บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

วัณโรค(TuberculosisหรือTB) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium* หลายชนิด ที่พบบ่อยที่สุดและเป็นปัญหาในประเทศไทย คือ *M. tuberculosis* ส่วน *M. bovis* มักก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งอาจติดต่อมาถึงคนได้ เชื้อ *Mycobacterium* ทั้ง 2 ชนิดเป็นสปีซีส์หลักของ *M. tuberculosis* complex หรือเรียกว่า Tubercle bacilli (1) เมื่อนำตัวอย่างเสมหะหรือตัวอย่างอื่นๆ ที่มี *Mycobacterium* มาตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (หลังจากเสมียร์เสมหะ ย้อมด้วยสี carbol fuchsin และล้างด้วยสารละลายกรด) เชื้อ Tubercle bacilli และ *Mycobacterium* สปีซีส์ต่าง ๆ จะติดสีแดงเพราะทนต่อการล้างด้วยกรด เรียกว่า Acid fast bacilli (AFB) จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกเมื่อปี ค.ศ. 2008 ประเทศไทยถูกจัดอยู่ในอันดับที่ 18 ในกลุ่ม 22 ประเทศที่มีปัญหาวัณโรค จากการคำนวณทางระบาดวิทยาในรายงานขององค์การอนามัยโลก คาดการณ์ว่าประเทศไทยน่าจะมีผู้ป่วยรายใหม่ทุกประเภทปีละ 90,000 ราย (142 ต่อแสนประชากร) และประมาณ 40,000 ราย เป็นผู้ป่วยที่มีผลเสมหะเป็นบวก (62 ต่อแสนประชากร) แต่ละปีจะมีผู้ติดเชื้อใหม่ประมาณ 8 ล้านคนและเสียชีวิตประมาณ 3 ล้านคนต่อปี (2, 3)

โรงพยาบาลจะนะเป็นโรงพยาบาลชุมชนขนาด 60 เตียง ในอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา แผนกชันสูตร มีบุคลากร 6 คน เป็นนักเทคนิคการแพทย์ 2 คน เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3 คน และเป็นพนักงานห้องปฏิบัติการ 1 คน จำนวนประชากรในอำเภอจะนะมีประมาณ 90,730 คนเฉลี่ยจำนวนผู้มารับบริการที่โรงพยาบาลแห่งนี้ 350คนต่อวันโดยมีผู้ป่วยรับบริการที่งานชันสูตรเพื่อการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในเสมหะเฉลี่ย 126 ตัวอย่างต่อเดือนจากข้อมูลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคของโรงพยาบาลจะนะย้อนหลัง 3 ปี พบว่ามีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรค และได้รับยารักษาวัณโรคโดยผลจากการตรวจเสมหะที่ย้อม AFB มีทั้งผลบวกและผลลบ (ดังตารางที่ 1) โดยรายที่ตรวจไม่พบ AFB แต่แพทย์ได้วินิจฉัยจากผลการตรวจทางรังสี X-Ray พบจุดที่ปอดและผู้ป่วยมีอาการสัมพันธ์กับการเป็นวัณโรคปอด การตรวจ AFB ที่โรงพยาบาลจะนะในงานบริการประจำวันใช้วิธีป้ายจากเสมหะโดยตรง (Direct smear) ซึ่งเตรียมโดยใช้ไม้เขี่ยเสมหะแล้วป้ายลงบนแผ่นกระจกสไลด์โดยตรง วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถทำได้ในสถานบริการสาธารณสุขทุกระดับ ผลการตรวจพบเชื้อวัณโรคขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อในเสมหะซึ่งต้องมีมากพอควร ข้อเท็จจริงที่ควรตระหนักคือ การกระจายของเชื้อวัณโรคในเสมหะไม่เท่ากัน ดังนั้นการเลือกเขี่ยเสมหะมาป้ายบนกระจกสไลด์จึงสำคัญมาก ถ้าเขี่ยบริเวณที่ไม่มีเชื้อหรือมีเชื้อจำนวนน้อยมาป้าย ก็จะตรวจไม่พบหรือพบเชื้อได้ยาก จึงจำเป็นต้องเลือกเขี่ยส่วนที่น่าจะ

