น *M. tuberculosis* complex จำนวน 8 ตัวอย่าง, *M. avium* complex จำนวน 19 ตัวอย่าง ซึ่งแยกเป็นเชื้อ *M. avium* 15 สายพันธุ์, *M. intracellulare* 1 สายพันธุ์ และ Unclassified MAC 3 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังแยกได้เชื้อ *M. kansasii* 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 28 และ ภาพที่ 33 และ REA-PCR patterns ของเชื้อที่แยกได้จาก hemoculture แสดงในภาพที่ 34 - 38

ตารางที่ 28 ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกจากเลือดผู้ป่วยเอดส์โดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer ร่วมกับ restriction enzyme analysis เทียบการทดสอบชีวเคมี

Identification		Amplified length(bp)	Restriction Pattern (bp)			จำนวน (ตัวอย่าง)
Conventional	PCR-REA		<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Bst</i> XI	
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex	380	200, 120, 55	ND	ND	8
<i>M. avium</i> complex	<i>M. avium</i>	380	155,115,65,40	ND	ND	15
<i>M. avium</i> complex	<i>M. intracellulare</i>	380	180/155/40	220/105/50	ND	1
<i>M. avium</i> complex	Unclassified MAC	380	200/180	ND	ND	3
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> 1	380	380	ND	245/130	1
					รวม	28



ภาพที่ 33 ร้อยละของผู้ป่วยเอดส์ทั้งชายและหญิงที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด

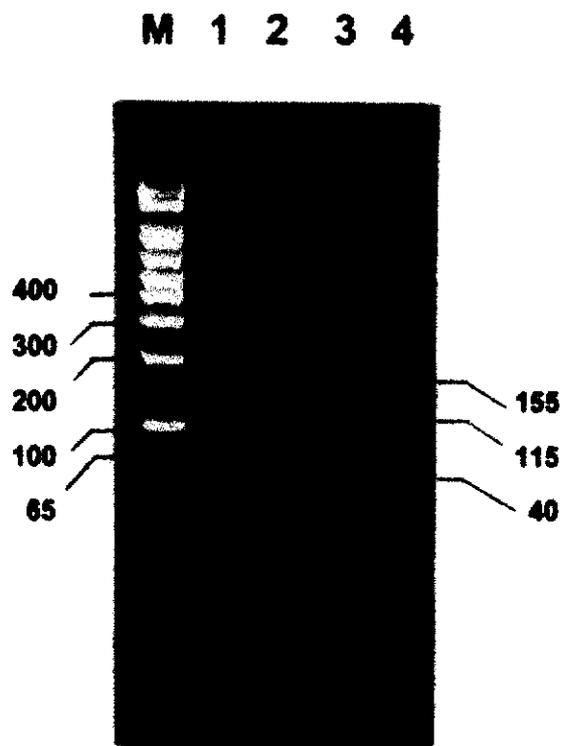


ภาพที่ 34 Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with *HaeIII* on 3% agarose gel of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from hemoculture

Lane 1,7 *HaeIII* digested product sizes 200/120/55 bp of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Lane 2 - 6 *HaeIII* digested product sizes 200/120/55 bp of *M. tuberculosis* isolates H004, H006, H017, H022, H029, H090

Lane M 1 kb plus DNA marker

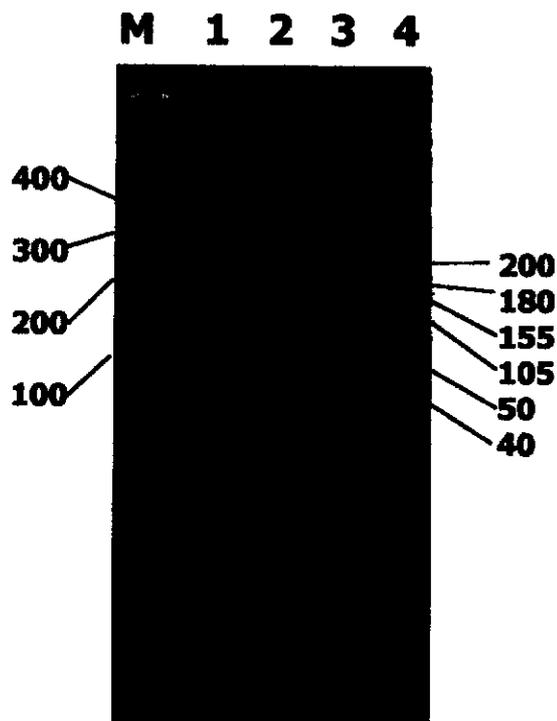


ภาพที่ 35 Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with *Hae*III on 3% agarose gel of *M. avium* isolates from hemoculture

Lane 1 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* ATCC 25291

Lane 2,3 *Hae*III digested product sizes 155/115/65/40 bp of *M. avium* isolates H072 และ H086

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 36 Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer of *M. intracellulare* isolates from hemoculture

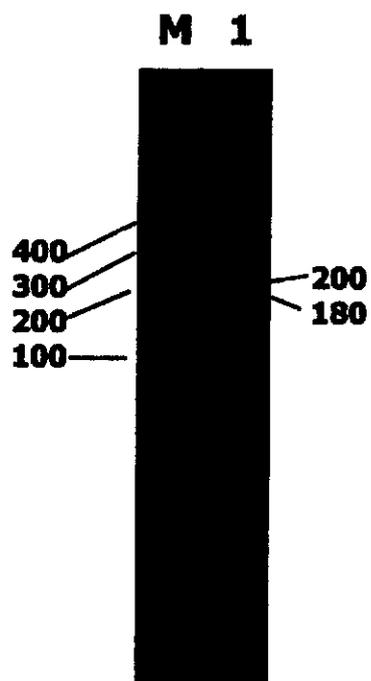
Lane 1 *MspI* digested product sizes 220/105/50 bp of *M. intracellulare* isolates H0119

Lane 2 *HaeIII* digested product sizes 180, 155 และ 40 bp of *M. intracellulare* isolates H0119

Lane 3 *MspI* digested product sizes 220, 105 และ 50 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950

Lane 4 *HaeIII* digested product sizes 180, 155 และ 40 bp of *M. intracellulare* ATCC 13950

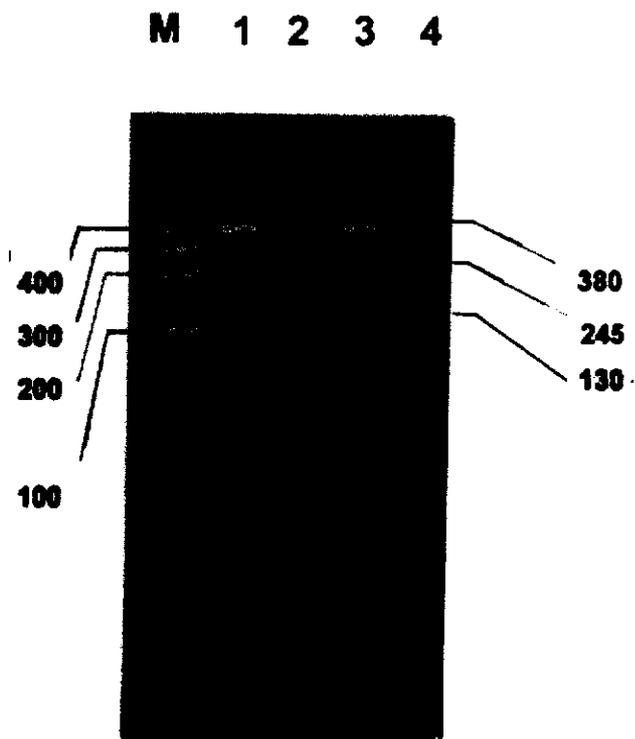
Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 37 Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with *HaeIII* on 3% agarose gel of unclassified *M. avium complex* isolate from hemoculture

Lane 1 *HaeIII* digested product sizes 200/180 bp of unclassified *M. avium complex* isolates H0175

Lane M 1 kb plus DNA marker



ภาพที่ 38 Restriction patterns of amplified 16S-23S rDNA spacer digested with *Hae*III on 3% agarose gel of *M. kansasii* isolates from hemoculture

Lane 1 *Hae*III digested product sizes 380 bp of *M. kansasii* ATCC 12478

Lane 2 *Bst*XI digested product sizes 245/130 bp of *M. kansasii* ATCC 12478

Lane 3 *Hae*III digested product sizes 380 bp of *M. kansasii* isolates H030

Lane 4 *Bst*XI digested product sizes 245/130 bp of *M. kansasii* isolates H030

Lane M 1 kb plus DNA marker

3.4 การเปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อ กับการได้รับยาต้านวัณโรค

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือดโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ กับการได้รับยาต้านวัณโรค พบว่าจากผู้ป่วย 181 คน เพาะแยกเชื้อได้ *M. tuberculosis* 8 คน ไม่เคยได้รับยา 4 คน ไม่มีข้อมูล 1 คน เคยได้รับยาต้านวัณโรค 3 ชนิด ได้แก่ isoniazid, rifampicin และ ethambutol 1 คน และพบผู้ป่วย 1 คน เคยได้รับยาต้านวัณโรค 4 ชนิด ได้แก่ isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide และ streptomycin 1 คน และเคยได้รับ isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamide และ streptomycin นานกว่า 1 ปี 1 คน ผู้ป่วยเพาะแยกเชื้อได้ *M. avium complex* 19 คน ไม่เคยได้รับยา 14 คน ไม่แน่ใจ 1 คน เคยได้รับยาต้านวัณโรค isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide 3 คน และพบผู้ป่วย 1 คน ที่เคยได้รับยา isoniazid, rifampicin, ethambutol และ pyrazinamide นานกว่า 1 ปี สำหรับผู้ป่วยเพาะแยกเชื้อได้ *M. kansasii* 1 คน ไม่เคยได้รับยามาก่อน

ผู้ป่วยที่เพาะเชื้อไม่ขึ้น 153 คน ไม่เคยได้รับยา 92 คน ไม่แน่ใจ 8 คน ไม่มีข้อมูล 4 คน ได้รับยา >1 ปี 4 คน และเคยได้รับยาต้านวัณโรค 44 คน ผลการเพาะแยกเชื้อจาก hemoculture ของผู้ป่วยโรคเอดส์ เปรียบเทียบกับการได้รับยาต้านวัณโรค แสดงในตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ Nontuberculosis *Mycobacterium* จาก hemoculture ของผู้ป่วยโรคเอดส์ และ การได้รับยาต้านวัณโรค

ผลการเพาะเชื้อ	จำนวนผู้ป่วย (คน)												
	ทั้งหมด	ไม่เคย รับยา	ไม่ แน่ใจ	ไม่มี ข้อมูล	เคยได้ รับยา >1 y	กำลังได้รับยา					รวม		
						1 ชนิด	2 ชนิด	3 ชนิด	4 ชนิด	5 ชนิด			
						H	R	HR	HRE	HRZ		HREZ	HREZ
<i>M. tuberculosis</i>	8	4	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	2
%	4.4	2.2	0.0	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	1.1
<i>M. avium complex</i>	19	14	1	0	1	0	0	0	0	0	3	0	3
%	10.5	7.7	0.6	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	1.7
<i>M. kansasii</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Culture Positive	28	19	1	1	2	0	0	0	1	0	4	0	5
%	15.5	10.5	0.6	0.6	1.1	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	2.2	0.0	2.8
No Growth	153	92	8	4	4	2	1	4	2	3	32	1	44
%	84.5	50.8	4.4	2.2	2.2	1.1	0.6	2.2	1.1	1.7	17.7	0.6	24.3
รวม	181	111	9	5	6	2	1	4	3	3	36	1	49
%	100	61.3	5.0	2.8	3.3	1.1	0.6	2.2	1.7	1.7	19.9	0.6	27.1

4. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ 44 ราย 81 สายพันธุ์ และ เชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกจาก hemoculture ของผู้ป่วยโรคเอดส์ 8 ราย จำนวน 8 สายพันธุ์ รวม 89 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อวัณโรคที่แยกจากผู้ป่วย 53 ราย มาทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี Proportional method โดยทำการทดสอบกับยา 6 ชนิด คือ isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, kanamycin และ ofloxacin บน LJ medium ที่ไม่มียา และ LJ medium ที่ผสมยาให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ critical concentration ของยานั้นๆ ที่เตรียมโดยห้องปฏิบัติการของกองวัณโรค และทดสอบกับยา amikacin บน Middlebrook 7H10 agar ที่ supplement ด้วย 10% OADC ที่มีความเข้มข้นของยา 6 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี Disk method พบว่าเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการทดสอบมีความไวต่อยาทั้ง 7 ชนิด จำนวน 35 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 66.04 ของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่นำมาทดสอบทั้งหมด และมีเชื้อ *M. tuberculosis* ที่คือด้อยที่ทำการทดสอบจำนวน 18 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 33.96 ของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด โดยพบเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการทดสอบมีการดื้อยาชนิดเดียว (single drug resistance) จำนวน 8 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 15.09 ของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด โดยมีเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 5 ราย ที่คือด้อย isoniazid เท่านั้น คิดเป็นร้อยละ 9.43; พบเชื้อที่คือด้อย rifampicin ชนิดเดียว, ethambutol ชนิดเดียวและ ofloxacin ชนิดเดียว อย่างละ 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.89 ของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด โดยเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ทำการทดสอบมีการดื้อยาหลายชนิด 10 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 18.87 พบเป็นเชื้อที่คือด้อย 2 ตัว คือ isoniazid ร่วมกับ rifampicin; และ streptomycin ร่วมกับ ofloxacin อย่างละ 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.89 พบเป็นเชื้อที่คือด้อย 3 ชนิด 4 สายพันธุ์ โดยคือด้อย isoniazid rifampicin และ streptomycin และคือด้อย isoniazid rifampicin และ ofloxacin อย่างละ 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.89); คือด้อย isoniazid streptomycin และ ethambutol 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 5.66); และพบเป็นเชื้อที่คือด้อย 4 ชนิด คือ isoniazid rifampicin streptomycin และ ethambutol 2 สายพันธุ์; isoniazid rifampicin ethambutol และ ofloxacin 1 สายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 30 และเมื่อนำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกวินิจฉัยโดยวิธีการทดสอบชีวเคมีจำนวน 10 สายพันธุ์ ส่งทำการทดสอบความไวในห้องปฏิบัติการมาตรฐานของกองวัณโรคให้ผลการทดสอบความไวตรงกันทุกประการ มีเชื้อที่แยกจากเสมหะ S0051 1 สายพันธุ์ ที่ให้ผลการวินิจฉัยโดยการทดสอบชีวเคมีเป็น *M. tuberculosis* แต่เชื้อเจริญใน LJ medium ที่มี p-nitrobenzoic acid และ REA-PCR ไม่สามารถแยกวินิจฉัยได้ เมื่อส่งทำ DNA sequencing ของ 16S-23S spacer gene พบมีความเหมือนกับเชื้อ *M. simiae* นั้นพบว่าเมื่อทำการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค 6 ชนิด ในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยคือด้อยต้านวัณโรค โดยพบเชื้อขึ้นในอาหารที่มียา isoniazid rifampicin streptomycin ethambutol และ

kanamycin ในปริมาณมาก ขณะที่เชื้อเจริญในอาหารที่มียา ofloxacin แต่มีน้อยกว่า 20 colonies ให้ผลเป็นไวต่อยาต้านวัณโรค โดยให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบของก้องวัณโรคทุกประการ

โดยพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา 16 ราย ตอบแบบสอบถามว่าได้รับยารักษาวัณโรค 4 ราย และได้รับยารักษาวัณโรคนานกว่า 1 ปี แล้ว 1 ราย ไม่มีข้อมูลการได้รับยามาก่อน 1 ราย และไม่แน่ใจว่าเคยได้รับยาหรือไม่ 1 ราย มีผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามว่าไม่เคยได้รับยารักษาวัณโรคมามาก่อนแต่ไวต่อยารักษาวัณโรค ซึ่งอาจจะเป็นเชื้อวัณโรคที่ไวต่อยารักษาวัณโรคแบบปฐมภูมิ หรือ primary drug resistance 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 17.65 โดยไวต่อยา isoniazid 2 ราย , ไวต่อยา rifampicin 1 ราย , ไวต่อยา ofloxacin 1 ราย; ไวต่อยา streptomycin และ ofloxacin 1 ราย; ไวต่อยา isoniazid, ethambutol และ streptomycin 2 ราย และไวต่อยา isoniazid, rifampicin และ streptomycin 1 ราย

ตารางที่ 30 ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อวัณโรคที่แยกจากผู้ป่วย 51 ราย

ผู้ป่วย	ไวต่อยา ต้านวัณโรค	ไวต่อยาต้านวัณโรค												รวม
		ชนิดเดียว				2 ชนิด		3 ชนิด			4 ชนิด			
		H	R	E	O	HR	SO	HSE	HRS	HRO	HRES	HREO		
ชาย 34	23	5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	11	
หญิง 11	6	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	5	
เดือด :														
ชาย 4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
หญิง 4	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2	
รวม :														
ชาย 38	27	5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	11	
หญิง 15	8	0	1	0	0	0	0	3	0	0	2	1	7	
รวม 53	35	5	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	18	
% 100	66.07%	9.43	1.89	1.89	1.89	1.89	1.89	5.66	1.89	1.89	3.77	1.89	33.96	

ยาต้านวัณโรค: H = Isoniazid, R = Rifampicin, S = Streptomycin, E = Ethambutol, K = Kanamycin, O = Ofloxacin,

A = Amikacin

5. ผลการทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของ *Mycobacterium avium* complex

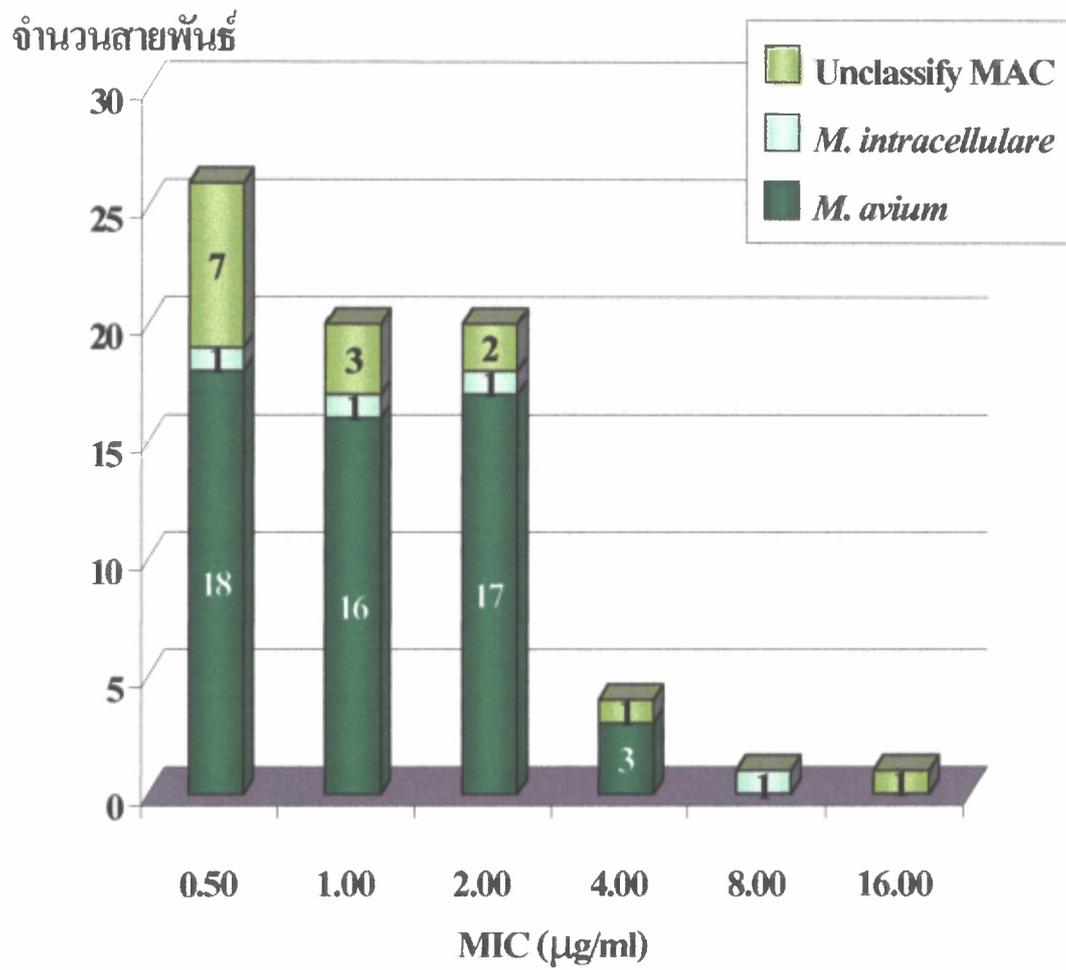
5.1 Broth macrodilution test

จากผลการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี broth macrodilution test ของเชื้อ MAC จำนวน 72 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ได้ค่า MIC ของเชื้อ MAC ที่ทำการทดสอบทั้งหมด ระหว่าง $16 \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 31 และ ภาพที่ 39 ผลการทดสอบความไวต่อเชื้อมาตรฐาน *M. avium* complex ATCC 800797 ให้ค่า MIC เท่ากับ $4 \mu\text{g/ml}$ อยู่ในช่วง MIC ที่กำหนดโดย NCCLS

ตารางที่ 31 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ต่อยา Clarithromycin ของ *Mycobacterium avium* complex โดยวิธี broth macrodilution test

ค่า MIC ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนสายพันธุ์			รวม
	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	Unclassify MAC	
< 0.50	18	1	7	26
1.00	16	1	3	20
2.00	17	1	2	20
4.00	3	0	1	4
8.00	0	1	0	1
16.00	0	0	1	1
รวม	54	4	14	72

สำหรับเชื้อ MAC ที่ทดสอบโดยวิธี broth macrodilution test Heifets ให้ค่า breakpoints สำหรับความไวของเชื้อ MAC ที่ทดสอบด้วยยา clarithromycin ที่ pH 6.8 pH MICs $\leq 2.0 \mu\text{g/ml}$ ในการทดสอบ $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ และจากผลการทดลองดังตารางที่ 31 พบว่า มีเชื้อ MAC ที่ไวต่อยา clarithromycin ทั้งหมด 68 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 91.66 สำหรับการคือยา clarithromycin Heifets ให้ค่า breakpoints สำหรับการคือต่อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC เมื่อทดสอบโดยวิธี broth macrodilution test ต้องมีค่า MIC $> 32 \mu\text{g/ml}$ ดังนั้นแสดงว่าเชื้อ MAC ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดจากผู้ป่วยโรคเอดส์ทั้ง 72 สายพันธุ์ไม่คือต่อยา clarithromycin และพบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง intermediate ระหว่างการคือและไวต่อยา clarithromycin จำนวน 6 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 8.33



ภาพที่ 39 Minimum inhibitory concentration ต่อยา clarithromycin ของ *M. avium* complex ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี Broth Macrodilution Test