มีเชื้อมากที่สุดมาตรวจ คือ ส่วนที่เป็นก้อนเมือกเหนียว สีขุ่น สีเข้ม คล้ายหนอง จะมีโอกาสพบเชื้อได้ง่ายขึ้น (4)

การที่ได้ผลลบจากการย้อม AFB ในการตรวจเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคบางราย ทำให้การค้นหาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ด้วยการย้อม AFB มีประสิทธิภาพต่ำ ซึ่งทำให้โรคมีโอกาสแพร่ระบาดมากขึ้น จากรายงานการศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคในเสมหะของผู้ติดเชื้อ HIV เปรียบเทียบระหว่างวิธี Direct sputum smear AFB กับวิธี Concentration sputum smear AFB พบว่าวิธี Direct sputum smear AFB มีความไวต่ำกว่าวิธี Concentration sputum smear AFB (5) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากเสมหะ ด้วยวิธีการตกตะกอนเสมหะเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจโดยตรง ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคในเบื้องต้น เพื่อให้งานบริการมีคุณภาพดียิ่งขึ้น ช่วยทำให้การค้นหาผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาดของโรคต่อไป

ตารางที่ 1 จำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยารักษาวัณโรคที่โรงพยาบาลจะนะในช่วงเวลา 3 ปี

ผลการตรวจ AFB จากเสมหะ	ปี 2551	ปี 2552	ปี 2553
AFB Positive	32	39	38
AFB Negative	35	28	39
จำนวนตัวอย่างเสมหะที่ส่งตรวจทั้งหมด	1,516	1,466	1,720

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลการตรวจ AFB ในเสมหะโดยเปรียบเทียบวิธีป้ายจากเสมหะโดยตรงกับวิธีป้ายจากตะกอนเสมหะที่เตรียมด้วยวิธีเข้มข้น

3. ขอบเขตการศึกษา

ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยที่มารับบริการการตรวจ AFB ในเสมหะณ แผนกชันสูตรโรงพยาบาลจะนะ อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา ระหว่างวันที่ 1 มกราคม – 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2554 เป็นตัวอย่างเสมหะที่มีปริมาณไม่น้อยกว่า 3 มล. รวมจำนวน 500 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 230 ราย

4.ผลที่คาดว่าจะได้รับ

นำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อวัณโรคในงานบริการประจำวัน เพื่อให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น ทำให้ผู้ติดเชื้อได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่เริ่มแรกและได้รับการรักษาได้อย่างทันท่วงที ช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

5. ทบทวนเอกสาร

ความเป็นมาของวัณโรค

ตั้งแต่ Louis Pasteur ได้ค้นพบจุลชีพและตั้งทฤษฎีเชื้อโรคของโรคติดต่อ ทำให้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับโรคติดเชื้อมากขึ้น และเมื่อวันที่ 24 มีนาคม คศ.1882 Robert Koch ได้บรรยายการแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุของวัณโรค ในงานประชุมทางวิชาการของสมาคมสรีรวิทยาแห่งเบอร์ลิน (Berlin Physiological Society) (6) การค้นพบของ Koch เป็นการประกาศยุคแห่งความหวัง ต่อมามีการศึกษาทดลองต่างๆ จนเกิดความรู้มากมาย เช่น วิธีการเพาะแยกเชื้อสำหรับวินิจฉัยโรค การรักษาที่มีประสิทธิภาพ และการพัฒนาวัคซีนสำหรับใช้ป้องกันโรค

หลังจาก Louis Pasteur ค้นพบกฎของการใช้วัคซีนสร้างภูมิต้านทาน (Principle of vaccination) Calmette และGuerin ได้ผลิตวัคซีนสำหรับป้องกันวัณโรคโดยใช้เชื้อมัยโคแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกจากวัว (Bovine strain) วัคซีนนี้เรียกว่า Bacille Calmette-Guerin (BCG) (6) และได้มีการพัฒนาการผลิตโดยวิธี Freeze dried ซึ่งมีการทดลองและใช้กันอย่างแพร่หลาย

ในปี คศ.1950 มีการค้นพบสารเคมีที่ใช้รักษาโรคจากมัยโคแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและยังพบโรคที่เกิดจากมัยโคแบคทีเรีย สปีชีส์อื่นๆ คือ *M. ulcerans* และ *M. marinum*