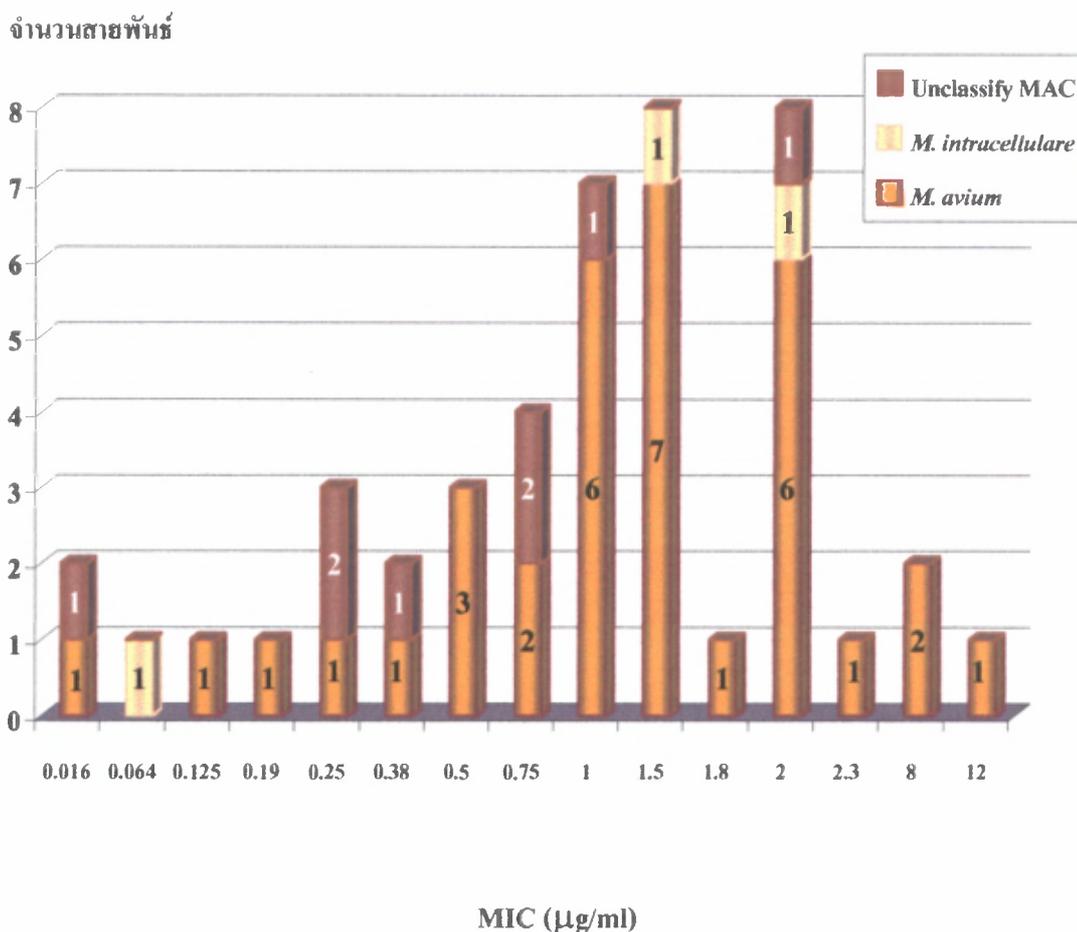
5.2 E-Test[®]

จากผลการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี E-Test[®] ของเชื้อ MAC จำนวน 45 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ได้ค่า MIC ของเชื้อ MAC ที่ทำการทดสอบทั้งหมดระหว่าง 12-<0.016 µg/ml ดังแสดงในตารางที่ 32 และภาพที่ 40 ผลการทดสอบความไวต่อเชื้อมาตรฐาน *Mycobacterium avium* complex ATCC 800797 ให้ค่า MIC เท่ากับ 1.5 µg/ml อยู่ในช่วง MIC ที่กำหนดโดย NCCLS

สำหรับเชื้อ MAC ที่ทดสอบโดยวิธี E-test[®] Heifets ให้ค่า breakpoints สำหรับความไวของเชื้อ MAC ที่ทดสอบด้วยยา clarithromycin ≤ 8 µg/ml และจากผลการทดลองดังตารางที่ 32 พบว่า มีเชื้อ MAC ที่ไวต่อยา clarithromycin ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 97.77 ของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด Heifets ให้ค่า breakpoints สำหรับการคือต่อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC เมื่อทดสอบโดยวิธี E-test[®] ต้องมีค่า MIC > 64 µg/ml ไม่พบเชื้อ MAC ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดที่คือต่อยา clarithromycin เมื่อทดสอบโดยวิธี E-test[®] แต่เชื้อที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง intermediate ระหว่างการคือและไวต่อยา clarithromycin จำนวน 1 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 2.22

ตารางที่ 32 MIC ของยา Clarithromycin ต่อ *Mycobacterium avium* complex โดยวิธี E-Test[®]

ค่า MIC (µg/ml)	จำนวน สายพันธุ์			รวม
	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	Unclassify MAC	
0.016	1	0	1	2
0.064	0	1	0	1
0.125	1	0	0	1
0.19	1	0	0	1
0.25	1	0	2	3
0.38	1	0	1	2
0.5	3	0	0	3
0.75	2	0	2	4
1	6	0	1	7
1.5	7	1	0	8
1.8	1	0	0	1
2	6	1	1	8
2.3	1	0	0	1
8	2	0	0	2
12	1	0	0	1
รวม	34	3	8	45



ภาพที่ 40 Minimum inhibitory concentration ค่ายา clarithromycin ของ *M. avium* complex ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ โดยวิธี E-Test[®]

6. ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆในเลือด

ผู้ป่วยโรคเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุจะได้รับยา bactrim ทุกวันเพื่อลดการติดเชื้อ จึงจะตรวจพบเชื้อในเลือดได้น้อยกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามผลการเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆ ที่ตรวจพบใน BACTEC[™] Myco/F lytic blood culture 181 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.57 จากผู้ป่วยชาย 20 ราย และผู้ป่วยหญิง 10 ราย โดยตรวจพบ *Cryptococcus neoformans* สูงสุด 7 ตัวอย่าง, *Pseudomonas* sp. 5 ตัวอย่าง รองลงมาเป็น , *Salmonella choleraesuis* 3 ตัวอย่าง, *Salmonella enterica* group B 3 ตัวอย่าง, *Bacillus* 3 ตัวอย่าง, *Enterococci* 2 ตัวอย่าง, *Klebsiella pneumoniae* 2 ตัวอย่าง และตรวจพบ *Burkholderia pseudomallei*, *Salmonella paratyphi* A, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* , *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus epidermidis* และ yeast not *Candida albicans* อย่างละ 1 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้ผู้ป่วย

ผู้ป่วย 3 รายมีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด โดยตรวจพบ *Salmonella paratyphi A* ร่วมกับ *Salmonella enterica* group B, ตรวจพบ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella pneumoniae* ร่วมกัน 1 ราย และ *Salmonella choleraesuis* ร่วมกับ *Cryptococcus neoformans* และพบผู้ป่วยเอดส์ที่ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* 3 ราย แยกเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* *Acinetobacter lwoffii* และ *Pseudomonas* spp. ในเลือดร่วมด้วย นอกจากนี้ยังพบ ผู้ป่วยเอดส์ที่ตรวจพบเชื้อ MAC 1 ราย แยกเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ในเลือดร่วมด้วย ผลการแยกเชื้อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆ ในเลือดของผู้ป่วยโรคเอดส์แสดงในตารางที่ 33

ตารางที่ 33 การตรวจพบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา จาก Hemoculture ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี

เชื้อที่ตรวจพบใน Hemoculture ของผู้ป่วยเอดส์	จำนวนตัวอย่าง
<i>Cryptococcus neoformans</i>	7
<i>Psuedomonas</i> sp.	5
<i>Bacillus</i> sp.	3
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	3
<i>Salmonella</i> gr.B	3
<i>Enterococci</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Acinetobacter lowffi</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	1
<i>Salmonella paratyphi A</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	1
Yeast not <i>Candida albicans</i>	1

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผู้ป่วย

การศึกษาครั้งนี้ทำการเก็บสิ่งส่งตรวจเป็นเสมหะและเลือดจากผู้ป่วยโรคเอดส์ ณ โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 ถึง เดือนมกราคม พ.ศ. 2545 จำนวนผู้ป่วยทั้งหมดในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ยากจะคำนวณ เพราะมีผู้ป่วยเข้าออกโครงการตลอดเวลา ผู้ป่วยรายใหม่ที่ลงทะเบียนเข้าโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ที่เพิ่มจาก 158 คน เมื่อเริ่มโครงการจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บสิ่งส่งตรวจจำนวนผู้ป่วยลงทะเบียนเพิ่มขึ้น 1,098 คน โดยมีจำนวนผู้ป่วยในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์เพิ่มขึ้นในแต่ละเดือนน้อยลงอย่างมาก สาเหตุหนึ่งอาจเป็นเพราะผู้ป่วยบางส่วนถูกย้ายไปเข้ามูลนิธิธรรมรักษ์โครงการ 2 ซึ่งเป็นโครงการที่ใหญ่กว่าวัดพระบาทน้ำพุ มีที่มากกว่ารองรับผู้ป่วยและครอบครัวได้ถึง 20,000 คน และมีที่ทำการเกษตรกรรม ทำให้ที่วัดพระบาทน้ำพุมีจำนวนผู้ป่วยน้อย ในระหว่างเวลาที่มีการเก็บสิ่งส่งตรวจเป็นเวลา 15 เดือนนั้น มีผู้ป่วยทยอยเสียชีวิตในแต่ละเดือนรวมจำนวนทั้งสิ้นถึง 792 คน มีการย้ายเข้าและออกโครงการในแต่ละเดือนตลอดเวลา ยอดผู้ย้ายออกจากโครงการสูงถึง 195 คน นอกจากนี้จะพบว่าหลังจากที่ทางผู้วิจัยเข้าทำการศึกษาเพื่อหาผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคในปี พ.ศ. 2542 และนำส่งเอกสารงานวิจัยเกี่ยวกับการตรวจพบเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุเป็นจำนวนมาก พร้อมทั้งเสนอแนวทางการควบคุมวัณโรค พบว่าในปัจจุบันโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์มีความร่วมมือกับโรงพยาบาลประจำจังหวัดเพื่อตรวจกรองผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรค โดยนำส่งเสมหะผู้ป่วยเอดส์ที่สงสัยว่าเป็นวัณโรคไปยังโรงพยาบาลเพื่อพิสูจน์เชื้อโดยการย้อมและรับยามาทำการดูแลและรักษาภายในโครงการ มีการสร้างส่วนที่เป็นอาคารพยาบาลที่เรียกว่า โรงพยาบาลขึ้นใหม่เพื่อแยกผู้ป่วยที่มีอาการหนัก โดยเฉพาะผู้ที่ติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจะถูกแยกห้องโดยจัดห้องที่ติดหน้าต่างและแสงแดดส่องถึง และผู้ป่วยบางส่วนก่อนที่จะเข้ามาในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ทราบอยู่ก่อนแล้วว่าเป็นวัณโรคและกำลังอยู่ระหว่างการรักษาด้วยยาวัณโรคจึงไม่เข้าโครงการวิจัย ทำให้ปริมาณผู้ป่วยเอดส์ที่เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* ทั้งหมดมีเพียง 325 คน เป็นชาย 209 คน หญิง 116 คน หรือประมาณร้อยละ 25.87 ของจำนวนผู้ป่วยที่ลงทะเบียนในโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ในช่วงเวลา 15 เดือน โดยเลือกเก็บตัวอย่างเฉพาะผู้ป่วยที่แสดงอาการทางคลินิกของวัณโรคปอด หรือมีไข้เรื้อรัง อัตราการเก็บและนำส่งเสมหะในแต่ละเดือนอยู่ระหว่างร้อยละ 0-21.46 หรือเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 8.9 และอัตราการเจาะและนำส่งเลือดในแต่ละเดือนอยู่ระหว่างร้อยละ 0-14.83 หรือเฉลี่ยประมาณ ร้อยละ 5.12

2. ผลการตรวจหาเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะผู้ป่วยโดยการย้อมและการเพาะเชื้อ

เสมหะ 822 ตัวอย่างจากผู้ป่วยเอดส์ 278 คน ที่มีอาการทางคลินิกของวัณโรคปอดอย่างน้อยหนึ่ง เมื่อทำ direct smear ของเสมหะโดยตรง และย้อม acid fast stain ตรวจพบ acid fast bacilli (AFB) จาก 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.87 ของเสมหะทั้งหมด จากผู้ป่วยเอดส์ 18 คน คิดเป็นร้อยละ 6.48 จากผู้ป่วยทั้งหมด แต่เมื่อย้อมตะกอนเสมหะเข้มข้น ประมาณ 5-10 เท่า หลังจากการทำ digestion-decontamination ตรวจพบ AFB เพิ่มขึ้นเป็น 110 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.38 ของเสมหะทั้งหมด (เพิ่มขึ้นร้อยละ 8.51) จากผู้ป่วยเอดส์ 66 คน คิดเป็นร้อยละ 23.74 จากผู้ป่วยทั้งหมด และหากคิดอัตราการตรวจพบเชื้อโดยทั้ง 2 วิธีรวมกัน จะพบเชื้อจากเสมหะผู้ป่วย 68 ราย คิดเป็น ร้อยละ 24.46 ดังแสดงในตารางที่ 16

ขณะที่การเพาะแยกเชื้อที่เพาะเชื้อให้เพิ่มจำนวนใน MB/BACT[®] แล้วนำไปเพาะบน L-J medium พบว่าเสมหะ 822 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 278 คน ตรวจพบ *Mycobacterium* 217 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.40 ของเสมหะทั้งหมด และ ตรวจพบ *Mycobacterium* จากผู้ป่วยเอดส์ 108 คน คิดเป็นร้อยละ 38.85 จากผู้ป่วยทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18 เมื่อเปรียบเทียบผลการย้อมหาเชื้อ acid fast bacilli (AFB) จากเสมหะโดยตรงและเสมหะที่ทำการเตรียมที่มีความเข้มข้นกับการเพาะเชื้อพบว่าเสมหะของผู้ป่วยที่สามารถตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* โดยการเพาะแยกเชื้อ 107 ราย ย้อมพบ AFB positive จากเสมหะของผู้ป่วย 39 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.03 ตรวจไม่พบ AFB จากเสมหะของผู้ป่วย 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 24.46 เสมหะของผู้ป่วยที่เพาะไม่พบเชื้อ *Mycobacterium* มีจำนวน 171 ราย ในจำนวนนี้ย้อมพบ AFB positive 29 ราย และย้อมไม่พบเชื้อจำนวน 142 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.43 และ 51.08 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าผลการย้อมและการเพาะเชื้อให้ผลสอดคล้องกัน 181 ราย หรือร้อยละ 65.11 การเปรียบเทียบผลการย้อม acid fast stain และ ผลการเพาะแยกเชื้อ *M. tuberculosis* (MTB) และ Nontuberculous Mycobacteria (NTM) จากเสมหะของผู้ป่วยโรคเอดส์ แสดงในตารางที่ 21 และแผนภาพที่ 32

การศึกษาค้นคว้าถึงควมไวในการตรวจหาเชื้อโดยการย้อมต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อมาก ซึ่งจะพบว่า การเพาะแยกเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อจากตัวอย่างเสมหะได้มากกว่าการย้อมแบบเข้มข้นถึงร้อยละ 13.02 และมากกว่าการย้อมจากเสมหะโดยตรงถึงร้อยละ 21.53 เมื่อเทียบกับการวินิจฉัยการพบเชื้อในผู้ป่วยพบว่า การเพาะเชื้อสามารถตรวจหาเชื้อจากผู้ป่วยได้มากกว่าการย้อมแบบเข้มข้นถึงร้อยละ 14.76 และพบมากกว่าการย้อมจากเสมหะโดยตรงถึงร้อยละ 32.02 น่าจะเป็นเพราะตามปกติการเพาะเชื้อมีความไวมากกว่าการย้อม acid fast stain โดยเฉพาะเมื่อย้อมโดยตรงจากเสมหะจะมีความไวต่ำ เนื่องจากถ้ามีปริมาณเชื้อวัณโรคในเสมหะน้อยกว่า 5000 ตัว/ml ของเสมหะ มักจะตรวจไม่พบเชื้อ แต่เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ทำการย้อมเสมหะโดยวิธี concentration ด้วยทำให้เพิ่มความไวในการตรวจ

พบเชื้อประมาณ 3-5 เท่า อย่างไรก็ตามต้องมีปริมาณเชื้อ 1,000 ตัว/ml ของเสมหะจึงจะตรวจพบโดยวิธีการย้อม (ยูทริชย์ เกษตรเจริญ, 2542) ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องซึ่งมีความผิดปกติของภูมิคุ้มกันระบบ CMIR ทำให้ป่วยเป็นวัณโรคได้ง่ายแต่จะมีการอักเสบของเนื้อเยื่อปอดลดลง จึงทำให้มีอาการทางคลินิกของวัณโรคปอดลดลง ปริมาณเสมหะลดลง และเชื้อวัณโรคออกมาพร้อมกับเสมหะน้อยลง แต่จะพบมีการแพร่ระบาดสู่ต่อมน้ำเหลือง และอวัยวะอื่น ๆ ทำให้ผู้ป่วยเอดส์มีโอกาสเกิดวัณโรคนอกปอดสูงกว่า ดังกล่าวแล้วเบื้องต้น (ทัศนาศรี, 2542: 234; Theuer, et. al., 1990; Daley, 1992; Chuchottawom, 1994) ทำให้มีความไวในการตรวจหาการติดเชื้อวัณโรคโดยวิธีการย้อมอย่างเดียวเท่านั้นลดลง อาจจำเป็นต้องทำการเพาะเชื้อเพื่อตรวจหาการติดเชื้อ และในบางครั้งต้องทำการตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น เลือด หรือ ชิ้นเนื้อจากต่อมน้ำเหลือง

จากการรายงานของสถาบันแห่งชาติอินเดียพบว่าเมื่อนำส่งเสมหะหลายครั้งจะเพิ่มโอกาสของการตรวจพบเชื้อ (Andrew, Radhakrishna, 1959) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อโดยการย้อมเมื่อผู้ป่วยนำส่งเสมหะ 1 ครั้งมีจำนวน 3 ราย จาก 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 18.75 ของจำนวนผู้นำส่งเสมหะ 1 ครั้ง แต่อัตราการตรวจพบเชื้อโดยการย้อมเมื่อนำส่งเสมหะมากกว่า 1 ครั้งเพิ่มเป็นร้อยละ 24.81 โดยพบเชื้อจากผู้ป่วย 64 ราย จากจำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะมากกว่า 1 ครั้ง 262 ราย อัตราการตรวจพบเชื้อโดยการย้อมเมื่อผู้ป่วยนำส่งเสมหะ 2, 3, 4 และ 6 ครั้ง เท่ากับร้อยละ 25, 24.06, 100 และ 38.46 ตามลำดับ แต่ในการตรวจหาเชื้อโดยการเพาะเชื้อครั้งนี้จำนวนของเสมหะที่นำส่งมีผลกับการเพาะแยกเชื้อได้น้อยกว่าการย้อม เพราะในการแยกเชื้อครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนเชื้อในสิ่งตรวจในอาหารเหลวก่อน จึงทำให้มีความไวของการตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจสูงขึ้น ผลของการย้อมและการเพาะเชื้อกับจำนวนเสมหะที่นำส่งแสดงในตารางที่ 23 ดังนั้นหากต้องการให้ผลการตรวจกรองเพื่อหาผู้ป่วยวัณโรคให้ได้ผลสูงสุด ต้องอธิบายให้ผู้ป่วยทราบถึงความจำเป็นในการเก็บและนำส่งเสมหะมากกว่า 1 ครั้ง และในผู้ป่วยโรคเอดส์บางรายอาจมีความจำเป็นที่ต้องใช้วิธีการกระตุ้นเสมหะด้วย hypertonic saline (Klein, et al., 1989)

ผู้ป่วยที่ย้อมพบเชื้อจากเสมหะแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้นมี 29 คน คิดเป็นร้อยละ 10.43 ซึ่งการเพาะเชื้อไม่ขึ้นในเสมหะที่ย้อมพบเชื้ออาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น (ยูทริชย์ เกษตรเจริญ, 2542)

i. การที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านวัณโรคประเภท Rifampicin, Isoniazid หรือ Streptomycin ซึ่งจะทำให้เชื้อตายแล้ว จึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงแต่อาจสามารถย้อมพบเชื้อจากเสมหะได้ (บัญญัติปรัชญานนท์, 2542) ในจำนวน 29 คน ของผู้ป่วยที่ย้อมพบเชื้อจากเสมหะแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้น มีผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามว่าได้รับยาต้านวัณโรคในระยะเวลา 6 เดือน 6 คน ไม่มีข้อมูลของการรับยา 1 ราย และอาจมีสาเหตุมาจากผู้ป่วยบางรายตอบแบบสอบถามเรื่องได้รับยาไม่ถูกต้องเพราะผู้ป่วยไม่ทราบชื่อยาที่ได้รับหรือจำไม่ได้ว่าเคยได้รับยาต้านวัณโรคในช่วงระยะเวลา 6 เดือน

ii. การย้อมที่ให้ผลบวกอาจเกิดจากในสิ่งส่งตรวจมีการปนเปื้อนของ *Mycobacterium* อื่นที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค ซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 37°C หรือมีความต้องการสารอาหารเพิ่มเติม

iii. อาจเกิดจากปัญหาอื่น ๆ ได้แก่

- การเก็บเสมหะ: เสมหะที่มีการปนเปื้อนเชื้ออื่นสูงอาจกุดการเจริญของเชื้อวัณโรค หรือทำให้เสมหะเน่าเสียไม่อาจเพาะเชื้อได้ ควรให้ผู้ป่วยบ้วนปากและแปรงฟันก่อนเก็บสิ่งส่งตรวจ เสมหะที่ไม่อาจทำการเพาะเชื้อทันที ต้องเก็บที่ 4°C ก่อนนำส่งเพื่อไม่ให้เสมหะเน่าเสีย

- การเตรียมเสมหะ: ถ้าเชื้อวัณโรคจากผู้ป่วยอยู่ในสถานะที่อ่อนแอ ในขั้นตอนการเตรียมเสมหะจะทำให้เชื้อวัณโรคตายร้อยละ 28-33

- การย้อมเสมหะ: Spore ของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถติดสี acid fast stain

3. ผลการแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะโดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR

การแยกวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเสมหะโดยวิธี conventional method ที่ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการ *Mycobacteria* ของคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โดยเสมหะของผู้ป่วยที่เก็บและนำส่งในเวลา 1-3 วัน มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและราสูงมาก ต้องทำการกำจัดการปนเปื้อน ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในหลายตัวอย่างบางครั้งต้องทำซ้ำๆ ทำให้เชื้ออ่อนแอ และใช้เวลานานในการเพาะเชื้อ บ่อยครั้งมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Mycobacterium* มากกว่า 1 สายพันธุ์ ทำให้ต้องนำมา streak ซ้ำให้ได้ isolate colonies ของเชื้อก่อนนำไปแยกพิสูจน์ และการที่ความเร็วของการเจริญในอาหารของเชื้อ *Mycobacterium* แต่ละ species ไม่เท่ากัน พบว่าถึงแม้จะพบว่าการปนเปื้อนของเชื้ออื่นเมื่อทดสอบโดยวิธี REA-PCR การแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิดจากเสมหะมักทำได้ยากมาก มักจะแยกได้เฉพาะเชื้อที่มีปริมาณมากกว่าให้ได้ pure culture

การแยกเชื้อจากเสมหะทั้งหมดโดยการทดสอบชีวเคมี ได้เชื้อ *M. tuberculosis* 82 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 9.98 ของเสมหะทั้งหมด ในจำนวนนี้พบเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมกับ *M. fortuitum* ในเสมหะ 1 ตัวอย่าง และพบเป็นเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria (NTM) 136 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.55 ของเสมหะทั้งหมด โดยตรวจพบเชื้อ *M. avium* complex 95 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.56 ของเสมหะทั้งหมด และพบ *M. kansasii* 14 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.70), *M. scrofulaceum* 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.09), *M. chelonae* 7 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.85), *M. fortuitum* และ *M. goodii* พบเชื้อละ 3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.36), และ พบเชื้อ *M. flavescens* และ *M. simiae* เชื้อละ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.24) ดังแสดงในตารางที่ 17 และ แผนภาพที่ 11

เมื่อนำเชื้อที่ไปทำการยืนยันผลการวินิจฉัยโดยวิธี REA-PCR ซึ่งอาศัยขนาดของ amplified PCR product ของ 16S-23S rRNA gene spacer และ restriction patterns 16S-23S rRNA gene spacer เมื่อตัดด้วย enzyme *Hae*III , *Msp*I และ *Bst*XI โดยอาศัย Dendrogram ของการแยก species ของ *Mycobacterium* ของ Sansila et al. ดังภาพที่ 10 จากการเปรียบเทียบ restriction patterns 16S-23S rRNA gene spacer ของเชื้อที่แยกได้กับ reference strains ดังภาพที่ 15-22 ให้ผลการวินิจฉัยเชื้อที่แยกได้จากเสมหะโดยวิธี REA-PCR ตรงกับการทดสอบชีวเคมี 195 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 23.72 ของตัวอย่างเสมหะทั้งหมด 822 ตัวอย่าง หรือเป็นร้อยละ 89.86 ของเสมหะที่พบเชื้อ *Mycobacterium* 217 ตัวอย่าง ได้เชื้อ *M. tuberculosis* 81 สายพันธุ์ , *M. avium* complex 81 สายพันธุ์ ซึ่งวิธี REA-PCR สามารถแยกได้เป็น *M. avium* 58 สายพันธุ์, *M. intracellulare* 3 สายพันธุ์ และ unclassify MAC 20 สายพันธุ์ , *M. kansasii* 14 สายพันธุ์; *M. scrofulaceum* 7 สายพันธุ์, *M. chelonae* 6 สายพันธุ์, *M. fortuitum* 4 สายพันธุ์, *M. gordonae* และ *M. flavescens* 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 19 และแผนภาพที่ 14 พบเชื้อ *Mycobacterium* 22 สายพันธุ์ ให้ผลการวินิจฉัยโดยวิธี conventional method แตกต่างกับหรือ REA-PCR แปลผลไม่ได้ดังตารางที่ 20

4. การวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* จากเลือดโดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR

จากผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการไข้เรื้อรัง ~1 สัปดาห์หรือมากกว่า หรือมีอาการทางคลินิกของวัณโรคที่ยินยอมให้เจาะเลือดและนำส่งใน BACTEC™ Myco/F lytic blood culture เพื่อตรวจหาการติดเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด 181 ราย เมื่อนำมาเพาะเชื้อใน LJ medium ทำการวินิจฉัยโดยวิธีของ Centers for Disease Control (Kent and Kubica, 1985) ตรวจพบ *Mycobacterium* 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.47 ของผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่ง hemoculture ทั้งหมด เมื่อนำมาแยกวินิจฉัยเชื้อโดยวิธี conventional method และ REA-PCR ให้ผลเหมือนกันทั้ง 2 วิธี ทั้ง 28 ราย คิดเป็นร้อยละ 100 โดยแยกวินิจฉัยได้เชื้อ *M. tuberculosis* 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.42 พบเป็น *M. avium* complex ในผู้ป่วย 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.50 พบเชื้อ *M. kansasii* 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.55 ดังแสดงในตารางที่ 27

ผู้ป่วยที่นำส่งทั้งเสมหะและเลือด 134 ราย พบเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะ 52 ราย คิดเป็นร้อยละ 38.81 พบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.94 พบเชื้อ *Mycobacterium* ทั้งในเลือดและเสมหะ 14 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.45 โดยพบ *M. tuberculosis* ทั้งในเลือดและเสมหะ 1 ราย คิดเชื้อ MAC ทั้งในเลือดและปอด 10 คน คิดเป็นร้อยละ 7.46 และผู้ป่วย 3 รายพบเชื้อ MAC ในเลือด แต่พบ *M. kansasii* และ unclassified *Mycobacterium* ในเสมหะ คิดเป็นร้อยละ 2.24

5. การเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* โดยวิธี conventional method เทียบกับ REA-PCR

จากการนำ chromosome ของเชื้อ *Mycobacterium* sp. 245 ตัวอย่าง ที่แยกจากเสมหะ 217 ตัวอย่าง และแยกจากเลือด 28 ตัวอย่าง ที่สกัดโดยวิธี mechanical lysis มาทำการแยกวินิจฉัยโดยการ amplified 16S-23S rDNA spacer และ restriction enzyme analysis พบว่าสามารถแยกวินิจฉัยเชื้อได้ ตรงกับการทดสอบชีวเคมี 223 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 91.02 ของ *Mycobacterium* ทั้งหมดที่นำมา ศึกษาเปรียบเทียบ พบว่า *Mycobacterium* ที่ผลการแยกวินิจฉัยโดยวิธี REA-PCR และ conventional biochemical test ไม่ตรงกัน 22 ตัวอย่าง แยกได้จากในเสมหะ คิดเป็นร้อยละ 8.97

การพบเชื้อ NTM ในเสมหะ อาจเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ หรือเป็นเชื้อในธรรมชาติที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เกิด colonization ในช่องปากหรือหลอดลม ซึ่งเชื้อ NTM ในธรรมชาติอาจ มีได้หลากหลายสายพันธุ์ นอกจากนี้การแยกเชื้อจากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยเอดส์ในครั้งนี้จะพบเชื้อ *Mycobacterium* มากกว่า 1 ชนิด ในผู้ป่วยหลายราย ซึ่งการทดสอบชีวเคมีจะไม่สามารถระบุถึงการปนเปื้อนของเชื้อ 2 ชนิดได้ แต่จะทำให้แปลผลผิดพลาดกลายเป็นเชื้อ species อื่นๆ เนื่องจากผลการทดสอบชีวเคมีปนกัน แต่ restriction patterns จะบ่งบอกถึงการปนเปื้อนของเชื้อทั้ง 2 ชนิด เนื่องจาก จะแสดง band ของ DNA fragment ของเชื้อทั้ง 2 ตัว จาก REA-PCR patterns ของเชื้อ 22 สายพันธุ์ ที่สามารถแบ่งเป็น 8 กลุ่ม อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุได้แก่

การที่ *Mycobacterium* บาง species มี REA-PCR pattern มากกว่า 1 แบบ โดย Frothingham และ Wilson ศึกษา DNA sequence ของ ISR gene ของเชื้อ MAC และพบว่า ISR gene ของ *M. avium* ประกอบด้วย 5 sequevars, ISR gene ของ *M. intracellulare* ประกอบด้วย 1 sequevars เท่านั้น ขณะที่ DNA sequence ของ ISR gene ของ unclassified MAC 7 สายพันธุ์ มี DNA sequence ของ ISR gene แตกต่างกัน และแตกต่างจาก DNA sequence ของ ISR gene ของ *M. avium* และ *M. intracellulare* (Frothingham and Wilson, 1993; Frothingham and Wilson, 1994) ดังนั้น REA-PCR ของ ISR gene ของเชื้อ *M. avium* สายพันธุ์ต่างๆ น่าจะสามารถแบ่งออกได้เป็นอย่างน้อย 5 กลุ่ม ขณะที่ REA-PCR ของ ISR gene pattern ของ unclassified MAC น่าจะสามารถแบ่ง เป็นอย่างน้อย 7 กลุ่ม ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อจากเสมหะที่มี DNA sequence ของ ISR gene alignment กับ ISR gene ของ *M. avium* สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ ที่มีรหัส AF410479 และ AF315833 โดยวิธี multiple alignment และ phylogenetic study มีถึง 4 กลุ่ม ที่ให้ REA-PCR ต่างกัน 3 แบบ ทั้งที่ให้ผลการทดสอบชีวเคมีเหมือนกับเชื้อในกลุ่ม MAC และให้ผลการทดสอบชีวเคมีแตกต่าง จากเชื้อ MAC ซึ่งวินิจฉัยเป็น *M. gordonae*, *M. scrofulaceum* และ *M. chelonae* ตามลำดับ ดังนั้นถ้าเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม เป็น *M. avium* ตามผลการศึกษา ISR gene sequence โดย phylogenetic study เชื้อทั้ง 4 กลุ่มน่าจะเป็น *M. avium* ที่มี sequevars ที่แตกต่างกัน

ในทางกลับกันพบเชื้อที่ผลการทดสอบชีวเคมีเหมือนกับเชื้อในกลุ่ม MAC ที่ ISR gene ที่มี REA-PCR ต่างกัน 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี ISR gene sequence alignment กับ ISR gene ของเชื้อที่ไม่ใช่เชื้อ MAC ได้แก่ เชื้อ 2 สายพันธุ์ ที่ผลทางชีวเคมีเป็น scotochromogens MAC และ *M. flavescens* มี ISR gene sequence alignment กับ ISR gene ของ *M. gordonae* แต่ REA-PCR patterns แตกต่างจาก REA-PCR patterns ของ *M. gordonae*, *M. avium* และ *M. flavescens* ที่แสดงโดย Sansila. ถ้าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็น *M. gordonae* ตาม phylogenetic study แสดงว่า REA-PCR patterns ของ *M. gordonae* ที่ปกติพบเป็น saprophytic *Mycobacterium* น้อยกว่า 2 แบบที่แตกต่างกัน

นอกนี้ยังพบว่า dendrogram ของ Sansila ไม่ได้แสดง REA-PCR patterns ของ ISR gene ของ *Mycobacterium* ครบทุก species จึงทำให้ใช้วินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* ไม่ได้ทุก species ตัวอย่างเช่น *M. simiae*. บางสายพันธุ์เป็น nonphotochromogen ที่ให้ผล niacin-positive ทำให้อาจเกิดการวินิจฉัยเชื้อ *M. simiae* โดยการทดสอบชีวเคมีผิดเป็น *M. tuberculosis* ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อ 2 สายพันธุ์เป็น nonphotochromogen ที่มีผลการทดสอบชีวเคมีเหมือน *M. tuberculosis* แต่ลักษณะ colony บน L-J medium กลบ เรียบ smooth ไม่ขรุขระ และขึ้นบน L-J medium ที่มี p-nitrobenzoic acid นอกนี้ยังต้องรักษาวินิจฉัยโรคหลายชนิด เชื้อมี PCR products ของ ISR gene ขนาด 560 bp โดยมี *HaeIII* restriction patterns เป็น 210/160/150/40 bp จาก multiple alignment DNA sequence ของ ISR gene คล้ายกับ ISR gene spacer ของ *M. Simiae* [Z46426] ซึ่งเป็นเชื้อที่ Sansila ไม่ได้แสดง REA-PCR patterns ไว้ใน dendrogram

อีกสาเหตุที่ทำให้ REA-PCR patterns ไม่สามารถให้ผลการวินิจฉัยตรงกับที่ทดสอบทางชีวเคมี อาจเกิดจากการมีเชื้อ *Mycobacterium* 2 ชนิดปนกันในเรื่องส่งตรวจ ที่อาจพบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคเอดส์ ซึ่งผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อที่ขึ้นปนกันยอมให้ผลที่ผิดพลาด และยังทำให้ REA-PCR patterns มี DNA fragments bands ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด เช่นในผู้ป่วยรายหนึ่งที่ผลการเพาะเชื้อของเสมหะ 3 ครอบง พบเชื้อ *M. kansasii* จากเสมหะ 1 ครอบง แต่ผลการเพาะเชื้อเสมหะอีก 2 ครอบง แยกได้เชื้อที่น่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อ *M. kansasii* และ *M. tuberculosis* โดยให้ PCR products ขนาด ~380 bp โดยมี *HaeIII* restricted patterns 380/200/120/55 bp. แสดงว่าต้องมี amplified ISR gene ของเชื้อที่ตัดไม่ได้ด้วย *HaeIII* enzyme และเชื้ออีกชนิดที่มี amplified ISR gene ของเชื้อที่ตัดได้ด้วย *HaeIII* enzyme ซึ่งพบว่าให้ผล REA-PCR คล้ายกับเชื้อ *M. tuberculosis* (200/120/55 bp) ผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อที่แยกได้ ให้ผลคล้ายกับผลชีวเคมีของเชื้อ *M. simiae* เนื่องจากเป็นผลการทดสอบที่ทำโดยเชื้อที่มี *M. kansasii* และ *M. tuberculosis* ปนกัน แต่ปริมาณของ *M. tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจทั้ง 2 มีน้อยกว่าเชื้อ *M. kansasii* และอัตราการเจริญเติบโตของ *M. tuberculosis* ก็ช้ากว่า *M. kansasii* ทำให้เมื่อทำการเพาะแยกเชื้อบน Middlebrook 7H10 แยกได้แต่เชื้อ *M. kansasii* โดยไม่สามารถแยกเชื้อ *M. tuberculosis*. restriction patterns ของ PCR product ของ

pure isolates เหมือน REA-PCR pattern ของ *M. kansasii* และมี DNA sequences related กับ *M. kansasii* [AB026695]

เหตุผลสุดท้ายที่ทำให้การวินิจฉัยโดยใช้ REA-PCR patterns ไม่ตรงกับผลชีวเคมี อาจเกิดจากผลการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ *Mycobacterium* แต่ละสายพันธุ์สามารถมี variation บางครั้งทำให้การวินิจฉัยเชื้อผิดพลาดซึ่งมักเกิดกับเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกันมากๆ เช่นในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อที่ให้ผลชีวเคมีเหมือน MAC แต่ REA-PCR และ multiple alignment ของ DNA sequence ของ ISR gene ของเชื้อนี้ บ่งชี้ว่าน่าจะเป็นเชื้อ *M. xenopi* ซึ่งผลชีวเคมีของเชื้อ *M. xenopi* ใกล้เคียงกับเชื้อ MAC มาก นอกจากนี้ยังพบว่า ในกลุ่มของ MAC ที่ผลชีวเคมีเหมือนกันแต่เมื่อใช้วิธี REA-PCR ของ ISR gene สามารถแยกเชื้อ *M. avium*, *M. intracellulare* และ unclassified MAC ออกจากกันได้อย่างง่ายดาย ทำให้เชื้อ MAC ทั้งหมดที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ 100 สายพันธุ์ สามารถแยกวินิจฉัยเป็นเชื้อ *M. avium* 73 สายพันธุ์, *M. intracellulare* 4 สายพันธุ์ และ unclassified MAC 23 สายพันธุ์

ทำให้สามารถสรุปได้ว่าวิธี REA-PCR ของ ISR gene สามารถใช้ในการวินิจฉัย *M. tuberculosis* และเชื้อ NTM ส่วนใหญ่โดยมีสาเหตุของการให้ผลไม่ตรงกันมี 4 ประการ คือ

1.) เชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกได้อาจเป็น species หรือ subspecies ของเชื้อ *Mycobacterium* ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาค้นหา pattern ของ REA-PCR ของ ISR gene

2.) ISR gene ของ *Mycobacterium* บาง species หรือ subspecies อาจมีความแตกต่างกันมี intraspecies variation ซึ่งต้องทำการศึกษาค้นหา pattern ของ REA-PCR ของ ISR gene ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์

3.) เชื้อที่ผลการทดสอบชีวเคมีมีความคล้ายกันมาก หากมี variation ของผลการทดสอบชีวเคมีอาจทำให้การวินิจฉัยผิดพลาด ดังนั้น pattern ของ REA-PCR ของ ISR gene อาจเป็นข้อมูลหนึ่งที่ช่วยเสริมการวินิจฉัยได้ดีขึ้น เช่น การวินิจฉัยเชื้อกลุ่ม MAC

4.) การมีเชื้อ *Mycobacterium* 2 ชนิดปนกัน ทำให้ผลการทดสอบชีวเคมี และผลการทดสอบ REA-PCR ผิดพลาด และให้ผลไม่ตรงกัน ต้องทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ก่อน

จากการศึกษาครั้งนี้การแยกวินิจฉัยโดยวิธี REA-PCR ของ Sansila สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* ได้หลาย species และให้ผลเหมือนกับผลการทดสอบชีวเคมีถึง 91% แต่จะพบว่า 16S-23S rDNA spacer ของเชื้อ *Mycobacterium* หลาย species มีหลายรูปแบบ ดังนั้นหากจะใช้วิธีดังกล่าวในการแยกวินิจฉัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องมีการศึกษาเชื้อ *Mycobacterium* ที่มีโอกาสพบได้ในร่างกาย หรือ ธรรมชาติ หลายๆ species และหลายๆสายพันธุ์ และทำ dendrogram ให้ครอบคลุม และการประเมินขนาด base pair ของแต่ละ DNA fragment band น่าจะใช้การประเมินโดยเครื่องมือเทียบกับ DNA marker มากกว่าการดู band ด้วยสายตา เพราะขนาดของ DNA fragment ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกันมาก จะทำให้วิธี REA-PCR เป็นวิธีวินิจฉัยที่น่าเชื่อถือ รวดเร็วที่ และราคาไม่แพงมาก ที่

สามารถใช้วินิจฉัยเชื้อ *Mycobacterium* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจแทน หรือร่วมกับการใช้การทดสอบชีวเคมีที่ใช้เวลานาน และต้องทำการทดสอบหลายๆชนิดพร้อมๆกัน แทนการใช้ AccuProbes ที่มีราคาแพงมาก

อย่างไรก็ตามการตรวจพบเชื้อ NTM หลายๆ สายพันธุ์ในสิ่งส่งตรวจเสมอไม่ได้แสดงถึงการติดเชื้อในเสมหะเสมอไป เนื่องจาก NTM เป็นเชื้อที่ปกติพบในธรรมชาติ จึงสามารถพบเป็น colonization ในช่องปากของคนปกติได้ทั่วไป และในการเพาะเลี้ยงเชื้อครั้งนี้ผู้วิจัยใช้ enrichment broth ของ MB/BACT ในการเพิ่มจำนวน ก่อนนำไปทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้ไม่สามารถประเมินปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เพาะได้โดยตรงจากเสมหะ แต่เนื่องจากผู้ป่วยเอดส์มีภูมิคุ้มกันต่ำและมีรายงานการติดเชื้อของ NTM หลายๆ สายพันธุ์ เชื้อ NTM ดังกล่าวที่แยกได้ก็มีโอกาสและสามารถพบเป็นสาเหตุของอาการทางคลินิกต่างๆในผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ NTM

6. ความชุกของการตรวจพบเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยเอดส์ของวัดพระบาทน้ำพุ

ผู้ป่วยเอดส์เข้าร่วมในงานวิจัย 325 คน เป็นชาย 209 คน หญิง 116 คน นำส่งเสมหะ 278 คน ชาย 177 คน หญิง 101 คน เจาะเลือดส่ง hemoculture 181 คน ชาย 114 คน หญิง 68 คน ส่งทั้งเลือดและเสมหะ 134 คน ชาย 81 คน หญิง 53 คน มีความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะผู้ป่วย 107 ราย (ชาย 75 ราย, หญิง 32 ราย) คิดเป็นความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะ 38.49% (ชาย 26.98%, หญิง 11.51%) มีความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือดผู้ป่วย 28 ราย (ชาย 18 ราย, หญิง 10 ราย) คิดเป็นความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือด 15.47% (ชาย 9.94%, หญิง 5.52%) มีความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือดหรือเสมหะผู้ป่วยเอดส์ 121 ราย (ชาย 82 ราย, หญิง 39 ราย) คิดเป็นความชุกของการพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเลือดหรือเสมหะ 37.23% (ชาย 25.23%, หญิง 12%) อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อ *Mycobacterium* เท่ากับ 2.34:1 โดยผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคปอดมีอายุระหว่าง 19-63 ปี อายุเฉลี่ย 33.53 ปี

พบเชื้อวัณโรคในเสมหะ 44 ราย (ชาย 33 ราย, หญิง 11 ราย) คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อวัณโรคในปอด 15.83% (ชาย 11.87%, หญิง 3.96%) อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อวัณโรคเท่ากับ 3:1 โดยผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคปอดมีอายุระหว่าง 24-46 ปี อายุเฉลี่ย 33.98 ปี พบเชื้อวัณโรคในเลือด 8 ราย (ชาย 4 ราย, หญิง 4 ราย) คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อวัณโรคในเลือด 4.42% (ชาย 2.21%, หญิง 2.21%) อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อวัณโรคเท่ากับ 1:1 โดยผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคปอดมีอายุระหว่าง 19-42 ปี อายุเฉลี่ย 23.75 ปี พบเชื้อวัณโรคในเลือดหรือเสมหะ 50 ราย (ชาย 36 ราย, หญิง 14 ราย) คิดเป็นความชุกของการติดเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยทั้งสิ้น 15.38% (ชาย 11.07%, หญิง 4.30%) อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อวัณโรคเท่ากับ 2.57:1 โดยผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคปอดและเลือดมีอายุระหว่าง 19-46 ปี อายุเฉลี่ย 33.19 ปี