ชื่อของเชื้อมัยโคแบคทีเรียม (*Mycobacterium)* ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Lehmann และ Neumann ในหนังสือ Atlas of Bacteriology ในปี คศ. 1896 ซึ่งมีเพียง 2 สปีชีส์คือ *Mycobacterium tuberculosis* และ *Mycobacterium leprae* คำว่า Mycobacterium หมายถึง แบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา ซึ่งมาจากการที่เชื้อนี้เจริญในอาหารเหลว มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวอาหารคล้ายเชื้อรา เชื้อสกุลนี้มีคุณสมบัติแตกต่างจากแบคทีเรียอื่นๆ คือ ย้อมติดสีได้ยาก แต่เมื่อติดสีแล้ว ก็ล้างออกยาก แม้จะล้างด้วยน้ำยาที่เป็นกรดอ่อน คุณสมบัตินี้เรียกว่า ความทนกรด เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีผนังเซลล์หนาและประกอบด้วยสารจำพวกไขมัน มีการเจริญเติบโตช้า และทนต่อการทำลายด้วยกรดและด่างได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

มัยโคแบคทีเรียที่ก่อโรคปอดในคน แบ่งตามคุณสมบัติในการสร้างสารสี (pigmentation) และความเร็วในการเจริญเติบโต (speed of growth) จัดได้เป็น 4 กลุ่มคือ (7)

1. Photochromogens

2. Scotochromogens

3. Non-chromogens

4. Rapid growers

กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็นเชื้อที่เจริญเติบโตช้า ใช้เวลาเกินกว่า 2 สัปดาห์

กลุ่มที่ 1 สร้างสารสีเหลืองในที่มีแสงสว่าง

กลุ่มที่ 2 สร้างสารสีเหลืองในที่มืด

กลุ่มที่ 3 ไม่สร้างสารสีทั้งในที่มืดและที่สว่าง

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่เจริญเร็ว มีนิคมให้เห็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 1 สัปดาห์

มัยโคแบคทีเรีย จำแนกตามอุณหภูมิที่เหมาะสม ในการเจริญเติบโต จัดเป็น 3 กลุ่มได้แก่

1. Thermophile เจริญได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า เช่น *M. avium, M. xenopi*

2. Mesophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส มัยโคแบคทีเรียส่วนมากจัดอยู่ในกลุ่มนี้

3. Psychophile เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าได้แก่ *M. fortuitum, M. phlei , M. smegmatis*

มัยโคแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน แบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (7)

1. T.B. complex (Tubercle bacilli complex) ได้แก่ *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M.micoti*

2. Atypical mycobacteria รวม *M. avium* ไว้ด้วยและจำแนกเป็นหมู่ใหญ่ตาม Runyon

3. เชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ได้แก่ *M. leprae*

T.B. complex มีความสามารถสูงในการก่อโรครุนแรง ส่วน Atypical mycobacteria มีความสามารถในการก่อโรคต่ำและยังไม่พบการก่อโรคโดยตรงในผู้ป่วย

รูปร่างลักษณะของเซลล์ (7)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยทั่วไปมีขนาดกว้าง 0.2-0.6 ไมโครเมตร ยาว 1.0-10 ไมโครเมตร มีผนังเซลล์หนา ไม่มีแคปซูล ไม่มีแฟลกเจลลา และไม่สร้างสปอร์ หากนำมัยโคแบคทีเรียมาย้อมสีแกรม จะติดสีแกรมบวก มัยโคแบคทีเรียประกอบด้วยไซโตพลาสซึม หุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีไขมันอีกชั้นหนึ่ง มีโครโมโซมสายเดียว ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส เป็นลักษณะของโปรคาริโอท (Prokaryote)

การเพาะเชื้อ (7)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต ชนิดที่เป็น Saprophyte เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่ชนิดอื่นๆ ต้องการอาหารที่มี แร่ธาตุซับซ้อน บางชนิดต้องการอาหาร พิเศษ คุณสมบัติที่แตกต่างกันนี้ มีผลต่อคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค แหล่งที่อยู่ อัตราเร็วในการเจริญเติบโต ตลอดจนคุณสมบัติในการเป็น แอนติเจน