ถ้าเปรียบเทียบกับการศึกษาของผู้วิจัยที่หาความชุกของผู้ป่วยเอดส์ขั้นสุดท้ายที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ในปี พ.ศ. 2542 จากเสมหะ 264 ตัวอย่าง ของผู้ป่วย 184 คนพบอัตราชุกของการป่วยเป็นวัณโรค สูงถึงร้อยละ 48.37 ซึ่งในครั้งนั้นผู้วิจัยเลือกศึกษาเฉพาะผู้ป่วยเอดส์อาการหนักที่อยู่ในอาคารพยาบาลเท่านั้น(สุวรรณ, 2545) จากมาตรการการควบคุมและป้องกันวัณโรคของวัดพระบาทน้ำพุที่พัฒนาขึ้นอย่างมากในปัจจุบัน โดยทำการตรวจกรองผู้ติดเชื้อวัณโรครายใหม่โดยนำส่งเสมหะ ไปยังโรงพยาบาลลพบุรี มีเจ้าหน้าที่ดูแลการรับยารักษาวัณโรค และทำการแยกผู้ป่วยหนักย้ายไปอยู่อาคารใหม่ นอกจากนี้จากการที่วัดพระบาทน้ำพุมีการตรวจกรองผู้ป่วยเอดส์ที่สงสัยเป็นวัณโรค อยู่แล้ว ในการวิจัยครั้งนี้ผู้ป่วยบางรายที่สงสัยว่าเป็นวัณโรคอาจเลือกไม่เข้าร่วมงานวิจัย แต่ส่งเสมหะไปตรวจและรักษาที่โรงพยาบาลลพบุรีแทน จึงพบอัตราการติดเชื้อวัณโรคในปอดลดลงเหลือเพียง 15.83% และพบมีอัตราการติดเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยทั้งสิ้น 15.38% ในจำนวนนี้พบการติดเชื้อวัณโรค ทั้งในปอดและในเลือด 1 ราย จำนวนผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะเพิ่มขึ้นในช่วงท้ายๆของการศึกษาเมื่อผู้วิจัยเสนอของว่างและเครื่องดื่มให้กับผู้วิจัยที่ส่งเสมหะครบ 3 ตัวอย่าง

เมื่อเทียบกับข้อมูลของโรงพยาบาลรามาริบัติ ในช่วงปี พ.ศ. 2533-37, โรงพยาบาลมหาสารนครเชียงใหม่ ในช่วงปี พ.ศ. 2530-35 และ โรงพยาบาลบาราศนราคร ในช่วงปี พ.ศ. 2530-35 ซึ่งพบว่าผู้ป่วยโรคเอดส์จะเป็นวัณโรคสูงที่สุดในบรรดาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสทั้งหลายที่พบในประเทศไทย โดยพบอัตราความชุกร้อยละ 40.9, 31.3 และ 50.2 ตามลำดับ จะพบอัตราการตรวจพบผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อในโครงการนี้น้อยกว่าที่พบในโรงพยาบาลทั้ง 3 ในช่วงปีดังกล่าว แต่จากรายงานจำนวนผู้ป่วยเอดส์ จำแนกตามโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ประเทศไทย ระหว่าง กันยายน พ.ศ. 2527 - 31 ตุลาคม พ.ศ. 2545 วัณโรค ของสำนักงานระบาดวิทยา พบว่าจากการระบาดของโรคเอดส์ที่พบสูงมาก ในปี พ.ศ. 2536 พบผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรคเพิ่มจากปี พ.ศ. 2535 172 ราย เพิ่มขึ้นเป็น 1141ราย และเพิ่มสูงสุดในปี พ.ศ. 2541 ที่พบผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรค 8,273 ราย เมื่อหน่วยงานทางสาธารณสุขมีการตื่นตัวในการควบคุมการระบาดของวัณโรค โดยวางมาตรการต่างๆ และนำ DOTS มาใช้ ในปี พ.ศ. 2543 การใช้ DOTS เพื่อควบคุมการรักษาผู้ป่วยวัณโรคครอบคลุมถึง 54% ของผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมดพบจำนวนผู้ที่ติดเชื้อเอดส์ที่ปริมาณมากขึ้นกลับมีจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรคลดลงเหลือ 6,980 ราย ในปี พ.ศ. 2544 (<http://epid.moph.go.th/epi31.html> ; WHO, 2002) การที่อัตราการติดเชื้อวัณโรคของผู้ป่วยเอดส์ที่ทำการศึกษาในระหว่าง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2543 – มกราคม พ.ศ. 2545 อาจเป็นเพราะมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อวัณโรคภายในโครงการชมรมรักษ์นิเวศน์มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันจำนวนผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรคทั่วประเทศก็มีแนวโน้มลง ทำให้อัตราการติดเชื้อ MAC และ NTM กลับเพิ่มขึ้นสามารถสังเกตได้ ดังจะกล่าวถึงในภายหลัง

ในการศึกษาครั้งนี้อายุของผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะ ทั้งเชื้อวัณโรค เชื้อ MAC และ เชื้อ NTM เฉลี่ยต่ำกว่า 40 ปี และมีอัตราส่วนของผู้ติดเชื้อ ชาย:หญิง ระหว่าง 1.79-3:1

ส่วนใหญ่แล้วผู้ชายจะมีโอกาสป่วยและเสียชีวิตจากวัณโรคได้สูงกว่า ผู้หญิง 4-5 เท่า อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันผู้หญิงจำนวนมากกำลังป่วยเป็นวัณโรคในอัตราที่สูงขึ้นมา แต่การป่วยและเป็นวัณโรคสูงกว่าในเพศชายไม่ได้เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับเพศที่แตกต่างกัน แต่น่าจะสัมพันธ์กับการที่ผู้ชายเคยมีบทบาทในการทำงาน เข้าสังคม และติดต่อกับผู้อื่นๆมากกว่า จึงมีโอกาสในการได้รับเชื้อสูงกว่า แต่เนื่องจากในปัจจุบันผู้หญิงมีโอกาสในการเข้าสังคม การทำงานนอกบ้าน และการมีการติดต่อสัมพันธ์กับเพื่อนฝูงมากขึ้นกว่าก่อน ย่อมเพิ่มโอกาสของการออกไปสัมผัสผู้ป่วยวัณโรครายอื่น จึงมีโอกาสได้รับเชื้อและป่วยเป็นทั้งเอคส์และวัณโรคสูงมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าอายุปกติผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่ที่ไม่ติดเชื้อเอคส์มักเป็นกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 40 ปี แต่อายุของผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอคส์มักจะมีอายุน้อยต่ำกว่า 40 ปี เช่นในการศึกษารังนี้ น่าจะเป็นผู้ที่ติดเชื้อเอคส์ส่วนใหญ่พบมากในผู้ที่อายุระหว่าง 20-40 ปีมากกว่า จากการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หรือการใช้ยาเสพติด และเนื่องจากผู้ป่วยเอคส์ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำเป็นกลุ่มเสี่ยงในการติดเชื้อวัณโรคสูงมาก

7. ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค

จากการศึกษาความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* 53 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอคส์ โดยวิธี Proportional method method โดยทดสอบกับยาต้านวัณโรค 7 ชนิด คือ isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, kanamycin, ofloxacin และ amikacin ซึ่งพบอัตราการดื้อยาของเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยโรเคคส์ ที่สถานดูแลผู้ป่วยโรเคคส์ โครงการธรรมรักษณ์เวศน์ วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ปี พ.ศ. 2543-2545 เป็นร้อยละ 33.96 โดยมีการดื้อยา 1 ชนิด (single drug resistant) ร้อยละ 15.09 เป็นการดื้อต่อยา isoniazid ร้อยละ 9.43; และดื้อต่อ rifampicin, ethambutol และ ofloxacin เพียงชนิดเดียว ชนิดละร้อยละ 1.89 และพบผู้ป่วยเอคส์ในการวิจัยครั้งนี้ติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิด ร้อยละ 18.87 ในจำนวนนี้เป็น multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) ที่ดื้อต่อยา isoniazid และ rifampicin ซึ่งเป็นยาสำคัญในระบบยาที่ใช้รักษาวัณโรค ถึงร้อยละ 11.32 โดยพบดื้อต่อ isoniazid และ rifampicin ร้อยละ 1.89; ดื้อต่อ isoniazid, rifampicin ร่วมกับ streptomycin และ ดื้อต่อ isoniazid, rifampicin ร่วมกับ ofloxacin เป็นร้อยละ 1.89; และพบเชื้อ MDR-TB ที่ดื้อต่อยา 4 ชนิด 3 สายพันธุ์ โดยดื้อต่อ isoniazid, rifampicin, streptomycin และ ethambutol 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 3.77); ดื้อต่อ isoniazid, rifampicin, ethambutol และ ofloxacin 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.89) อย่างไรก็ตามพบเชื้อที่ดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิดที่ไม่ใช่ MDR-TB 4 สายพันธุ์ โดยพบเป็นการดื้อต่อยา streptomycin ร่วมกับ ofloxacin อย่างละ 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.89) และ isoniazid, streptomycin และ ethambutol 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 5.66) ดังแสดงในตารางที่ 30

ในจำนวนเชื้อที่ทดสอบพบว่า *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายเดียวกันที่ส่งเสมหะมากกว่า 1 ครั้ง ให้ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคต่างกัน 1 ราย โดยพบ *M. tuberculosis* ที่ไว

ตัวอย่างทั้งหมด 1 ตัวอย่าง แต่อีกตัวอย่างเป็นเชื้อที่คือตัวอย่าง ethambutol ซึ่งทำการทดสอบซ้ำก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ขณะที่ผู้ป่วยอีก 3 รายให้ผลไวต่อยาต้านวัณโรคในทุกตัวอย่างที่ตรวจพบ นอกจากนี้ผู้ป่วย 1 รายที่พบการติด *M. tuberculosis* ทั้งในเสมหะและในเลือดก็พบเป็นเชื้อที่มีความไวต่อยาต้านวัณโรคเช่นเดียวกัน

เมื่อศึกษาประวัติของผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามก่อนการเก็บส่งตรวจพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ที่คือตัวอย่าง 9 ราย ตอบแบบสอบถามว่าไม่เคยได้รับยารักษาวัณโรคมามาก่อน ไม่เคยเป็นวัณโรค และไม่ได้อยู่ระหว่างการรักษาวัณโรค โดยพบเป็น MDR-TB 2 สายพันธุ์ ที่คือคือ isoniazid, rifampicin และ streptomycin 1 สายพันธุ์ และ isoniazid, rifampicin, ethambutol และ ofloxacin 1 สายพันธุ์; คือคือ isoniazid อย่างเดียว 2 ราย; คือคือ rifampicin อย่างเดียว 1 ราย , คือคือ ofloxacin อย่างเดียว 1 ราย ; คือคือ streptomycin และ ofloxacin 1 สายพันธุ์ และคือคือ isoniazid, ethambutol และ streptomycin 2 สายพันธุ์ ซึ่งผู้ป่วยที่ตอบแบบสอบถามว่าไม่เคยได้รับยารักษาวัณโรคมามาก่อนแต่คือคือยารักษาวัณโรค ซึ่งเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยรายดังกล่าวอาจจะเป็นเชื้อวัณโรคที่คือคือยารักษาวัณโรคแบบปฐมภูมิ หรือ primary drug resistance 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 16.98 ซึ่งการคือคือยารักษาวัณโรคแบบปฐมภูมิจะเกิดจากการได้รับเชื้อที่คือคือยาจากผู้ป่วยรายอื่น ซึ่งจัดเป็นปัญหาสำคัญเพราะแสดงว่ามีการระบาดของเชื้อคือคือยาไม่ได้เกิดจากการใช้ยาอย่างไม่เหมาะสมของผู้ป่วยเอง แต่ข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถามอาจมีข้อผิดพลาดจากการที่ผู้ป่วยอาจเคยเป็นวัณโรคมามาก่อนในอดีตและเคยได้รับยารักษาวัณโรคมามาก่อนแต่ไม่ทราบหรือจำไม่ได้ หรือไม่ทราบชื่อยาที่ได้รับแต่ในวัดพระบาทน้ำพุซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคอยู่มาก และผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันบกพร่องจึงมีโอกาสในการป่วยเป็นวัณโรคจากการติดเชื้อใหม่ ในการจะพิสูจน์ว่ามีการระบาดของเชื้อวัณโรคคือคือยาหรือไม่ จะต้องอาศัยการพิสูจน์ว่าสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยใช้เทคนิค Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) (Genewein, et al.,1993)

ผู้ป่วยคือคือยาที่ตอบแบบสอบถามว่าเคยได้รับยารักษาวัณโรคมามาก่อนมี 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.55 ผู้ป่วยที่เคยได้รับยาต้านวัณโรค 5 ชนิด นานกว่า 1 ปี แล้ว 1 ราย ไม่มีข้อมูลการได้รับยามาก่อน 2 ราย และไม่แน่ใจว่าเคยได้รับยาหรือไม่ 1 ราย น่าจะเป็นการคือคือยาแบบทุติยภูมิคือคือเคยได้รับการรักษา มาก่อนแต่รักษาไม่หามิผลทำให้เกิดการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่คือคือยา

การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี Proportional method ที่บ่งบอกว่าผู้ป่วยมีการคือคือยาหรือไม่นั้น ทำได้โดยการเปรียบเทียบจากจำนวนของ colonies ของเชื้อวัณโรคโดย colony ของเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียามากกว่าร้อยละ 1 ของ colonies ของเชื้อวัณโรคที่เจริญในอาหารที่ไม่มียา แต่การทดสอบจะต้องควบคุมปัจจัยที่เป็นตัวแปรสำคัญของการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ

1. อาหารทดสอบที่มียาจะต้องเตรียมให้มีความคงที่ และเก็บในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้มีการควบคุมอาหารทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากกองวัณ

โรคเตรียมอาหารทดสอบให้มีความเข้มข้นวิกฤติของยาดังแสดงในตารางที่ 9 ยกเว้นอาหารทดสอบ amikacin เตรียม โดยวิธี disk diffusion method

2. ปริมาณ Inoculum เนื่องจากปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดสอบต้องปรับให้ได้ความขุ่นประมาณ McFarland No. 1 ที่มีความขุ่นเทียบเท่ากับเชื้อ *Mycobacterium* ~ 10^7 CFU/ml ก่อนนำมาเจือจาง เป็น 10^6 CFU/ml เพื่อให้มีเชื้อวัณโรคเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มียา >2,000 colonies ถึงให้ผลการทดสอบด้วยวิธีนี้มีความน่าเชื่อถือ ซึ่งในการปรับความขุ่นเพื่อให้ถูกต้องแน่นอนผู้วิจัยปรับความขุ่นเทียบกับของ McFarland No. 1 โดยอาศัยใช้ spectrophotometer เพื่อให้ได้ความขุ่นที่คงที่

3. อายุของเชื้อที่ทดสอบก็มีผลต่อการทดสอบ เชื้อที่แก่เกินไป อาจนำเข้ายาเข้าสู่เซลล์ได้น้อยกว่า เชื้อที่อ่อนแอ อาจให้ปริมาณ colonies ที่ทดสอบน้อยเกินไป

3. การเลือก colony เชื้อของเชื้อเพื่อการทดสอบ นับอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เชื้อที่เลือกมาทำการทดสอบ ต้องขูดเชื้อที่เพาะขึ้นจาก หลาย ๆ colony เพื่อครอบคลุมทุกสายพันธุ์ของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยคนดังกล่าวที่มีโอกาสคือยาและไม่คือยา ดังนั้นถ้าการทดสอบ ไม่ได้เชื้อทุกสายพันธุ์จะทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน (เจริญ ชูโชติถาวร, 2540) ในการทดสอบครั้งนี้เชื้อบางสายพันธุ์มีการปนเปื้อนกับเชื้อ *Mycobacterium* อื่น ทำให้ต้องทำการ subculture เพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ก่อนทำการเก็บ stock เชื้อ อาจมีผลทำให้ประชากรของเชื้อที่ทำการทดสอบในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันไป เพราะในการ subculture แต่ละครั้งไม่สามารถนำประชากรทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงใหม่ได้ ดังนั้นเพื่อให้ผลการทดสอบถูกต้อง ควรจะนำเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจโดยตรง โดยไม่ผ่านการ subculture มาทำการทดสอบ และทำการเลือกเชื้อทดสอบจากหลาย ๆ colony เพื่อเป็นตัวแทนประชากรของเชื้อทั้งหมด เพื่อเพิ่มโอกาสการตรวจพบเชื้อการคือยา ซึ่งจะมีผลต่อการรักษาผู้ป่วยวัณโรค การทดสอบครั้งนี้พบประชากรของเชื้อที่ไวต่อยาและคือต่อยาสามารถปนเปื้อนในเสมหะของผู้ป่วยรายเดียวกัน ที่เมื่อเก็บเสมหะต่างเวลากันก็พบเชื้อที่ไวและคือต่อยาออกมากับเสมหะในสัดส่วนที่ต่างกัน ทำให้เสมหะบางตัวอย่างไวต่อยาทั้งหมด แต่อีก 1 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อคือยา ในกรณีของเสมหะที่แยกได้จากผู้ป่วยเฮดส์อาจมีปัญหาเนื่องจากมักมีเชื้อหลายชนิดปนเปื้อนอยู่ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่วัดพระบาทน้ำพุมีโอกาสพบเชื้อ NTM ในสิ่งส่งตรวจได้หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะเชื้อ MAC

การควบคุมคุณภาพมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการป้องกันข้อผิดพลาดต่างๆที่อาจเกิดขึ้นได้ง่าย เช่นคุณภาพของอาหารทดสอบ อุณหภูมิในการเพาะเชื้อ การเตรียม suspension ของเชื้อ การเจือจางเชื้อ โดยทำการทดสอบกับเชื้อมาตรฐานอย่าง H37Rv ที่เป็น wild type strain ที่ไม่เคยได้รับยามาก่อน จึงมีความไวต่อยาต้านวัณโรค

หากเปรียบเทียบกับการศึกษาความไวต่อยาต้านวัณโรคที่ผ่านมา ที่มีรายงานการคือยาของเชื้อวัณโรคในปี พ.ศ 2534 ร้อยละ 18 (ศุภชัย ฤกษ์งาม, 2534) ขณะที่รายงานของ สมถวิล ทัพพะ

วัฒน์ และคณะ ได้ศึกษาจากผู้ป่วยวัณโรคที่โรงพยาบาลปอดกรุงเทพ ในปี พ.ศ. 2538 พบอัตราการใช้ยา ร้อยละ 36.60 จากผู้ป่วย 347 ราย ซึ่งพบว่ามีอัตราการใช้ยา Isoniazid ร้อยละ 4.9 คือต่อ Rifampicin ร้อยละ 8.9 คือต่อ Ethambutol ร้อยละ 2.0 คือต่อ Streptomycin ร้อยละ 5.8 คือต่อ Ofloxacin ร้อยละ 4.3 และเกิดการดื้อยาหลายชนิด (MDR-TB) ร้อยละ 2.3 (สมถวิล ทัพพะวัฒน์ และคณะ, 2541) และรายงานของโรงพยาบาลโรคทรวงอก ในปี พ.ศ. 2540 มีรายงานการใช้ยา ร้อยละ 29.89 โดยพบอัตราการใช้ยา Rifampicin สูงที่สุด ร้อยละ 17.3 รองลงมาคือ Isoniazid ร้อยละ 9.5 และอัตราการใช้ยา Ethambutol และ Ofloxacin เป็นร้อยละ 0.6 และ 1.6 ตามลำดับ และพบอัตราการใช้ยาหลายขนาน ร้อยละ 10.51 (วิจิตรา ปราณสุจริต, มาณพ คำนวนคุณ, 2540) จากการศึกษาของการระบาดของเชื้อวัณโรคดื้อยาในจังหวัดเชียงรายที่มีการระบาดของโรคเอดส์ โดย Yanai, et al. ในตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน 745 คน พบการดื้อยา isoniazid , rifampin , streptomycin, ethambutol และ MDR-TB ร้อยละ 14, 13, 17, 8 และ 7.9 ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่เคยได้รับยารักษาวัณโรคมาก่อนจะพบการดื้อยาสูงขึ้นเป็น ร้อยละ 30, 33, 28, 12, and 22 ตามลำดับ โดยพบ MDR-TB ในผู้ป่วยเอดส์มากกว่าคนปกติ (Yanai, et. al. 1999) และจากการศึกษาความชุกของการดื้อยาในประเทศต่างๆ รวมทั้งในประเทศไทย พบว่าประเทศไทยมีการดื้อยา isoniazid ชนิดเดียว ร้อยละ 4.6 ร่วมกับยาตัวอื่นร้อยละ 11.5, คือยา rifampin ชนิดเดียวร้อยละ 6.9 ร่วมกับยาตัวอื่นร้อยละ 16.8, คือยา ethambutol ชนิดเดียวร้อยละ 2.3 ร่วมกับยาตัวอื่นร้อยละ 9.9, คือยา streptomycin ชนิดเดียวร้อยละ 7.6 ร่วมกับยาตัวอื่นร้อยละ 18.3 และ พบ MDR-TB ร้อยละ 3.8 โดย พบระหว่าง ร้อยละ 1.4-9.1 (Mendez, 1998; 338: 1641-9) และ จากรายงานการพบเชื้อวัณโรคดื้อยาของทางเหนือของประเทศไทยที่มีการระบาดของเชื้อคือยา isoniazid แบบปฐมภูมิร้อยละ 14.1 และคือยาแบบทุติยภูมิ 30.4 , คือยา rifampin แบบปฐมภูมิร้อยละ 13.4 และคือยาแบบทุติยภูมิ 32.6 และพบ MDR-TB แบบปฐมภูมิร้อยละ 7.9 และคือยาแบบทุติยภูมิ 21.7 (Supavikul, et. al. 1998) นับว่าการศึกษาค้นคว้าด้านวัณโรคในครั้งนี้พบอัตราการใช้ยาที่สูงมาก ถึงร้อยละ 33.96 พบการดื้อยา isoniazid อย่างเดียวร้อยละ 9.43 และร่วมกับยาตัวอื่น 16.98 ; คือยา rifampicin อย่างเดียวร้อยละ 1.89 และร่วมกับยาตัวอื่น 11.32 และมีรายงานการของ MDR-TB ถึง ร้อยละ 9.43 สูงกว่าการศึกษาของผู้วิจัยที่ทำการศึกษาในปีพ.ศ. 2542 พบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากวัดพระบาทน้ำพุ ร้อยละ 10.11 และไม่มีรายงานการดื้อยาหลายขนาน อัตราการใช้ยาด้านวัณโรคในปัจจุบันสะท้อนถึงผลจากการรักษาผู้ป่วย พบว่าในผู้ที่ไม่เคยได้รับยามาก่อนจะไม่มีโอกาสพัฒนาไปเป็นเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาเนื่องจากการดื้อยาตามธรรมชาติเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ดังนั้นอัตราการใช้ยาที่สูงแสดงถึงการที่ผู้ป่วยวัณโรคต้องเคยได้รับยามาก่อนแต่ไม่มีการควบคุมการรักษาให้รับยาอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้เกิดการคัดเลือกเชื้อที่ดื้อยาและมีปริมาณสูงขึ้นจนส่งผลต่อการรักษาในผู้ป่วยรายดังกล่าว แต่ปัญหาไม่สิ้นสุดที่ผู้ป่วยที่มีประชากรของเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาและรักษาไม่หาย ก่อให้เกิดการเจ็บหรือตายของผู้ป่วยรายนั้นเท่านั้น กับส่ง

ผลเสียต่อผู้อื่นโดยรวมอีกด้วยเนื่องจากเชื้อวัณโรคที่ื้อยและรักษาไม่หายนั้นสามารถแพร่กระจายสู่บุคคลรอบข้างมีผลทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อื้อยจะรักษาไม่หายตั้งแต่เริ่มต้น ในกรณีของวัดพระบาทน้ำพุ ซึ่งปัจจุบันผู้ป่วยหลายรายป่วยเป็นวัณโรคอยู่ก่อนแล้วและกำลังรักษาหากไม่ควบคุมให้ผู้ป่วยรับยาอย่างสม่ำเสมอและคงที่ ผู้ป่วยที่ไม่มีภูมิคุ้มกันของร่างกายเพียงที่จะกำจัดเชื้อที่มีหลงเหลืออยู่ได้ทั้งหมด จะมีเชื้อื้อยที่รอดจากการรักษาที่ไม่ถูกต้องก่อให้เกิดการื้อย และการื้อยหลายขนานอัตราการื้อยของเชื้อวัณโรคที่ไม่ส่งผลกระทบต่อการรักษาและสามารถควบคุมได้ อยู่ในช่วงร้อยละ 1-3 หากมีการื้อยในกลุ่มผู้ป่วยโรคเอดส์โอกาสที่ทำการรักษาให้หายขาดจากวัณโรคเป็นไปได้ยาก และผู้ป่วยมีโอกาสเสียชีวิตสูงจากการรักษาไม่หาย ดังนั้นการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคของเชื้อวัณโรคที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเอดส์ที่ติดเชื้อวัณโรค น่าจะเป็นประโยชน์และช่วยในการเลือกยารักษาที่เหมาะสม แต่การทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรควิธีมาตรฐานที่มีอยู่ในปัจจุบันมีข้อเสีย คือ ขั้นตอนในการทำการทดสอบยุ่งยาก และต้องใช้ทุนทรัพย์สูง ที่สำคัญในการทดสอบ ใช้ระยะเวลาานกว่าจะทราบผลการทดสอบ อาจใช้เวลา 8-12 สัปดาห์ ทำให้เป็นปัญหาในการนำข้อมูลมาใช้เพื่อปรับยาที่ใช้รักษา วิธีการทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคที่รวดเร็วยิ่งขึ้นและมีประสิทธิภาพ จะช่วยให้สามารถทดสอบความไวต่อยาด้านวัณโรคได้ เพื่อนำมาใช้ในการปรับเปลี่ยนยาในการรักษาผู้ป่วยวัณโรคให้เหมาะสม (ภาสกร อัครเสวี, 2543)

8. ความชุกของการตรวจพบเชื้อ Nontuberculous Mycobacterium ในผู้ป่วยเอดส์ของวัดพระบาทน้ำพุ

จากตัวอย่างเสมหะและเลือดของผู้ป่วยเอดส์ 325 ราย พบเชื้อ MAC ในเสมหะ 39 ราย (ชาย 28 ราย, หญิง 12 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ MAC จากเสมหะ 14.39% (ชาย 10.07%, หญิง 4.32%) จากการแยกเชื้อ MAC โดยวิธี REA-PCR และ DNA sequencing ของ 16S-23S rDNA spacer พบว่าผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC ในเสมหะ พบเชื้อ *M. avium* อย่างเดียว 26 ราย (ชาย 17 ราย, หญิง 9 ราย); *M. intracellulare* อย่างเดียว 1 ราย (ชาย 1 ราย) ; Unclassified MAC 7 ราย (ชาย 6 ราย, หญิง 7 ราย) และ พบเชื้อ *M. avium* ร่วมกับ Unclassified MAC 4 ราย (ชาย 3 ราย, หญิง 2 ราย); *M. avium* ร่วมกับ *M. intracellulare* และ Unclassified MAC 1 ราย (ชาย 1 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ *M. avium* จากเสมหะ 11.51% , *M. intracellulare* จากเสมหะ 0.72% และ Unclassified MAC จากเสมหะ 4.32% อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อ MAC เท่ากับ 2.33:1 โดยผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC มีอายุระหว่าง 21-63 ปี อายุเฉลี่ย 35.20 ปี พบเชื้อ MAC ในเลือด 19 ราย (ชาย 13 ราย, หญิง 6 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ MAC จากเลือด 10.49% (ชาย 7.18%, หญิง 3.31%) จากการแยกเชื้อ MAC โดยวิธี REA-PCR และ DNA sequencing ของ 16S-23S rDNA spacer พบว่าผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC ในเลือด พบเชื้อ *M. avium* อย่างเดียว 15 ราย (ชาย 11 ราย, หญิง 4 ราย); *M. intracellulare* อย่างเดียว 1 ราย (ชาย 1

ราย) ; Unclassified MAC 3 ราย (ชาย 1 ราย, หญิง 2 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ *M. avium* จากเลือด 8.28% , *M. intracellulare* จากเลือด 0.52% และ Unclassified MAC จากเลือด 1.66% อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อ MAC เท่ากับ 2.17:1 โดยผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC มีอายุระหว่าง 24-63 ปี อายุเฉลี่ย 36.95 ปี สำหรับผู้ป่วยทั้งหมดที่ศึกษาตรวจพบเชื้อ MAC ในเสมหะหรือเลือด 50 ราย (ชาย 34 ราย, หญิง 16 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ MAC จากเสมหะหรือเลือด 15.38% (ชาย 10.46%, หญิง 4.92%) จากการแยกเชื้อ MAC โดยวิธี REA-PCR และ DNA sequencing ของ 16S-23S rDNA spacer พบว่าผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC ในเสมหะหรือเลือด พบเชื้อ *M. avium* อย่างเดียว 26 ราย (ชาย 17 ราย, หญิง 9 ราย) ในจำนวนนี้ 5 รายพบเชื้อ *M. avium* อย่างเดียวเท่านั้นทั้งในเลือดและเสมหะ; Unclassified MAC อย่างเดียว 6 ราย (ชาย 5 ราย, หญิง 1 ราย) โดยพบ Unclassified MAC ในเลือด 2 ราย และ เสมหะ 4 ราย และ พบเชื้อ *M. avium* ร่วมกับ Unclassified MAC 5 ราย (ชาย 3 ราย, หญิง 2 ราย) โดยพบทั้งในเลือดและเสมหะ 2 ราย; ผู้ป่วยชาย 1 ราย ที่พบ *M. avium* ร่วมกับ *M. intracellulare* และ Unclassified MAC ในเสมหะ พบ *M. avium* ในเลือดด้วย ; พบ Unclassified MAC ในเสมหะ แต่พบ *M. intracellulare* ในเลือด 1 ราย และพบ *M. avium* ร่วมกับ เชื้ออื่น เช่น *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* ในเสมหะผู้ป่วยอย่างละ 1 ราย; พบ Unclassified MAC ร่วมกับเชื้อวัณโรคในเสมหะ และ *M. intracellulare* ร่วมกับเชื้อวัณโรคในเสมหะ อย่างละ 1 ราย ; ผู้ป่วยที่พบ *M. avium* ในเลือด 2 ราย พบเชื้อ *M. kansasii* ในเสมหะ 1 ราย และ *M. kansasii* ร่วมกับเชื้อวัณโรคในเสมหะ 1 ราย คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ *M. avium* จากผู้ป่วยในการศึกษารั้งนี้ 12.30% , *M. intracellulare* 0.92% และ Unclassified MAC 4.62% อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อ MAC เท่ากับ 2.13:1 โดยผู้ป่วยที่พบเชื้อ MAC มีอายุระหว่าง 21-63 ปี อายุเฉลี่ย 35.20 ปี

การศึกษารั้งนี้แยกได้เชื้อ NTM ที่ไม่ใช่ MAC จากเสมหะผู้ป่วย 39 คน (ชาย 25 ราย, หญิง 14 ราย) คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ NTM จากเสมหะ 14.03% (ชาย 8.99%, หญิง 5.04%) โดยพบ NTM 8 species คือ *M. kansasii* , *M. scrofulaceum*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. simiae*, *M. flavescens* และ *M. xenopi* โดยมีความชุกของการตรวจพบเชื้อ 2.52%, 2.16%, 1.44%, 1.44%, 1.44%, 0.72%, 0.36% และ 0.36% ตามลำดับ รวมทั้งพบเชื้อ unclassified *Mycobacterium* จากเสมหะผู้ป่วย 7 ราย คิดเป็นความชุกของการตรวจพบเชื้อ unclassified *Mycobacterium* 2.52% อัตราส่วนชาย:หญิง ที่พบเชื้อ NTM ในเสมหะเท่ากับ 1.79:1 โดยผู้ป่วยที่พบเชื้อ NTM มีอายุระหว่าง 21-54 ปี อายุเฉลี่ย 34 ปี และมีผู้ป่วยชายอายุ 30 ปีที่ติดเชื้อ *M. kansasii* ในเลือด 1 ราย คิดเป็นความชุกของการแยกเชื้อ *M. kansasii* ในเลือด 0.55%

การพบเชื้อ NTM ในเสมหะต่างจากการพบเชื้อในเลือดเพราะอาจเป็นเพียง colonization ของเชื้อโดยไม่ได้เกิดการติดเชื้อในปอดก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามในจำนวนผู้ป่วยที่ตรวจพบ NTM ในเสมหะจะพบว่ามีผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ NTM ชนิดเดียวกันในเสมหะมากกว่า 1 ตัวอย่าง 38 ราย โดย

พบ *M. avium* 17 ราย, Unclassified MAC 6 ราย, *M. intracellulare* 1 ราย , *M. kansasii* 6 ราย, *M. chelonae* 2 ราย, *M. scrofulaceum* 1 ราย, Unclassified *Mycobacterium* 3 ราย, *M. simiae* 1 ราย และ *M. goodii* 1 ราย และพบผู้ป่วยที่พบเชื้อ NTM ส่วนใหญ่แสดงอาการคล้ายวัณโรคหรือเสียชีวิตแล้วทั้งสิ้น

เมื่อเทียบกับการตรวจหาเชื้อ MAC ในประเทศไทยที่ศึกษาโดยผู้วิจัยท่านอื่น พบผู้ป่วยโรคเอดส์ที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล 4 แห่ง ในจังหวัดเชียงราย ที่มีไข้เรื้อรัง นานกว่า 2 สัปดาห์ มีอัตราการติดเชื้อ MAC ในเลือดร้อยละ 17.4 ขณะที่ติดเชื้อวัณโรคในเลือดร้อยละ 10.2 และจากการศึกษาของนายแพทย์ วิวัฒน์ร่วมกับหน่วยโรคติดเชื้อที่โรงพยาบาลรามาริบัติ ที่ทำการตรวจหาเชื้อ MAC จากสิ่งส่งตรวจหลายชนิด ได้แก่ เลือด ไชกระดูก เสมหะ และเนื้อเยื่อ ในปี พ.ศ. 2539 พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ติดเชื้อ MAC ร้อยละ 60 สามารถแยกเชื้อได้จากในเลือด ขณะที่จะสามารถแยกเชื้อ MAC จากไขกระดูก เสมหะ ต่อมาน้ำเหลือง เนื้อเยื่อ และกระดูก ได้ร้อยละ 17 เป็นโรคติดเชื้อที่เข้ามาเจริญและเป็นสาเหตุของการเป็นโรคและอัตราการตายในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ (Blazquez, et. al,1997) และรายงานของสำนักงานระบาดวิทยาพบการติดเชื้อ MAC และ *M. kansasii* ในผู้ป่วยเอดส์เพิ่มสูงขึ้นจาก 15 คนในปี พ.ศ. 2536 ที่เริ่มมีการระบาดของโรคเอดส์อย่างรุนแรงในประเทศไทย จนพบสูงสุดในปี พ.ศ. 2541 พบผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ MAC และ *M. kansasii* 113 ราย และจำนวนผู้ป่วยเอดส์ในปีพ.ศ. 2542-2544 เท่ากับ 92, 90 และ 88 รายตามลำดับ (<http://epid.moph.go.th/epi31.html>) ซึ่งการศึกษารังนี้พบอัตราการติดเชื้อ MAC ในผู้ป่วยเอดส์ในปัจจุบันสูงใกล้เคียงกับการติดเชื้อวัณโรคโดยมีความชุกของการพบเชื้อ MAC จากเสมหะ ร้อยละ 14.39 แต่ความชุกของการติดเชื้อวัณโรคในปอดพบร้อยละ 15.83 หากแต่การติดเชื้อในเลือดของผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุพบการติดเชื้อ MAC สูงกว่าโดยพบร้อยละ 10.49 ขณะที่พบเชื้อวัณโรคเพียงร้อยละ 4.42 ทำให้มีผู้ป่วยเอดส์ที่แยกเชื้อ MAC จากเสมหะ หรือเลือดในอัตราที่เท่ากับเชื้อวัณโรค คือ ร้อยละ 15.38 เช่นเดียวกับผลการตรวจเลือดของผู้ป่วยเอดส์ขั้นสุดท้ายที่มีไข้เรื้อรังของโรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปีพ.ศ.2540-2541 ที่พบการติดเชื้อ MAC ในเลือดร้อยละ 24.6 มากกว่า *M. tuberculosis* ซึ่งพบร้อยละ 21 (Suwanagool, et. al. 2000)

จากรายงานต่างๆ รวมทั้งการศึกษาในครั้งนี้นำมาพิจารณาเห็นว่าประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศอุตสาหกรรมใหม่ พบมีการติดเชื้อ MAC ในผู้ป่วยเอดส์ในอัตราการติดเชื้อที่สูงเช่นเดียวกับที่พบในประเทศตะวันตก จำนวนผู้ป่วย MAC ที่สูงขึ้นอาจเป็นจากหลายสาเหตุ เช่นอาจพบมีการติดเชื้อ MAC ในอัตราสูงเช่นนี้ในประเทศไทยแต่ประสิทธิภาพในการแยกวินิจฉัยเชื้อในอัสคิที่อาศัยเฉพาะการย้อมไม่อาจแยกวินิจฉัยการติดเชื้อ *Mycobacterium* อื่นได้ โดยจะพบรายงานของการติดเชื้อ MAC สูงในประเทศที่มีมาตรการควบคุมวัณโรคอย่างดีเท่านั้น หรืออาจเป็นเพราะ MAC เป็นเชื้อที่มี virulence ต่ำกว่าเชื้อวัณโรคและจะมีโอกาสก่อโรคในคนปกติได้น้อยมาก แต่เชื้อมีอยู่ในธรรมชาติทำให้ผู้ป่วยเอดส์ไม่สามารถหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อเหล่านี้ได้ ต่างจากการติดเชื้อวัณโรคที่พบการติดต่อก่อเกิด

ระหว่างผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคแพร่เชื้อสู่ผู้อื่นซึ่งถ้ามีการควบคุม วัณโรคจะมีโอกาสแพร่เชื้อได้น้อยกว่า MAC การติดเชื้อ MAC ในเลือดและในปอดที่เพิ่มจำนวนขึ้นในผู้ป่วยเอดส์ ทำให้แพทย์ผู้ดูแลผู้ป่วยโรคเอดส์ระยะสุดท้ายในประเทศไทยควรจะคำนึงถึงการติดเชื้อ MAC ในฐานะสาเหตุของโรคฉวยโอกาสสำคัญและควรมีการศึกษาถึงแนวทางการป้องกันการติดเชื้อ MAC ในผู้ป่วยโรคเอดส์ระยะสุดท้ายที่มีระดับ CD4 <100 cells/mm³ (เจริญ ชูโชติถาวร และคณะ ,2542; 82: 643-647)

การติดเชื้อ NTM ในผู้ป่วยโรคเอดส์ในประเทศไทยพบบ่อยมากขึ้น เนื่องจากภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องของผู้ป่วย นับตั้งแต่เจริญ ชูโชติถาวร และคณะรายงานการติดเชื้อ *M. kansasii* ในปอดของผู้ป่วยเอดส์เป็นรายแรก (Chuchottaworn, et. al. 1997;18: 223-229) NTM ที่เคยมีรายงานก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในปอดในเมืองไทย ได้แก่ *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. szulgai* *M. kansasii* รวมทั้งเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *M. simiae* (Sriyabhaya and Wongwattana 1981; Wongwatana and Sriyabhaya 1992) และ มีรายงานการพบการติดเชื้อ *M. simiae* and *M. simiae-M. avium* complex (SAV mycobacteria) เป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบบ disseminated ในผู้ป่วย AIDS ในประเทศไทย โดยเฉพาะในเด็กเล็ก ที่มีโอกาสวินิจฉัยผิดเป็น *M. tuberculosis* (MMWR. 2002;51:501-502)

9. การทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin ของ *Mycobacterium avium* complex

ผลการทดสอบความไวต่อยา clarithromycin โดยวิธี broth macrodilution test ของเชื้อ MAC จำนวน 72 สายพันธุ์ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดของผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง ได้ค่า MIC ของเชื้อ MAC ต่อยา clarithromycin $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ ถึง 68 สายพันธุ์ หรือ ร้อยละ 91.66 ขณะที่เชื้ออีก 2 สายพันธุ์ก็พบมีค่า MIC อยู่ในช่วง intermediate ระหว่างการคือและไวต่อยา clarithromycin จำนวน 6 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 8.33 ดังแสดงในตารางที่ 31 เมื่อเทียบกับ MIC ของการทดสอบ โดยวิธี E-Test[®] เชื้อ MAC ที่ทดสอบโดยวิธี E-test[®] Heifets ให้ค่า breakpoints สำหรับความไวของเชื้อ MAC ที่ทดสอบด้วยยา clarithromycin $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ และจากผลการทดลองดังตารางที่ 32 พบว่ามีเชื้อ MAC ที่ไวต่อยา clarithromycin ทั้งหมด 45 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 97.77 ของเชื้อที่ทำการทดสอบทั้งหมด ขณะที่ breakpoints สำหรับการคือต่อยา clarithromycin ของเชื้อ MAC เมื่อทดสอบโดยวิธี E-test[®] ต้องมีค่า MIC > 64 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบเชื้อ MAC ที่แยกได้จากเสมหะและเลือดจากผู้ป่วยโรคคือต่อยา clarithromycin เมื่อทดสอบโดยวิธี E-test[®] แต่พบเชื้อที่มีค่า MIC อยู่ในช่วง intermediate ระหว่างการคือและไวต่อยา clarithromycin จำนวน 1 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 2.22 โดยพบว่าเชื้อ MAC ทั้งหมดที่ทำการทดสอบไม่คือต่อยา clarithromycin

ที่ pH ต่างๆ กัน clarithromycin ของเชื้อที่ไวต่อยามีค่า MICs ต่างไปเมื่อทดสอบที่ pH ที่ต่างกัน โดยพบว่าที่ pH 7.4 ระหว่าง 0.12 - 0.5 $\mu\text{g/ml}$, ที่ pH 6.8 ระหว่าง MICs 0.25 - < 2.0 $\mu\text{g/ml}$, ที่ pH 6.0 MIC อยู่ระหว่าง 2.0 - 8.0 $\mu\text{g/ml}$ และ ที่ pH 5.0 4.0 - > 16.0 $\mu\text{g/ml}$ ในการทดสอบครั้งนี้ broth macrodilution test ทดสอบด้วย Middlebrook 7H9 ที่ pH 6.8 จึงควรมี break point MIC ของยา clarithromycin สำหรับเชื้อ MAC ที่ไวต่อยา เท่ากับ 0.25 - < 2.0 $\mu\text{g/ml}$ (Heifets, et .al,1991)

ข้อมูลที่น่ามาเปรียบเทียบการทดสอบวิธี broth macrodilution test กับ E-Test[®] ใช้เชื้อ MAC 45 สายพันธุ์ พบว่า E-test[®] ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นของยาที่กว้างกว่าระหว่าง 256-0.016 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ broth macrodilution test ทดสอบในช่วงความเข้มข้น 256 - 0.5 $\mu\text{g/ml}$ โดยพบว่ามีเชื้อที่ให้ค่า MIC < 2 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี ทั้ง 2 12 สายพันธุ์ จากจำนวนเชื้อที่ให้ผลการทดสอบโดยวิธี broth macrodilution test 16 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 75 และพบเชื้อที่ค่า MIC \leq 2 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี broth macrodilution test ซึ่งเป็น break point ของเชื้อที่ไวต่อยา 41 สายพันธุ์ ให้ผล MIC โดยวิธี E-Test[®] \leq 8 $\mu\text{g/ml}$ 40 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 97.56 ในกลุ่มของ เชื้อ MAC ที่ไวต่อยา พบเชื้อ MAC ที่ broth macrodilution test ให้ค่า MIC อยู่ในช่วงไวต่อยา เท่ากับ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ แต่ E-test[®] ให้ผลเป็น intermediate 1 สายพันธุ์ เท่ากับ 12 $\mu\text{g/ml}$ คิดเป็นร้อยละ 2.43 ขณะที่เชื้อ MAC ที่ทดสอบโดย broth macrodilution test ให้ค่า MIC > 2 $\mu\text{g/ml}$ 4 ราย แต่ให้ผล MIC โดยวิธี E-test[®] < 8 $\mu\text{g/ml}$ 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 75 เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC ของการทดสอบทั้งสอง โดย pair t-test พบผล MIC ของการทดสอบโดยวิธีทั้ง 2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.0013$) ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Fabry และคณะ 1996 ที่เปรียบเทียบ E-test[®] กับ broth macrodilution test แล้วให้ผลการทดสอบสัมพันธ์ และให้ค่า MIC ที่สามารถแยกเชื้อที่ไวต่อยาออกจากเชื้อที่ดื้อต่อยา แต่มีค่า MIC ไม่เท่ากันทุกประการ (Fabry W, Schmid EN, Ansorg R., Comparison ของ the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing ของ Mycobacterium avium complex. J Med Microbiol 1996 Mar;44(3):227-30.)