ลักษณะทางชีวเคมี

ผนังเซลล์ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียมีความสลับซับซ้อนมาก ลักษณะที่สำคัญประการหนึ่งคือ มีไขมันสูงถึงประมาณร้อยละ 60 ของน้ำหนักและผนังเซลล์ ชั้นในสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ถัดจากชั้นเปปติโดไกลแคนออกมา เป็นชั้น arabinogalactan เป็น พอลีแซคคาไรด์ ประกอบด้วย arabinose และ galactose ปลาย arabinose จะจับกับกรดไขมันที่เป็นสายยาว เรียกว่า Mycolic acid ซึ่งเรียงกันเป็นสาย ๆ ขนานกันคล้ายมัดเชือก ช่วยเพิ่มความหนาของผนังเซลล์ และเป็นส่วนที่ทำให้เกิดคุณสมบัติทนต่อกรด

นิเวศน์วิทยาของมัยโคแบคทีเรีย (8)

เชื้อมัยโคแบคทีเรียอาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อม ชนิดที่เป็น Saprophytes มีเพียงบางสายพันธุ์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งมีชีวิต ผนังเซลล์มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เนื่องจากมีสารจำพวกไขมันมาก ชอบสภาวะที่เป็นกรดอ่อน พบได้ในสิ่งแวดล้อม ตามแหล่งชื้นแฉะ เช่นโคลน บ่อน้ำ แม่น้ำ ในบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับอากาศ โดยเชื้อจะได้ออกซิเจนจากอากาศและสารอาหารจากน้ำ เชื้อได้สารอาหารจากการย่อยสลายซากสิ่งมีชีวิต เช่นพืช และสัตว์

การสร้างสารสี (8)

มัยโคแบคทีเรียส่วนใหญ่สร้างสารสีได้ เช่น สีเหลือง ส้ม หรือบางชนิดอาจสร้างสารสีชมพู ไม่ว่าจะอยู่ในที่มืดหรือได้สัมผัสกับแสง สารนี้เป็นสารพวก carotenoids ซึ่งอาจแยกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่จับกับออกซิเจน และพวกที่ไม่จับกับออกซิเจน (oxygen containing xantophylls) สาร carotenoids นี้จะจับอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ เชื่อว่าสารนี้มีบทบาทในการป้องกันอันตรายจากแสงที่อาจมีต่อเซลล์ได้

คุณสมบัติการทนกรด (8)

คุณสมบัติการทนกรดหมายถึง ความสามารถของแบคทีเรียที่ไม่ถูกละลายสีที่ติดเซลล์ออกด้วยสารละลายกรดอ่อนๆ หลังย้อมด้วยสีที่เป็นเบสิค (basic dyes) คุณสมบัตินี้ไม่ใช่มีเฉพาะในมัยโคแบคทีเรียเท่านั้น แต่ยังพบในเชื้อชนิดอื่น เช่น *Nocardia* และ *Corynebacterium* บางชนิด นอกจากนี้อาจพบในสปอร์ อย่างไรก็ตาม นิยมใช้คุณสมบัตินี้ในการวินิจฉัยเชื้อมัยโคแบคทีเรีย

เชื้อวัณโรค (Tubercle bacilli) (8)

เชื้อวัณโรค เดิมหมายถึงเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน วัว ควาย สัตว์แทะ และสัตว์ปีก โดยเรียกรวมกันเป็น *Mycobacterium tuberculosis* varieties ต่างๆ ตามคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค คือ *M. tuberculosis var. hominis* เป็นเชื้อวัณโรคในคน *M. tuberculosis var. bovis* เป็นเชื้อวัณโรคในวัวควาย *M. tuberculosis var. microti* เป็นเชื้อวัณโรคในสัตว์แทะ และ *M. tuberculosis var. avium* เป็นเชื้อวัณโรคในสัตว์ปีก เนื่องจากเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีคุณสมบัติทางชีวเคมีและการก่อโรคที่แตกต่างกันชัดเจน จึงมีการแยกออกเป็นจำเพาะกลุ่ม แต่ในปัจจุบันคำว่า tubercle bacilli หรือ tuberculosis complex หมายถึงเชื้อมัยโคแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum* และ *M. microti* สำหรับ *M. avium* นั้นมีการจัดไว้ในกลุ่มของ atypical mycobacteria ด้วยเหตุผลคือเป็นกลุ่มที่ไม่ก่อโรคในคน (Wayne 1982 (8)