การทดสอบ E-test[®] ใช้เชื้อ suspension ในความเข้มข้นที่มากกว่า $\sim 10^7$ CFU/ml ขณะที่ broth macrodilution test ใช้เชื้อทดสอบเพียง $\sim 10^5$ CFU/ml ทำให้ E-test[®] มีโอกาสตรวจหาสายพันธุ์ที่ดื้อยาได้มากกว่า และมีข้อดีในการเห็นเชื้อที่ทำการทดสอบที่เจริญบน Middlebrook 7H10 ว่ามีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นหรือไม่ ต่างจาก broth macrodilution test ซึ่งตรวจสอบความขุ่น ยากต่อการสังเกตการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามการปรับ suspension ของเชื้อเพื่อการทดสอบ E-test[®] จะต้องระวังให้เชื้อกระจายตัวได้ดี ไม่มีเชื้อเกาะเป็นกลุ่มก้อน และต้องใช้ swab ที่ขนาดคงที่ เพราะหาก inoculum size ไม่เหมาะสมจะมีผลให้ inhibition zone กว้างหรือแคบเกินไป และอ่านค่า MIC ผิดพลาด นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับการทดสอบทั้ง 2 วิธี โดยเฉพาะ pH จะต้อง

คงที่เสมอ สำหรับ E-test[®] ยังพบความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณน้ำในอาหารก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยาซึมไปในอาหารทดสอบได้ไม่เท่ากัน การทดสอบ E-test[®] ต้องใช้เวลา 2 วัน สำหรับลงเชื้อ incubate ให้เชื้อขึ้น 1 วันและจึงวางยา ขณะที่ broth macrodilution test สามารถทำการทดสอบได้ในวันเดียวกัน แต่เสียเวลาในการเจือจางยาเป็น dilution ต่างๆ ทำให้ไม่เหมาะสมหากต้องทำการทดสอบกับเชื้อจำนวนมาก และอ่านค่าไอ หรือจุดในบางกรณีอาจตัดสินได้ไม่ชัดเจน

10. ผลการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆในเลือด

การตรวจพบแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆในเลือดที่แยกได้จาก BACTEC Myco/F lytic blood culture ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้ทั้งเชื้อ *Mycobacterium* และ แบคทีเรียและเชื้อราได้ด้วย แต่ผู้ป่วยเอดส์ในโครงการธรรมรักษันิเวศน์ได้รับยา Bacterim เพื่อควบคุมการติดเชื้อทุกวันอยู่แล้ว จึงมีโอกาสมพบการติดเชื้อแบคทีเรียในเลือดได้น้อยกว่าผู้ป่วยทั่วไป เชื้อที่พบในเลือดของผู้ป่วยเหล่านี้ก็คือต่อยาหรือผู้ป่วยได้รับเชื้อในปริมาณมากและภูมิคุ้มกันต่ำมากก็จะสามารถพบในเลือดได้ โดยเชื้อที่พบในเลือดของผู้ป่วยเอดส์เหล่านี้ เรียงตามจำนวนสายพันธุ์ที่พบในผู้ป่วย คือ *Cryptococcus neoformans* 7 สายพันธุ์ (ร้อยละ 3.87), *Pseudomonas* sp. 5 สายพันธุ์ (ร้อยละ 27.62), *Salmonella cholerae-suis* 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.66), *S. enterica* gr.B 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.66), *Bacillus* sp. 3 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.66), *Enterococci* 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.10), *Klebsiella pneumoniae* 2 สายพันธุ์ (ร้อยละ 1.10), *Acinetobacter lowffi* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Acinetobacter baumannii* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Burkholderia pseudomallei* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Salmonella paratyphi* A 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Staphylococcus epidermidis* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Staphylococcus aureus* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55), *Vibrio parahaemolyticus* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55) และ yeast not *Candida albicans* 1 สายพันธุ์ (ร้อยละ 0.55) ซึ่งเชื้อ *Bacillus* sp., *Staphylococcus epidermidis* และ yeast not *Candida albicans* อาจเป็นเพียง skin flora แต่ในผู้ป่วยเอดส์เชื้อที่เป็นเพียง skin flora ก็สามารถก่อโรคได้ จะพบว่าพบการติดเชื้อ *C. neoformans* สูงสุด เท่ากับการติดเชื้อ *Salmonella* และการติดเชื้อกลุ่ม non-glucose fermenter ที่เป็นเชื้อที่พบได้ในธรรมชาติ เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของกองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ที่รายงานจำนวนผู้ป่วยเอดส์ ในประเทศไทย จำแนกตามโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ระหว่าง กันยายน พ.ศ. 2527 - 31 ตุลาคม พ.ศ. 2545 เชื้อฉวยโอกาสที่พบสูงสุดที่พบทำให้เกิด septicemia ในประเทศไทยได้แก่เชื้อ *Mycobacterium*, รองลงมาเป็น Cryptococcosis, Candidiasis และ non-typhi species *Salmonella* (กองระบาดวิทยา, พ.ศ. 2545)

11. อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์

จากตารางที่ 11 ที่พบว่าผู้ป่วยเอดส์ในวัดพระบาทน้ำพุจะมีการเสียชีวิตระหว่าง 31-65 ราย ต่อเดือน หรือคิดเป็นร้อยละ 19.15 – 36.25 ของจำนวนผู้ป่วยในแต่ละเดือน สำหรับอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์ที่นำส่งเสมหะและเลือด เทียบการผลการตรวจพบเชื้อ พบว่า ณ เดือน มกราคม พ.ศ. 2545 ผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ 278 ราย เสียชีวิตแล้ว 141 ราย คิดเป็นร้อยละ 50.72 โดยพบว่าผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* ในเสมหะ 107 ราย เสียชีวิตแล้ว 58 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.21 ผู้ป่วยที่พบเชื้อ *M. tuberculosis* 38 ราย เสียชีวิตแล้ว 20 ราย คิดเป็นร้อยละ 52.63 คิดเชื้อ *M. avium* complex 35 ราย เสียชีวิต 24 คิดเป็น ร้อยละ 68.57 ผู้ที่พบเชื้อ NTM ชนิดอื่นๆ 26 ราย เสียชีวิต 14 ราย คิดเป็น ร้อยละ 53.85 แต่สำหรับผู้ป่วย 2 ราย ที่พบเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมกับ MAC , ผู้ป่วย 3 ราย ที่พบเชื้อ *M. tuberculosis* ร่วมกับ NTM และ ผู้ป่วย 3 ราย ที่พบเชื้อ MAC ร่วมกับ NTM ใน มกราคม พ.ศ. 2545 ยังไม่เสียชีวิต

ขณะที่ผู้เจาะเลือดและส่งตรวจ hemoculture 181 ราย เสียชีวิตแล้ว 73 ราย คิดเป็นร้อยละ 40.33 โดยพบว่าผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อ *Mycobacterium* 28 ราย เสียชีวิตแล้ว 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 53.57 พบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* 8 ราย เสียชีวิตแล้ว 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 62.50 *M. avium* complex 19 ราย เสียชีวิตแล้ว 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 47.37 และ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. kansasii* 1 ราย เสียชีวิตแล้ว คิดเป็นการเสียชีวิต ร้อยละ 100 แต่มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. tuberculosis* และ *M. avium* complex ขอกลับบ้านหลังจากทราบผลการพบเชื้อ 2 ราย คิดเป็นอัตราการเสียชีวิตในผู้ที่ตรวจพบเชื้อ *Mycobacterium* ร้อยละ 53.57 (เท่าที่ทราบ) และพบว่าผู้ที่ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆ จำนวน 30 ราย เสียชีวิตแล้ว 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 63.33 ในจำนวนนี้ติดเชื้อร่วมกับการติดเชื้อ *Mycobacterium* 4 ราย อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่นำส่งสิ่งส่งตรวจในเดือน มกราคม พ.ศ. 2545 แสดงในตารางที่ 34

พบผู้ป่วยที่มี septicemia จากแบคทีเรียและเชื้อรา 30 ราย เสียชีวิตแล้ว 19 รายคิดเป็นร้อยละ 63.33 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั้งหมด โดยพบว่าผู้ป่วยเอดส์ที่เป็น *Salmonellosis* ทุกรายเสียชีวิต ผู้ป่วย *Cryptococcosis* 5 ใน 7 ราย เสียชีวิต ในจำนวนนี้มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ร่วมกับเชื้อวัณโรคที่เสียชีวิต 1 ราย

จะพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์มีอาการคล้ายวัณโรคหรือมีไข้เรื้อรังที่ทำการศึกษา 325 คน เสียชีวิตในเดือนมกราคม 2545 แล้ว 165 ราย ร้อยละ 50.76 ผู้ป่วยที่เสียชีวิตมีการติดเชื้อ *Mycobacterium* 65 ราย แสดงว่าผู้ป่วยเอดส์ที่เสียชีวิตอาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Mycobacterium* ถึง ร้อยละ 39.39 เป็นการเสียชีวิตจากการเป็นวัณโรคปอดอย่างเดียว 19 ราย เสียชีวิตจากวัณโรคปอดร่วมกับ disseminated tuberculosis 1 ราย และ disseminated tuberculosis 4 ราย วัณโรคอาจเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตถึง ร้อยละ 14.55 ; พบเชื้อ MAC ในเสมหะ 18 ราย ในเลือด 3 ราย และพบเชื้อ MAC ทั้งในเสมหะและ

เลือด 6 ราย ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตจากการติดเชื้อ MAC ร้อยละ 16.36 ; และพบเชื้อ NTM ในเสมหะ 14 ราย โดยพบร่วมกับ MAC 2 ราย และพบเชื้อ NTM ในเลือด 1 ราย ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตจากการติดเชื้อ NTM ร้อยละ 9.09 ผู้ป่วยเอดส์ที่เข้าร่วมโครงการเสียชีวิตจาก septicemia ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ร้อยละ 13.48 โดยเป็นการเสียชีวิตจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ร่วมกับวัณโรค 1 ราย

ตารางที่ 34 อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ จังหวัดลพบุรี ที่ตรวจพบเชื้อในเสมหะ และ ในเลือด

	จำนวนผู้ป่วย (คน)		
	ทั้งหมด	เสียชีวิต	ร้อยละ
ผู้ป่วยที่นำส่งเสมหะ			
Culture positive			
<i>M. tuberculosis</i>	38	20	52.63%
<i>M. avium</i> complex	35	24	68.57%
MTB + MAC	2	0	0.00%
Other NTM	26	14	53.85%
MTB + NTM	3	0	0.00%
MAC + NTM	3	0	0.00%
subtotal	107	58	54.21%
Culture negative	171	83	48.54%
Total	278	141	50.72%
ผู้ป่วยที่นำ hemoculture			
Culture positive			
<i>M. tuberculosis</i>	8	5	62.50%
<i>M. avium</i> complex	19	9	47.37%
<i>M. kansasii</i>	1	1	100.00%
subtotal	28	15	53.57%
Bacteria/fungi (Mycobacterium + Bacteria)	30 4	19 1	63.33% 25.00%
Culture negative	127	40	31.50%
Total	181	73	40.33%

12. สรุปผลการการศึกษา

การติดเชื้อวัณโรค และการติดเชื้อ Nontuberculous *Mycobacterium* โดยเฉพาะ *M. avium* complex จะทำให้ผู้ป่วยเอดส์เป็นอันตรายถึงชีวิต โดยเฉพาะเมื่อมีการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา ยิ่งจะทำให้ผู้ป่วยโรคเอดส์มีโอกาสเสียชีวิตสูงมาก จากการศึกษาครั้งนี้พบ

1. อัตราการติดเชื้อวัณโรคสูง 15.38% (วัณโรคปอด 13.54 %, Disisminated TB 2.46 %) มีอัตราสูงของการติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาที่พบสูงถึงร้อยละ 33.96 เมื่อเทียบกับจำนวนเชื้อวัณโรคที่ทดสอบความไว หรือ ร้อยละ 5.54 ของจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ และพบเชื้อวัณโรคคือยาหลายชนิด ร้อยละ 11.32 ของเชื้อที่ทำการทดสอบ และ ร้อยละ 1.85 ของจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้ วัณโรคเป็นสาเหตุของการตายของผู้ป่วยเอดส์ที่ทำการศึกษามาถึง 14.55%

2. อัตราการติดเชื้อ MAC สูงเท่ากับวัณโรค 15.38% (พบเชื้อในเสมหะ 12%, Disseminated MAC 5.85 %) REA-PCR พบในกลุ่มของ MAC เป็นเชื้อ *M. avium* สูงที่สุด 12.30% Unclassified MAC 4.61% พบ *M. intracellulare* 0.92% ไม่พบสายพันธุ์ที่ดื้อยา clarithromycin MAC เป็นสาเหตุของการตายของผู้ป่วยเอดส์ที่ทำการศึกษามาถึง 16.36% สูงกว่าการติดเชื้อวัณโรค

3. อัตราการติดเชื้อ NTM อื่น สูง 12.30% (พบเชื้อในเสมหะ 12%, Disseminated NTM 0.31 %) พบเป็นเชื้อ *M. kansasii* สูงสุด รองลงมาเป็น *M. scrofulaceum* และพบเชื้อ *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, และ *M. flavescens* และสงสัยเป็นเชื้อ *M. xenopi* และ *M. simiae* จากการนำ DNA sequence ของ 16S-23S rDNA spacer ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตจากการติดเชื้อ NTM ร้อยละ 9.09

จากการศึกษาความไวของการย้อมเชื้อจากสิ่งส่งตรวจสำหรับผู้ป่วยเอดส์มีความไวต่ำมาก และการย้อมไม่สามารถแยกวินิจฉัย species ของเชื้อ *Mycobacterium* ซึ่งการศึกษานี้พบการติดเชื้อ Nontuberculous Mycobacteria โดยเฉพาะ MAC ในผู้ป่วยเอดส์ที่วัดพระบาทน้ำพุ ในปริมาณที่สูงใกล้เคียงกับอัตราการพบเชื้อวัณโรค การเพาะเชื้อเพื่อหาแยกวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค และ NTM น่าจะมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการติดเชื้อ MAC และ NTM จำเป็นต้องเลือกใช้ยาที่เหมาะสม เพราะเชื้อส่วนใหญ่คือดื้อยาที่ใช้ในระบบยารักษาวัณโรค วิธีการวินิจฉัยที่เร็วอย่าง REA-PCR จะเป็นประโยชน์หากมีการศึกษา patterns ได้อย่างครอบคลุม และใช้วิธีการที่ได้มาตรฐานในการอ่านขนาด DNA fragment และผู้วิจัยเห็นถึงความจำเป็นในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ทุกรายเพื่อเลือกใช้ยาที่เหมาะสม เนื่องจากพบมีอัตราการดื้อยาทั้งชนิด MDR-TB ในอัตราที่สูง ซึ่งผู้ป่วยเอดส์ที่เป็นวัณโรคถ้าไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมจะมีโอกาสรอดชีวิตน้อยมาก แต่น่าจะหาวิธีทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่มีประสิทธิภาพ และให้ผลรวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน จึงจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- 1 . Abe C, Hirano K, Wada M, et al. , 1993, Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by polymerase chain reaction by Gen Probe Amplified Mycobacterium Direct test , J Clin Microbiol ; 31 : 3270-1.
- 2 . Alangaden GJ, Kreiswirth BN, Aouad A, Khetarpal M, Igno FR, Moghazeh SL, Manavathu EK, Lerner SA. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 1998 May;42(5):1295-7.
- 3 . Altamiran M, Kelly MT, Wong A, et al., 1992, Characterization of a DNA probe for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction, J Clin Microbiol ;30 : 2173-6.
- 4 . American Thoracic Society , 1997 , Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria , Am J Respir Crit Care Med , (No. 2 part 2), 156 : S1-S25 .
- 5 . Andrews RH, Radhakrishna S, 1959, A comparison of two methods of sputum collection in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, Tubercle, London. 40: 155-62.
- 6 . Bal V, Kamat RS, Kamat J, Kandoth P, 1983, Enzyme linked immunosorbent assay for mycobacterial antigens , Ind J Med Res ; 78 : 477-83.
- 7 . Balows A, Willian S , Hausler SR, et al., 1991, Mycobacterium, In: Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, : 304.
- 8 . Barksdale L , Kim KS , 1977, Mycobacterium , Bacteriol Rev , 41(1) : 217-372.
- 9 . Barradell LB, Plosker GL, McTavish D , 1993, Clarithromycin. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in Mycobacterium avium-intracellulare complex infection in patients with acquired immune deficiency syndrome, Drugs , 46(2):289-312
- 10 . Belenger AE, Besra GS, Ford ME, et al., 1996, The embAB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. Proc Nalt Acad Sci USA; 93:11919-24.
- 11 . Benson CA , Ellner J , 1993 , Mycobacterium avium complex infection and AIDS : Advances in theory and practice , Clin Infect Dis , 17 : 7-20.
- 12 . Bermudez LE, Petrofsky M, Kolonoski P, Young LS , 1998, Emergence of Mycobacterium avium populations resistant to macrolides during experimental chemotherapy, Antimicrob Agents Chemother , 42(1):180-3.
- 13 . Besra GS, Chatterjee D, 1994, Lipid and carbohydrate of Mycobacterium tuberculosis, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control, ed. Bloom Br, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 285-306.

- 14 . Blazquez R, Ruiz-Serrano MJ, Munoz P, Miralles P, Perez-Tascon M, Bouza E. Mycobacterium avium complex infection: a growing problem in our country. Rev Clin Esp. 1997 Mar;197(3):158-62.
- 15 . Brisson-NÔel A, Gicquel B, Lecossier D, et al., 1989, Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples, Lancet ; 338 : 364-6.
- 16 . Brosius J , Ullrich A , Raker MA, et al., 1981, Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli* ., Plasmid, 6:112-8.
- 17 . Cambau E, Sougakoff W, Besson M, et al, 1997, Selection of a *gyrA* mutant of resistant Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolone during treatment with ofloxacin. J Infect Dis; 170: 479-483.
- 18 . Canetti G, Froman S, Grosset J, et al, 1963, Mycobacteria : Laboratory method for testing drug sensitivity and resistant , Bull Wld Hlth Org , 29 : 565-78.
- 19 . Capewell S, France AJ, et al., 1986, The diagnosis and the management of tuberculosis in common hostel dwellers, Tubecle , 67 : 125-32.
- 20 . Castet M, Rist N, Boisvert H, et al., 1969, La variété africaine du bacille tuberculeux humain., Med Afrique Noive; 16:321-2
- 21 . CDC , 1991 , Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected person - Florida and New York 1988-1991 , MMWR , 40 : 585-91.
- 22 . Centers for Disease Control, 1989, Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection: recommendations of the Advisory Committee for the Elimination of Tuberculosis (ACET), MMWR ; 38 : 236-250.
- 23 . Chaiprasert A, Prammananan T, Samerpitak K, et al., 1996, Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum by reamplification with 16S rRNA base primers , As Pac J Mol Biol Biotechnol ; 4(4) : 250-259.
- 24 . Chaisson RE, Schechter DF, Thever CP, et al., 1987, Tuberculosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Clinical features responses to therapy and survival, Am Rev Respir Dis ; 136 : 542-6.
- 25 . Chandler FW, Kaplan W, Ajello L, 1980, Histopathology of mycotic diseases, Lochem : Wolfe Medical Publications Ltd, 1980:63-69.
- 26 . Chandramuki et al. 1985, Detection of mycobacterial antigen and antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis , J Med Microbiol ; 20 : 239-47.
- 27 . Chuchottaworn C, 1994, Tuberculosis and HIV infection interrelation: present situation in Thailand. 4th National AIDS Seminar, 25-27 July 1994. Chiang Mai: AIDS division
- 28 . Chuchottaworn C, Sathapatayawongs B, Tansuphsawadikul S, et al., 1999 , Prevalence of disseminated Mycobacterium avium complex infection in Thai AIDS patients. J Med Assoc Thai ; 82(7):643-7.

- 29 . Chuchottaworn C, Sudsamart C and Pomchaipoontavee S. Pulmonary infection from *Mycobacterium kansasii* in Thai AIDS patient : the first case report on Thailand . *Thai J Tuberc Chest Dis* 1997;18: 223-229
- 30 . Chuchottaworn C, Sudsamart C, Kanpai M, 1998, Prevalence of nontuberculous mycobacterial infection in Central Chest Hospital., *Thai J Tuberc Chest Dis* ; 19: 25-31.
- 31 . Clark – Curtiss JE , 1990, Genome structure of mycobacteria .,In : McFadden JJ,ed., *Molecular biology of Mycobacteria*.Harcourt Brace Jovanovich, London,77 – 96.
- 32 . Cohn D , Bustreo F , Raviglione M, 1996 , Drug resistance in tuberculosis : review of world wide situation and WHO global surveillance project, *Clin Infect Dis*.
- 33 . Collins CH, 1993, *Laboratory acquired infections*, 3rd edn, Butterworth Heinemann, Oxford.
- 34 . Cornfield DB, Beavis KG, Greene JE, et al., 1997 , Mycobacterial growth and bacterial contamination in mycobacteria Growth Indicator Tube and BACTEC 460 culture systems, *J Clin Microbiol* ; 35 : 2068-71.
- 35 . Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL, 1992 , Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis, *J Clin Microbiol* ; 30 : 255-8.
- 36 . Crawford JT, 1996 , *Molecular approaches to the detection of mycobacteria* , *Mycobacteria*, volume 1 : Gangadharam P, Jenkins PA eds., *Basic Aspects* , Chapman and Hall , New York , in press.
- 37 . Daley CL , Small PM , Schecter GF , et al., 1992, An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among person infected with the human immunodeficiency virus, *N Engl J Med* , 326 : 231-5.
- 38 . Dannenberg AM , 1993, Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis, *Hosp Pract*,28:51-8 .
- 39 . David HL,1976, *Bacteriology of the mycobacterioses*. Atlanta: Centers for Disease Control, PSH, HEW (available from superintendent of Documents, U.S Government Printing Office, Washington, D.C. 20402.).
- 40 . Doran JL, Pang Y, Mduli KE, et al., 1997, *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transport family., *Clin Diagn Lab Immunol*; 4: 23-32.
- 41 . Dube MP, Torriani FJ, See D, Havlir DV, Kemper CA, Leedom JM, Tilles JG, McCutchan JA, Sattler FR. Successful short-term suppression of clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS. California Collaborative Treatment Group. *Clin Infect Dis*. 1999 Jan;28(1):136-8.
- 42 . Edwards LB, Palmer CE, 1959, Isolation of “atypical” mycobacteria from healthy persons. , *Am Rev Respir Dis*. 80:747-9.
- 43 . Eisenach KD , Crawford JT, Bates JH , 1986 , Genetic relatedness among strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex., *Am Rev Respir Dis* , 133 : 1065-8.
- 44 . Ellis ME , 1988 , *Mycobacterium* other than *M. tuberculosis* , *Curr Opin Infect dis* , 1: 252-71.

- 45 . Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW, et al., 1993, Tuberculosis symposium: emerging problems and promise, *J Infect Dis* ; 168 : 537-51.
- 46 . Ellner PD, Kiehn TE, Cammarata R, Hosmer M. Rapid detection and identification of pathogenic mycobacteria by combining radiometric and nucleic acid probe methods. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1349-52.
- 47 . Fabry W, Schmid EN, Ansorg R., Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex. *J Med Microbiol* 1996 Mar;44(3):227-30.
- 48 . Facklam R R, Washington II JA, 1991, Streptococcus and related catalase negative gram negative cocci, In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., *Manual of clinical microbiology* . , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 238-57.
- 49 . Farmer III JJ , Kelly MT, 1991, Enterobacteriaceae , In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., *Manual of clinical microbiology* . , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 360-383.
- 50 . Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach to using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- 51 . Finken M, Kirschner P, Meier A, et al., 1993, Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol*; 9: 1239-46.
- 52 . Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, et al. ,1980, the phylogeny of prokaryotes, *Science* ; 209 : 457-63.
- 53 . Frothingham, R., and K. H. Wilson. 1994. Molecular phylogeny of the *Mycobacterium avium* complex demonstrates clinically meaningful division. *J. Infect. Dis.* 169:305-312
- 54 . Frothingham, R., Wilson, K.H. 1993. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J Bacteriol* May;175(10):2818-25.
- 55 . Fujiki A, Kawai M, 1986, Minimum Essentials of Laboratory Procedure for Tuberculosis Control. The Research Institute of Tuberculosis, JATA.
- 56 . Genewein A, Teleni A, Bemascomi C, et al.,1993, Molecular approach to identifying the route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet*; 342: 841-844.
- 57 . Gilardi GL, 1991, Pseudomonas and Related species , In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., *Manual of clinical microbiology* . , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 429-441.
- 58 . Gottlieb Ms, Shraff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxona. Pneumocystis carinii pneumonia and Mucosol condidiopsis in previously healthy Homosexual man. *N Engl J med* 1981;305:1431-8
- 59 . Grange JM, 1996, *Mycobacteria and human diseases*, 2nd ed., p. 47-49. Arnold, London, United Kingdom.

- 60 . Green EP , Tizard MLV, Moss MT, et al., 1989 , Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis* , : *Nucleic Acids Res*; 17 : 9063-9073.
- 61 . Greene J , Sidhu G , Levin S , et al., 1982 , *Mycobacterium avium-intracellulare* : A cause of disseminating life-threatening infection in homosexuals and drug abusers , *Ann Intern Med* 97: 539.
- 62 . Griffith M, Barrett ML, Bodily HL, Wood RM, 1967, Drug susceptibility tests for tuberculosis using drug impregnated disks, *Am J Clin Pathol* , 47 : 812-7.
- 63 . Grotton J, Chaulet P, Maher D, 1997, Guidline for management of drug resistant tuberculosis, WHO/TB/96.210 (Rev.1), WHO.
- 64 . Hasen GA, 1880, *Bacillus leprae*, *Virchows Archiv*, 79:32-42.
- 65 . Hawkins JE, Good RC, Kubica GP, et al., 1983, The level of service concept on mycobacteriology, *ATS News*, 9 (No.2) : 19-25.
- 66 . Hawkins JE, Wallace RJ JR., Brown BA, 1991, Antibacterial susceptibility tests: *Mycobacteria*, In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., *Manual of clinical microbiology*. , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 304.
- 67 . Heifets LB, 1991, *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*, Florida : CRC Press.
- 68 . Heifets LB, 1996, Clarithromycin against *Mycobacterium avium* complex infections *Tuber Lung Dis* 1996 Feb;77(1):19-26
- 69 . Heifets LB, 1996, Susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates, *Antimicrob Agents Chemother*, 40(8):1759-67.
- 70 . Heifets LB, Comstock D, Lindholm-Levy P, 1991. MICs and MBCs of clarithromycin for *M. avium* isolated from AIDS patients. *Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol*. 1991 May 5-9;91:152 (abstract no. U-60). Unique Identifier : AIDSLINE ASM91/0110292
- 71 . Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein-Paul H, 1993, Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone resistant clinical isolate of *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 773-80.
- 72 . Higgins NP, Peebles CL, Sugino A, Cozzarelli NR, 1978, Purification of the subunits of *Escherichia coli* DNA gyrase and reconstitution of enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75:1773-7
- 73 . Holm J, Lester V, 1947 , Diagnostic demonstration of tubercle bacilli. *Public Health Rep* ; 62 : 847-54.
- 74 . Hongthiamthong P, Chuchottaworn C, Amatayakul N, 1994, Prevalence of drug resistance in Thai human immunodeficiency virus seropositive tuberculosis patients. *J Med Assoc Thai*; 77: 363-7.
- 75 . Hornick DB , Dayton CS , et al., 1988 , Nontuberculous mycobacterial lung disease : substiation of a less aggressive approach , *Cest* , 93 : 550-5.

- 76 . Horsburgh CR , Havlik JA, Ellis EA , et al., 1991 , Survival of patients with the acquired immunodeficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection with and without antimycobacterial chemotherapy., *Am Rev Respir Dis* , 144 : 557-9.
- 77 . Horsburgh CR Jr, Selik RM. The epidemiology of disseminated non tuberculous mycobacterial infection the acquired immunodeficiency syndrom (AIDS). *AM Rev Respir dis* 1989 ; 139 : 4-10
- 78 . Iseman M, 2000, Anti-tuberculosis drug resistance in the world: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance, 1994-1997, <http://www.who.int/inf-pr-2000/en/pr2000-19.html>.
- 79 . Iseman MD, 1996 , Editorial Directly-observed Therapy , patient education and combined drug formulations : complementary , not alternative , strategies in tuberculosis control , *Tuberc and Lung Dis* , 77 : 101.
- 80 . Isenberg HD, D'Amato RF, Heifets L, et al., 1991, Collaborative feasibility study of a biphasic system (Roche Septi-Chek AFB) for rapid detection and isolation of mycobacteria, *J Clin Microbiol* ; 29 : 1719-22.
- 81 . IUATLD/WHO , 1994, Control of tuberculosis in health care settings, *Tuberculosis and Lung Disease*; 75: 94-95.
- 82 . Jensen MA, Webster JA, Straus N, 1993, Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms, *Appl Environ Microbiol* ; 59: 945-52.
- 83 . Ji Y-En , Colston MJ , Cox RA, 1994, the ribosomal RNA (rrn) operons of fast-growing mycobacteria : primary and second structures and their relation to rrn operons of pathogenic slow-growers., *Microbiol* ; 140 : 2829-2840.
- 84 . Johnston RF, Wildrick KH, 1975, "State of the art" review. The impact of chemotherapy on the care of patients with tuberculosis, *Am Rev Respir Dis* ; 109 : 636-64.
- 85 . Kaneko K, Onodera O, Miyatake T, Tsuji S, 1990, Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR), *Neurology* ; 40 : 1617-8.
- 86 . Karison AG , Lessel EF, 1970 , *Mycobacterium bovis* nom. Nov. , *Int J Syst Bacteriol* , 20 : 273-83.
- 87 . Kelly A , 1994 , Reuters in the Hague " WHO sounds alarm over new threat from old killer" , *Bangkok Post* , Tuesday April 26, 1994.
- 88 . Kempell KE, Ji Y-En, Estrada-G ICE, et al. , 1992 , The nucleotide sequence of the promoter, 16S rRNA and spacer region of the ribosomal RNA operon of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with *Mycobacterium leprae* precursor rRNA., *J Gen Microbiol* . ; 138 : 1717-27.
- 89 . Kent PT , Kubica GP , 1985 , *Public Health Mycobacteriology : A guide for the level III laboratory* , Atlanta : Center for Disease Control .
- 90 . Kiehn TE. The diagnostic mycobacteriology laboratory of the 1990s. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl 2): S447-54.

- 91 . Kilian M,1991, Haemophilus , In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., Manual of clinical microbiology. , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 463-470.
- 92 . Kim TC, Arora NS, Aldrich TK, Rochester DF , 1981 , Atypical mycobacterial infections: a clinical study of 92 patients., South Med J ; 74(11):1304-8
- 93 . Kinyoun JJ, 1915, A note of Uhlenhuth's method for sputum examination for Tubercle bacilli , Am J Pub Health; 5: 867-70.
- 94 . Klein NC, Duncanson FP, Henox TH, 1989 , Use of mycobacterial smears in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in AID/ARC patients, Chest, 95 : 1190-2.
- 95 . Kloos WE, Lambe Jr. DW, 1991, Staphylococcus , In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., Manual of clinical microbiology. , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 222-237.
- 96 . Kocazeybek BS, Arabaci U. Use of Etests with carbapenems for Gram-negative rods producing beta-lactamases. Int J Antimicrob Agents. 2002 Feb;19(2):159-62.
- 97 . Koch R , 1882 , Die Aethiologie der Tuberkulose , Berl Klin Woch enschr, 19: 221-30.
- 98 . Kochi A, 1991, The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization, Tubercle, 72: 1-6.
- 99 . Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, et al., 1992 , Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by using the polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system , J Clin Microbiol ; 30 : 2567-75.
- 100 . Koneman EW, Roberts GD, 1985, Practical laboratory mycology , Baltimore : Williams & Wilkins, 88-90.
- 101 . Kubica GP, Baess I, Gordon RE, et al., 1972, A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. , J Gen Microbiol. ; 73 : 55-70.
- 102 . Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G, 1963, Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine sodium hydroxide for culture of mycobacteria, Am Rev Respir Dis; 87: 775-9)
- 103 . Kubica GP, Gross WM, Hawkins JE, et al., 1975 , Laboratory services for mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis ;112:773-87.
- 104 . Kubica GP, Pool GL, 1960, Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli, I. An attempt to subgroup these organisms on the basis of their calase activity at different temperature and pH, Am Rev Respir Dis ; 81: 387-91.
- 105 . Kubica GP, Silcox VA, Hall E, 1973, Numerical taxonomy of selected slowly growing mycobacteria. , J Gen Microbiol.; 74 : 159 - 67.
- 106 . Kwon-Chung KJ, Bennete JE,1992 , Mycology , Philadelphia : Lea & Febieger, 391-446.

- 107 . Lane DJ, Pace B, Olsen GT, et al., 1985 , Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proc Natl Acad Sci USA*; 82 : 6955-9.
- 108 . Lappayawichit P., Rienthong S, Rienthong D, et al., 1996, Differentiation of *Mycobacterium* species by restriction enzyme analysis of amplified 16S-23S ribosomal DNA spacer sequences, *Tubercle and Lung Disease*; 77: 257-63.
- 109 . Lebrun L, Onody C, Vincent V, Nordmann P. Evaluation of the Etest for rapid susceptibility testing of *Mycobacterium avium* to clarithromycin. *J Antimicrob Chemother.* 1996 May;37(5):999-1003.
- 110 . Lehmann KB , Neumann R , 1896 , Atlas und Grundris der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik , JF Lehmann , Munchen , Germann.Michael D , Iseman MD, 1994 , Treatment of multidrug-resistant tuberculosis, *Medicine Digest*, special issue, 12 : 9-21.
- 111 . Levin ME, Hatfull GF, 1993, *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance in mycobacteria. *Res Microbiol*; 8: 277-85.
- 112 . Levy – Frebault V, Portaels F, 1992, Proposed minimal stands for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species, *Int J Syst Bacteriol*, 42 : 315-23.
- 113 . Liesack W, Pitulle C, Sela S, Stackebrandt E, 1990, Nucleotide sequence of the 16S rRNA from *Mycobacterium leprae*., *Nucleic Acids Res.* ; 34 : 2838-40.
- 114 . Longo MC, Berniger MS, Hartley JL, 1990, Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, *Gene* ; 93 : 125-8.
- 115 . Louie EE, Rice LB , Holzman RS, 1989, Tuberculosis in non-Haitian patients with acquired immunodeficiency syndrome, *Chest* ; 9 : 542-6
- 116 . Major RH , 1959 , Classic description of disease , 3rd ed. , Charles C Thomas , Springfield IL., 52-3.
- 117 . Mascellino MT, Iona E, Fattorini L, De Gregoris P, Hu CQ, Santoro C, Orefici G ,1991, In vitro activity of clarithromycin alone or in combination with other antimicrobial agents against *Mycobacterium avium*-intracellulare. Complex strains isolated from AIDS patients, *J Chemother* , 3(6):357-62.
- 118 . Matsiota-Bernard P, Zinzendorf N, Onody C, Guenounou M. Comparison of clarithromycin-sensitive and clarithromycin-resistant *Mycobacterium avium* strains isolated from AIDS patients during therapy regimens including clarithromycin. *J Infect.* 2000 Jan;40(1):49-54
- 119 . Meletiadiis J, Mouton JW, Meis JF, Bouman BA, Verweij PE. Comparison of the Etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug;40(8):2876-85.
- 120 . Mendez AP, 1998 Prevalence of primary drug resistance in 32 countries. *NEJM*, 338: 1641-9
- 121 . Michael D, Iseman MD, 1994, Threatment of mutidrug-resistant tuberculosis , *Medicine Digest* , special issue ; 12 : 9-21.
- 122 . Middlebrook G, Cohn ML, 1958, Bacteriology of tuberculosis : laboratory methods. *American Journal of Public Health*; 48 : 844-53.

- 123 . Miomer H, Gebre N, Karlsson U, et al., 1994, Diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Lancet*; 344 : 127.
- 124 . Mitchison DA , 1980 , Treatment of tuberculosis , *J Roy Col Physicians*; 14 : 91-9.
- 125 . MMWR. 2002, Disseminated Infection With Simiae-Avium Group Mycobacteria in Persons With AIDSThailand and Malawi, 1997. Rep 2002 Jun 14;51(23):501-2
- 126 . Mullis KB, 1990, The unusual origin of the polymerase chain reaction, *Scientific American*; April : 36-43.
- 127 . Musial CE, Tice LS, Stockman L, Robert GD, 1988, Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnosis system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex, *J Clin Microbiol* ; 26: 2120-3.
- 128 . Nadler JP , Berger J, Nord JA, et al . , 1991, Amoxicillin Clavulanic acid for treating drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* , *Chest* , 99 : 1025-6.
- 129 . NCCLS, 1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for anaerobic bacteria. 3rd edition, Approver Standard, M11-A3, vol.13, no.26.
- 130 . NCCLS,1993. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 3rd edition, Approved Standard, M7-A3, vol.13, no.25.
- 131 . Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Infect Dis* 1992;165:1082-5.
- 132 . Nuchprayoon C, Chinachoti N , Thanabodhi P , 1969 , Primary drug resistance in tuberculosis survey at a chest clinic in Bangkok , *JMAT* , 52 : 645-8.
- 133 . Nuchprayoon C, Thanabodhi P , Chinachoti N , et al . , 1968 , Pulmonary disease due to photochromogenic mycobacterial infection. *J Medical Assoc Thai* , 51 : 923-31.
- 134 . O'Brien RJ , Geiter LJ, Snider DE, Jr., 1987 , The epidemiology study of nontuberculous mycobacterial disease in the United States , *Am Rev Respir Dis* , 135 : 1007-14.
- 135 . O'Brien RJ , Lyle MA , Snider DE , 1987 , Rifabutin (ansamycin LM 427) : a new rifamycin-S derivative for the treatment of mycobacterial disease , *Rev Infect Dis* , 9 : 519-30.
- 136 . Odds FC, Abbott AB, 1980, A simple system for presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species, *Sabouraudia* , 18 : 301-17.
- 137 . Palittapongampim P, Rienthong S, Panbangred W, 1993, Comparison of restriction fragment length polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from cerebrospinal fluid and sputum: a preliminary report, *Tuberc Lung Dis*; 74: 204-7.
- 138 . Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, et al.,1997, Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli, *J Clin Microbiol* ; 35 : 364-8.

- 139 . Pickett MJ, Hollis DG, Bottone EJ, 1991, Miscellaneous Gram negative Gram negative bacilli , In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., Manual of clinical microbiology. , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 410-428.
- 140 . Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakus MA , et al., 1992 , Differentiation of slowly growing Mycobacterium species , by gene amplification and restriction fragment length polymorphism, J Clin Microbiol ; 30 : 1815-1822.
- 141 . Pongparit S, Survey of Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from the Sputum of AIDS Patients at Wat Phra Baht Nam Phu, Lopburi Province, Thailand, in 1999. *Bull Health, Sci. & Tech.* 2002;5(1): 29-34.
- 142 . Portillo PD, Murillo LA, Patarroyo ME, 1991, Amplification of the species specific DNA fragment of Mycobacterium tuberculosis and its possible use in diagnosis, J Clin Microbiol ; 29 : 2163-8.
- 143 . Rattan A, Gupta SK, Singh S, 1993, Detection of antigens of Mycobacterium tuberculosis in patients of infertility by monoclonal antibody based sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) , Tubercle Lung Dis 74 : 200-3.
- 144 . Ravighione MC, Narain JP, Kochi A, 1992, HIV associated tuberculosis in developing country : clinical features, diagnosis and treatment, Bull WHO; 70:515-26.
- 145 . Raynaud C, Lancelle A, Senaratne RH, et. al., 1999, Mechanisms of pyrazinamide resistance mycobacteria : importance of lack of uptake in addition to lack of Pyrazinamide activity, Microbiol; 145: 1359-67.
- 146 . Redd GB , 1957, Family I Mycobacteriaceae chester 1897. In : Breed RS, Murray EGD , Smith NR, eds. Bergey's manual of determinative Bacteriology. 7th ed. Baltimore (MD) : William & Wilkin.
- 147 . Rippon JW, 1982, Medical Mycology , Philadelphia : W.B. Saunders Comp : 565-94.
- 148 . Robert GD, Koneman EW , Kim YK ., 1991 , Mycobacterium. In : Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ., Manual of clinical microbiology. , 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology , 304 .
- 149 . Rogall T , Flohr T, Böttger E, 1990 , Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA, J Gen Microbiol , 136 : 915-20.
- 150 . Rogall T , Wolters J , et al. , 1990 , Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium , Int J Syst Bacteriol , 40 : 323-30.
- 151 . Roth A, Schaberg Y, Mauch H, 1997, Molecular diagnostic of Mycobacterium tuberculosis : current clinical validity and future perspectives, Eur Respir J ; 10 : 1877-91.
- 152 . Rouillon A, Perdrizer S, Parrot R, 1976, Transmission of tubercle bacilli: the effect of chemotherapy, Tubercle, 57: 275-99.
- 153 . Runyon EH , 1959 , Anonymous mycobacteria in pulmonary disease, Med Clin North Am, 43 : 273
- 154 . Runyon EH, Selin MJ, Harris HW, 1965, Distinguishing mycobacteria by the niacin test, American Reviews of Tuberculosis, 79:663-5.

- 155 . Sada E, Aguilar D, Torres M, Herrera T, 1992, Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis , J Clin Microbiol ; 30 : 2415-8.
- 156 . Sanchez L, Londono D, Arango AI, Mattar S. In vitro activity of antituberculous agents against Mycobacterium tuberculosis isolates from Bogota, DC (Colombia) evaluated by the ETest. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999 Oct;35(2):109-12.
- 157 . Sansila A, Hongmanee P, Chuchottaworn C , et al. , 1998 , Differentiation between Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium by amplification of the 16S-23S ribosomal DNA spacer , J Clin Microbiol; 36(9): 2399-403.
- 158 . Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, et al, 1997, Characterization of pncA mutations in Pyrazinamide resistant Mycobacterium tuberculosis, Antimicrob Agents Chemother; 41: 540-3.
- 159 . Sheehan S, Schroder G, Garland J, 1997, Detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples using the new Abbott LCx MTB assay, Clin Microbiol Infect; 3(S2) : 159.
- 160 . Shinnick TM , Good RC , 1994 , Mycobacterial taxonomy , Eur J Clin Microbiol Infect Dis , 13 : 884-901.
- 161 . Siddigi SH, 1989, BACTEC TB system : Product and procedure manual . Maryland : Becton Dickinson.
- 162 . Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, et al., 1993, Exogenous reinfection with Multi-Drug resistance Mycobacterium tuberculosis in patients with advanced HIV infection, N Eng J Med ; 328 :1137-44
- 163 . Smithwick RW, 1976 , Laboratory manual for acid fast microscope , 2nd ed. , Atlanta : Center of Disease Control.
- 164 . Soini H, Skurnik M, Liippo K, et al., 1992, Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of a gene coding for the 32-Kilodalton protein. J Clin Microbiol ; 30 : 2025-8.
- 165 . Sriyabhaya N, Wongwattana S, 1981, Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria : A report of 24 cases in Thailand., Rev Infect Dis , 3: 1085-9.
- 166 . Stackebrandt E, Liesack W, 1993, Nucleic acid and classification. In : Goodfellow M, O'Donnell AD, eds., Handbook of New Bacterial Systematics , Academic press London , 152-94.
- 167 . Stackebrandt E, Goebel BM, 1994, Taxonomic note : a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA analysis in the present species definition in bacteriology., Int J Syst Bacteriol , 44 : 846-9.
- 168 . Stahl DA , Urbance JW , 1990 , The division between fastand sloe growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria , J Bacteriol , 172 : 116-24.
- 169 . Stead WW. Pathogenesis of a first episode of chronic pulmonary tuberculosis in man: recrudescence of residuals of the primary infection or exogenous reinfection? Am Rev Respir Dis 1967; 95:729-45.
- 170 . Stoneburner R, Laroche E, Prevots R, et al. Survival in a cohort of human immunodeficiency virus-infected tuberculosis patients in New York City. Implications for the expansion of the AIDS case definition. Arch Intern Med 1992; 152:2033-7.

- 171 . Sunderam G, McDonald RJ, Maniatis T, et al. Tuberculosis as a manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *JAMA* 1986; 256:362-6.
- 172 . Supavitkul , S, et. al. ,1998 Increasing burden of tuberculosis and high rate of drug resistance in an HIV epicentre in northern Thailand 1989-1997. 12th WORLD AIDS CONFERENCE , GENEVA 1998, ABSTRACT 22131.
- 173 . Suphorn S, Pavongsak R. Treatment of pulmonary tuberculosis in negative sputum smear patients with 4 – month and 6- month short course chemotherapy regimens . *J Trop Med Parasitol* 1995 ; 18:51 – 9.
- 174 . Suwanagool S, et. al. Mycobacteriosis in HIV/AIDS : The real challenge of the new millennium. Presented at the SIRIRAJ SCIENTIFIC CONGRESS 2000 Abstract NO. 414 “The Centenary Celebrations of the Birth of Her Royal Highness Princess Srinagarindra the Princess Mother” March 6-10, 2000
- 175 . Suzanne EG , James OK , Butler WR , Ramos LS , 1994, Rapid identification of mycolic acid pattern of mycobacteria by high- performance liquid chromatography using recognition software and a Mycobacterium library, *J Clin Microbiol* ; 32(3) : 740-5.
- 176 . Suzuki Y, Nagata A, Ono Y, Yamada T, 1988, Complete nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of *Mycobacterium bovis* BCG., *J Bacteriol.* ; 170 : 2886-9.
- 177 . Technical guide for collection, 1977. International Union Against. Tuberculosis
- 178 . Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. , 1993, Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis , *J Clin Microbiol* ; 31 : 175-8.
- 179 . Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et. al., 1997, The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* ; 3: 567-70.
- 180 . Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et. al., The resurgence of tuberculosis : Is your laboratory ready ? *J Clin Microbiol* 1993; 31:767-70.
- 181 . Terakubo S, Takemura H, Yamamoto H, Ikejima H, Kunishima H, Kanemitsu K, Kaku M, Shimada J. Antimicrobial activity of everminomicin against clinical isolates of *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and *Streptococcus* spp. tested by Etest. *J Infect Chemother.* 2001 Dec;7(4):263-6
- 182 . Theuer CP, Hopewell PC, Elias D, et. al., 1990, Human Immunodeficiency virus infection in tuberculosis patients, *J Infect Dis*; 162 : 8-12.
- 183 . Thierry D , Chureau C, Aznar C, Guesdon JL, 1990, The detection of *Mycobacterium tuberculosis* in cultured clinical specimens using the polymerase chain reaction and a non-radioactive DNA probe , *Mol Cell Probe* ; 6 : 181-91.
- 184 . Thomas D, Michael TM , 1991, *Biology of Microorganisms*. 6th ed. New Jersey : Prentice Hall, Englewood Cliffs, 785-7.
- 185 . Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

- 186 . Timpe A, Runyon EH, 1954 , Relationship of 'atypical' acid fast bacilli to human disease, J Lab Clin Med , 44: 202-9.
- 187 . Tortoli E, Mattei R, Savarino A, Bartolini L, Beer J, Comparison of mycobacterium tuberculosis susceptibility testing performed with BACTEC 460TB (Becton dickinson) and MB/BacT (Organon teknika) systems. Diagn Microbiol Infect Dis 2000 Oct;38(2):83-6
- 188 . Tsukamura M , 1976 , Numerical classification of slowly growing mycobacteria., Int J Syst Bacteriol , 26 : 409-20.
- 189 . Tsukamura M , Mizuno S, Murata H, 1979 , Numerical analysis of relationships among Mycobacterium tuberculosis, M. africanum, M. bovis and M. microti , Kekkaku , 54 : 491-8.
- 190 . Tsukamura M , Shimoide H , Kita N , et al., 1984 , Relationship between prevalence rate nontuberculous lung mycobacteriosis and prevalence rate of active lung tuberculosis. Geographic difference of the prevalence rate of nontuberculous lung mycobacteriosis , Kekkaku , 59 : 105-13.
- 191 . Tsukamura M, Kita N , Shimoide H , et al., 1985 , Studies on the lung disease due to nontuberculous mycobacteria in Japan. Kekekaku , 60 : 299-308.
- 192 . UNAIDS/APICT, 2000, Regional statistics : 1999 Year End Stats, Get a Picture; 2(1):8.
- 193 . Van der Giessen JWB, Haring RM, Van der Zeijst BAM. 1994, Comparison of the 23S ribosomal RNA gene and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related Mycobacterium avium and Mycobacterium paratuberculosis and the fast growing Mycobacterium phlei., Microbiol. ; 140 : 1103-8.
- 194 . Vaneechoutte M, van Eldere J, 1997, The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology, J Clin Microbiol; 46 : 188-94.
- 195 . Waite RT, Woods GL, Evaluation of BACTEC MYCO/F lytic medium for recovery of mycobacteria and fungi from blood. J Clin Microbiol 1998 May;36(5):1176-9
- 196 . Wayne LG ,1982 , Microbiology of tubercle bacilli., Am Rev Respir Dis, 125 (3 part 2) : 31-41.
- 197 . Wayne LG, 1967, Selection of characters for Adansonian analysis of mycobacterial taxonomy, J Bacteriol , 93(4) : 1382-91.
- 198 . Wayne LG, 1974 , Simple Pyrazinamide and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Res Dis; 109: 147-51
- 199 . Wayne LG, Kubica GP, 1986, The Mycobacteria. In : Sneath PHA, Mair NS, et al. eds. Bergey's manual of systemic bacteriology, 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1436-57.
- 200 . White RG, Bernstoch L, Johns RGS, Lederer E, 1958 , The influence of components of M. tuberculosis and other mycobacteria upon antibody production to ovalbumin, Immunology; 1: 54.
- 201 . WHO , 1993 , Tuberculosis Programme. Treatment of tuberculosis , Guidelines for National Programme, WHO.
- 202 . WHO , 1994a , TB-A Global Emergency , World Health Organization , Geneva (WHO/TB/94.177).

- 203 . WHO , 1996, WHO Tuberculosis Programme : Framework for effective tuberculosis control, Document WHO/22. : 21 March
- 204 . WHO Report , 2002, Country profile : Thailand TB control within the health care system.
- 205 . Wolinsky E , 1979, Nontuberculous mycobacteria and associated diseases , Am Rev Respir Dis , 119 : 107-37.
- 206 . Wongwatana S, Sriyabhaya N , 1992 , Nontuberculous mycobacterial infection of the lung in a chest hospital in Thailand., J Med Assoc Thai Jan;75(1):1-10.
- 207 . World Health Organization , 1994c , Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) – Data as at 30 June 1994 , Wkly Epidemiol Rec , 69 : 189-96.
- 208 . Yajko DM, Sanders CA, Madej JJ, Cawthon VL, Hadley WK, 1996, In vitro activities of rifabutin, azithromycin, ciprofloxacin, clarithromycin, clofazimine, ethambutol, and amikacin in combinations of two, three, and four drugs against Mycobacterium avium, Antimicrob Agents Chemother,40(3):743-9.
- 209 . Yanai H, et. al. 1999, Anti-tuberculosis drug resistance in an HIV epidemic province, Thailand. Global Meeting INCLIN XVI Bangkok, Thailand March 1999. <http://www.inclen.org/research/page2.html>
- 210 . Youmans G. Tuberculosis, In : Youmans G,ed. Tuberculosis.Philadelphia:WB Saunders Company, 1979:1-8
- 211 . Young WD Jr, Maslansky A, Lefar MS, Kronish DP,1970, Development of a paper strip test for detection of niacin produced by mycobacteria, Applied Microbiology; 10: 939-45.
- 212 . Youngchaiyud U, Priyanonda B, Visudhiphan S, Nuchprayoon C, Chantarakul N. Disseminated cutaneous abscesses caused by atypical mycobacterium. Report of 2 cases. J Med Assoc Thai. 1983 Sep;66 (9):551-7
- 213 . Zakowski P, Gligel S , Berlin G , et al., 1982 , Disseminated Mycobacterium avium-intracellulare infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency , JAMA , 248 : 2980.
- 214 . กองระบาดวิทยา, สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, พ.ศ. 2545 จำนวนผู้ป่วยเอดส์ จำแนกตามโรคติดเชื้อฉวยโอกาส, ประเทศไทย ระหว่าง กันยายน พ.ศ. 2527 - 31 ตุลาคม พ.ศ. 2545. <http://203.157.19.193/aids/Aidstab7.html>.
- 215 . กองวัณโรค, พ.ศ. 2540, Management of Tuberculosis Modified WHO modules of managing tuberculosis at District Level, ยุทธิชัย เกษตรเจริญ, เพชรวรรณ พึ่งรัมย์ , แพล และ เวียงเวียง, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- 216 . กองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข , แนวทางการให้คำแนะนำในเรื่องวัณโรค สำหรับผู้ให้บริการศึกษาด้านสุขภาพ, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- 217 . กองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข , พ.ศ. 2541, วัณโรคกับแนวทางสังคมสงเคราะห์ , โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- 218 . กองวัณโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข, พ.ศ. 2542, “วัณโรค”. คู่มือปฏิบัติงานเรื่องการเร่งรัดงานวัณโรคในสถานการณั้ระบาดของโรคเอดส์.

- 219 . กองวันโรค, พ.ศ. 2539 ,รายงานประจำปีงบประมาณ 2528-2539 กองวันโรค กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข.
- 220 . จุฬามณี สุทธิสีสังข์ และคณะ."โรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์" ยาใหม่ในประเทศไทยเล่ม 7 กันยายน 2540:148-163
- 221 . เจริญ ชูโชติถาวร , พ.ศ. 2543, New antituberculosis drug and anti-NTM susceptibility testing. ใน: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ (บรรณาธิการ) , การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค: การประยุกต์ทางคลินิกเพื่อการพัฒนาายาใหม่, Training, Publication and public Relations Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: กรุงเทพฯ ฯ
- 222 . เจริญ ชูโชติถาวร, พ.ศ. 2542, การวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการและการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรค.ใน: บัญญัติ ปริชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ(บรรณาธิการ), วัณโรค , พิมพ์ครั้งที่ 4 , โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ : 171-194
- 223 . ชัยเวช นุชประยูร, พ.ศ. 2542, เชื้อวัณโรค. ใน : บัญญัติ ปริชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ (บรรณาธิการ) , วัณโรค, พิมพ์ครั้งที่ 4 , โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ : 150-170.
- 224 . ชัยเวช นุชประยูร, ทัศนีย์ นุชประยูร, พ.ศ. 2542, มัยโคแบคทีเรียอื่นที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค, ใน : บัญญัติ ปริชญานนท์ , ชัยเวช นุชประยูร , สงคราม ทรัพย์เจริญ (บรรณาธิการ) , วัณโรค , พิมพ์ครั้งที่ 4 , กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . 222-52.
- 225 . ณิชยา อมาตยกุล, มาณพ คำนวนคุณ, เจริญ ชูโชติถาวร, พ.ศ. 2541, ความชุกของการติดเชื้อ วัณโรคในผู้ป่วยวัณโรคที่มีการติดเชื้อไวรัสโรคเอดส์ของโรงพยาบาลโรคทรวงอก, วัณโรคและโรคทรวงอก; 9 (เมษายน-มิถุนายน): 73-80.
- 226 . ทศนา พลิวเสรี , พ.ศ. 2542, การศึกษาเปรียบเทียบวัณโรคปอดที่ตรวจเสมหะไม่พบเชื้อและมีผลไม่มี การติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย ในศูนย์วัณโรคเขต 10, เชียงใหม่, วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก ปีที่ 20 ฉบับที่ 4 (ตุลาคม - ธันวาคม); 237-298.
- 227 . เทอดศักดิ์ พรหมณะนันท์, พ.ศ. 2543, Antituberculosis Drug Resistance: Genetic and Physiologic Mechanisms. ใน: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ (บรรณาธิการ), การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค: การประยุกต์ทางคลินิกเพื่อการพัฒนาายาใหม่, Training, Publication and public Relations Unit , National Center for Genetic Engineering and Biotechnology : กรุงเทพฯ ฯ : 55-70
- 228 . นพมาศ วงศ์วิทย์เดชา , พ.ศ. 2538, Aminoglycoside. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล,กรุงเทพฯ.
- 229 . นลินี อัสวโกตี."ยาปฏิชีวนะกลุ่มmacrolide".วารสารโรคติดเชื้อและยาต้านจุลชีพ.4(ตุลาคม –ธันวาคม 2533):209-217.
- 230 . บัญญัติ ปริชญานนท์ , พ.ศ. 2542, การรักษาวัณโรคปอด. ใน: บัญญัติ ปริชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ (บรรณาธิการ), วัณโรค, พิมพ์ครั้งที่ 4 , โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ : 343-409.
- 231 . บุญมี สถาปัตยวงศ์. "New macrolide" สมามคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย. (กุมภาพันธ์ 2541):115-127.

- 232 . บุญบา ชัยมณี, วิชัย ทานิช, พัชรีย์ ขันดีพงษ์, และ คณะ, พ.ศ. 2537, การอยู่รอดภายในหนึ่งปีแรกหลังการวินิจฉัยของผู้ป่วยวัยโรคที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์และไม่ติดเชื้อไวรัสเอดส์, จ.เชียงใหม่, วารสารวัยโรคและโรคทรวงอก, 237-298.
- 233 . ประทีน จาดताल, สุขสันต์ จิตติมณี, ศิริรักษา วิงมณี, พ.ศ. 2540, “ความสัมพันธ์ของการศึกษาปฐมภูมิต่อการตอบสนองการรักษาด้วยระบบยาระยะสั้นในผู้ป่วยวัยโรครายใหม่”. วัยโรคและโรคทรวงอก; 18 (เมษายน-มิถุนายน): 91-101.
- 234 . ป่านเทพ สุทธินนท์ , 2542 , กำเนิดพยาธิ และพยาธิสภาพของของวัยโรคปอดและความสัมพันธ์กับโรคเอดส์ , ใน : บัญญัติ ปริชญานนท์ , ชัยเวช นุชประยูร , สงคราม ทรัพย์เจริญ (บรรณาธิการ) , วัยโรค , พิมพ์ครั้งที่ 4 , กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . 266-81.
- 235 . แผ่นพับโครงการธรรมรักษ์นิเวศน์, โครงการธรรมรักษ์นิเวศน์ ,มูลนิธิธรรมรักษ์ วัดพระบาทนันทุ จังหวัดลพบุรี
- 236 . พนิดา ชัยเนตร , มาลัย วรจิตร.“การทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ”.การใช้ห้องปฏิบัติการใน การเลือกยารักษาโรคติดเชื้อ.2525:23-59
- 237 . พรรณกร อัมวิทยา, จุรี เขียนนัยศิลาวงศ์, 1991, ราววยโอกาสในผู้เอดส์, ใน : พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ, เอชไอวี และ จุลชีพหายโอกาส, อักษรสมัย กรุงเทพฯ.14.18-14.21.
- 238 . พรรณกร อัมวิทยา, ชงค์ รงค์รุ่งเรือง, 1991, ราววยโอกาสในผู้เอดส์, ใน : พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ, เอชไอวีและ จุลชีพหายโอกาส, อักษรสมัย กรุงเทพฯ.14.21-14.44.
- 239 . พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ , พ.ศ. 2541, ชีวิตวิทยาทั่วไปของเชื้อ เอชไอวี, ใน: พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ(บรรณาธิการ), เอชไอวี และจุลชีพหายโอกาส, อักษรสมัย, กรุงเทพฯ : 2.1-2.50.
- 240 . ภาสกร อัครเสวี, พ.ศ. 2542, ระบาดวิทยาและแนวโน้มของวัยโรคในประเทศไทย. ใน : บัญญัติ ปริชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ(บรรณาธิการ), วัยโรค , พิมพ์ครั้งที่ 4, โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ :31-63.
- 241 . ภาสกร อัครเสวี, พ.ศ. 2543, วัยโรคคือยาผลกระทบสำคัญต่ออนาคตการควบคุมวัยโรคในประเทศไทย : การทดสอบความไวต่อยาด้านวัยโรค. ใน: ประสิทธิ์ ผลิตผลการพิมพ์ (บรรณาธิการ), การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัยโรค: การประยุกต์ทางคลินิกเพื่อการพัฒนาใหม่, Training, Publication and public Relations Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: กรุงเทพฯ ฯ: 1-6.
- 242 . มาลัย วรจิตร, 1991, แบบคที่เรียกชื่อโรคในผู้ติดเชื้อเอชไอวี, ใน : พิไลพันธ์ พุฒวัฒนะ, เอชไอวีและ จุลชีพหายโอกาส, อักษรสมัย กรุงเทพฯ.12.1-12.8.
- 243 . มาลิน จุลศิริ. “ ชนิดของยาปฏิชีวนะ”. ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์,พิมพ์ครั้งที่2: โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการ สาธารณสุขอาเซียน,2540:33-55)
- 244 . ยุทธิชัย เกษตรเจริญ,พ.ศ.2542,“การวินิจฉัยวัยโรค.”, ใน: บัญญัติ ปริชญานนท์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ(บรรณาธิการ),วัยโรค,พิมพ์ครั้งที่ 4, โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,กรุงเทพฯ:326-342.

- 245 . วัลลภ ปายะนันท์ , พ.ศ. 2542 , แผนงานวัณโรคของประเทศไทย ยุทธศาสตร์ใหม่ ในสถานการณ์ระบาดของโรคเอดส์, ใน: บัญญัติ ปริญญาพันธ์, ชัยเวช นุชประยูร, สงคราม ทรัพย์เจริญ (บรรณาธิการ), วัณโรค, พิมพ์ครั้งที่ 4, กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 92-116.
- 246 . วิจิตรา ปราณสุจริต, มาณพ คำนวนคุณ, พ.ศ. 2540, การใช้วิธีตรงตรวจหาการคือยามาตราฐานเพื่อประเมินผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรคระยะแพ้เชื้อ, โรงพยาบาลโรคทรวงอก. 2 (กันยายน-ธันวาคม) : 20-28.
- 247 . สมณีย์ สุขรุ่งเรือง, อังคณา ฉายประเสริฐ, 1991, ราววยโอกาสในผู้เอดส์, ใน : พิไลพันธ์ พุชวัฒนะ, เอชไอวี และ จุลชีพราววยโอกาส, อักษรสมัช กรุงเทพมหานคร.14.1-14.18.
- 248 . ศรีประพา เนตรนิมม, ลออ สงวนวิทย์, คารณิ วิริยกิจจา, พ.ศ. 2540 , การศึกษาเปรียบเทียบผลการรักษาผู้ป่วยวัณโรคปอดที่ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรคในเสมหะด้วยระบบยาระยะสั้น 4 ถึง 6 เดือน, วัณโรคและโรคทรวงอก; (เมษายน) : 285-294.
- 249 . ศุภชัย อุภษาม, พ.ศ. 2534 , สรุปสถานการณ์โรคเอดส์ในประเทศไทย : อภิปรายหมู่เรื่อง “โรคเอดส์และวัณโรค” การประชุมสัมมนาวิชาการวัณโรคระดับชาติ ครั้งที่ 3, 4-5 พฤศจิกายน 2534.
- 250 . ศูนย์เอกสารองค์การอนามัยโลก, สำนักวิชาการสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข, พ.ศ. 2540, การรักษาวัณโรค แนวทางสำหรับแผนงานระดับชาติ. บริษัท พรอนโท กราฟฟิค ดีไซน์ จำกัด, กรุงเทพฯ.
- 251 . สมถวิล ทัทพะวัฒนะ , สุรพงษ์ หุตะเสธณี , บังอร ดันติกุล และคณะ , พ.ศ. 2540, การคือข้ามระหว่างยาไอฟลอกซาซินและซิโปรฟลอกซาซินในเชื้อวัณโรค , วัณโรคและโรคทรวงอก ; (กันยายน) : 19-24.
- 252 . สมศักดิ์ โล่ห์วีระ, พ.ศ. 2530, ยานในกลุ่มควิโนโลน, เกสัชวิทยา 9 , กุมภาพันธ์ : 31-39.
- 253 . สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข , สมาคมอุรเวชช์แห่งประเทศไทย , พ.ศ. 2539 , แนวทางการวินิจฉัยและการรักษาวัณโรคในประเทศไทย , สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทยฯ.
- 254 . สำนักกระบวนวิชา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, พ.ศ. 2544 ข้อมูลโรคที่เฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำเดือน (<http://epid.moph.go.th/epi31.html>)
- 255 . สิทธิเทพ ชนกิจจารุ, พูนเกษม เจริญพันธุ์, สุมาลี เกียรติบุญศรี และคณะ, พ.ศ. 2539, วัณโรคที่คือยาหลายขนาน (MDR-TB) ในโรงพยาบาลรามาริบัติ: สถานการณ์ปัจจุบัน, วัณโรคและโรคทรวงอก; 17 (กรกฎาคม-กันยายน) : 210-215.
- 256 . สุพล เกาะเรียนอุดม , พ.ศ. 2539, การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเอดส์, พิมพ์ครั้งที่ 1, โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ .
- 257 . สุมาลัย สาระชา,ม.ล. , พ.ศ. 2533, เกสัชวิทยาของยารักษาวัณโรค, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ .
- 258 . สุรินทร์ พลเสน, พ.ศ. 2538, ยารักษาวัณโรค, เกสัชวิทยา, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล,กรุงเทพฯ .
- 259 . อุไร พุ่มพุกภัย, ธีรญา อมาตยกุล, พ.ศ. 2533, ผลการตรวจเสมหะในผู้ป่วยวัณโรคในโรงพยาบาลโรคทรวงอก, วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก, 79-89.

ภาคผนวก

สรุปผลการดำเนินงานโครงการตามแผนงานโดยสรุป ในช่วง ตั้งแต่วันที่ ตุลาคม 2543 ถึงวันที่ พฤศจิกายน 2545

กิจกรรม(ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ระยะเวลาในการดำเนินการ / ผลการดำเนินงาน	หมายเหตุ
<ul style="list-style-type: none"> ■ เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย ■ จัดกลุ่มผู้ป่วย และ ทำทะเบียนประวัติผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการ 	<ul style="list-style-type: none"> ■ เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย 100-500 คน ประมาณ 300 ตัวอย่าง ในระยะเวลา 6 เดือน ■ ทำแบบสอบถามประวัติ และใบยินยอมสำหรับผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการเพื่อจัดกลุ่มผู้ป่วย และ ทราบประวัติการเจ็บป่วย และประวัติการรับยารักษาวัณโรค 	<p>1 ตุลาคม 2543 -ธันวาคม 2544 (14 เดือน)</p> <p>เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย 278 คน 822 ตัวอย่าง</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. สรุปช่วงอายุผู้ป่วยในบทที่3 2. อาการทางคลินิกของวัณโรค ในบทที่3 3. สรุปประวัติการรับยารักษาวัณโรคในบทที่3 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> species - ทำการตรวจ AFB จากเสมหะ - ทำการเพาะเชื้อจากเสมหะ โดย Conventional method - ขึ้นชั้นผลการแยกวินิจฉัยโดย PCR-REA 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> species ■ เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับการเชื่อม ■ เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับประวัติ ■ เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับอัตราการเสียชีวิต 	<p>ผลการทดลอง แสดงในบทที่ 3 และ บทที่ 4</p>	

กิจกรรม(ตามแผน)	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ระยะเวลาในการดำเนินการ / ผลการดำเนินการ	หมายเหตุ
<ul style="list-style-type: none"> ■ เจาะเลือดจากผู้ป่วย 5 ml นำส่งในขวด BACTEC Myco/F lytic culture system ■ จัดกลุ่มผู้ป่วย และ ทำเพาะเชื้อบนประวัติผู้ป่วยที่เข้าร่วม โครงการ 	<ul style="list-style-type: none"> ■ เจาะเลือดจากผู้ป่วย 100 คน ในระยะเวลา 6 เดือน ■ ทำแบบทดสอบประวัติ และ ใบยินยอมสำหรับผู้ป่วย ที่เข้าร่วมโครงการ เพื่อจัดกลุ่มผู้ป่วยและทราบประวัติการเจ็บป่วยและการรับยาต้านวัณโรค 	<p>1 ตุลาคม 2543 - ธันวาคม 2544 (14 เดือน)</p> <p>เจาะเลือดจากผู้ป่วยเพิ่มเป็น 181 คน</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. สรุปช่วงอายุผู้ป่วยในบทที่3 2. อาการทางคลินิกของวัณโรค ในบทที่3 3. สรุปประวัติการรับยาต้านวัณโรคในบทที่3 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> species ในhemoculture <ul style="list-style-type: none"> - แยกวินิจฉัยเชื้อจาก hemoculture โดย Conventional method - แยกวินิจฉัยโดย PCR-REA 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อ <i>Mycobacterium</i> species ■ เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับประวัติ ■ เปรียบเทียบผลการเพาะเชื้อกับอัตราการเสียชีวิต 	<p>ผลการทดลอง แสดงในบทที่ 3 และ บทที่ 4</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราใน hemoculture 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ตรวจสอบเชื้อ แบคทีเรีย และเชื้อรา 	<p>ผลการทดลอง แสดงในบทที่ 3 และ บทที่ 4</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ■ ทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ■ ควบคุมคุณภาพการทดสอบความไวต่อ ยานวัณโรค กับ Reference Lab 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคของเชื้อ TB ที่แยกได้ ■ เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อ ยานวัณโรคกับยากลุ่มวัณโรค 	<p>ผลการทดลอง แสดงในบทที่ 3 และ บทที่ 4</p>	
<ul style="list-style-type: none"> ■ ทดสอบความไวต่อยา Clarithromycin 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ทดสอบความไวต่อยา clarithromycin ของ MAC ที่แยกได้ 	<p>ผลการทดลอง แสดงในบทที่ 3 และ บทที่ 4</p>	