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคในคน โรคนี้ในอดีตเป็นโรคที่ทำให้คนเสียชีวิตมากเป็นอันดับหนึ่ง ผู้ที่ค้นพบเชื้อนี้เป็นคนแรกคือ Robert Koch โดยเขาได้ประกาศการค้นพบเชื้อนี้ในที่ประชุมสมาคมสรีรวิทยาแห่งเบอร์ลิน ในปี คศ. 1882 เขาย้อมพบเชื้อในเสมหะของผู้ป่วย และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้บริสุทธิ์ใน coagulate serum และสามารถพิสูจน์ว่าเชื้อที่เขาพบเป็นสาเหตุของโรค โดยการฉีดเชื้อที่ได้เข้าไปในสัตว์ทดลอง เช่นกระต่าย หนูตะเภา ทำให้เกิดโรคในสัตว์ทดลองและแยกเชื้อบริสุทธิ์คืนจากสัตว์ทดลองที่เป็นโรคได้

รูปร่างลักษณะของเชื้อ (8)

เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นเชื้อแบคทีเรียทรงแท่งบาง อาจโค้งเล็กน้อย ความกว้างประมาณ 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 2 ถึง 4 ไมโครเมตร บางครั้งการย้อมสีทนกรดอาจติดสีไม่สม่ำเสมอ ดูคล้ายเป็นเม็ดๆ (bead) เรียงต่อกัน ส่วนที่ติดสีเกิดจาก granule ในขณะที่ส่วนที่ไม่ติดสีเกิดจาก vacuole ภายในเซลล์ เชื้อมักจะอยู่รวมกันเป็นมัดๆ คล้ายฟั่นเชือกที่เรียกว่า serpentine cords สารประกอบของเซลล์ที่สำคัญได้แก่

1. ไขมันชั้นนอกสุด มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 60 ของน้ำหนักแห้ง ทำให้เชื้อมีคุณสมบัติในการติดสียาก ทนต่อ acid alcohol สารเคมีทั้งกรดและด่าง ตลอดจนทนต่อปฏิกิริยาแอนติบอดีและคอมพลีเม้นต์
2. กรดมัยโคลิค (mycolic acid) เป็นสารที่พบเฉพาะในเชื้อมัยโคแบคทีเรีย *Nocardia* และ *Corynebacterium* เท่านั้น กรดมัยโคลิคเป็นสารพวก alpha-alkyl, beta-hydroxyl fatty acid ที่อิ่มตัว พบได้ทั้งในชั้นของไขมันและไกลโคลิปิดเป็นตัวเชื่อมระหว่างชั้นของไขมันกับชั้นผนังเซลล์

3. คอร์ดแฟกเตอร์ เป็นสารที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรครุนแรงของเชื้อ สามารถสกัดโดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ มีโครงสร้างเป็น 6, 6-dimycolyltrehalose เหตุผลที่เชื่อว่าคอร์ดแฟกเตอร์เกี่ยวข้องกับการก่อโรครุนแรง เพราะสารนี้สามารถยับยั้งการเคลื่อนไหวของเม็ดเลือดขาวชนิดโพลิมอร์โฟนิวเคลียร์ พบสารนี้มากในเชื้อที่ก่อโรครุนแรง ตลอดจนสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิต้านทานในหนูไมซ์ได้ (8)
4. **การเพาะเชื้อ**

M. tuberculosis เป็นแบคที่เรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 37องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เจริญบนอาหารที่มีกลีเซอรอล หรือสารประกอบอื่นเป็นแหล่งคาร์บอน และมีเกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้อาจเติมกรดอะมิโนแอสปาราจีนหรือกรดอะมิโนผสม เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 6.4 ถึง 7.0 การเจริญทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในร่างกายคนจะเป็นไปอย่างช้าๆ ช่วงเวลาที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า (proliferation time) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์ เท่ากับ 15-20 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ก่อโรค จะเจริญได้เร็วกว่านี้ แต่ช้ากว่าแบคทีเรียทั่วไปมาก ซึ่งใช้เวลาเป็นสัปดาห์จึงจะสังเกตเห็นนิคมของเชื้อ ปัจจัยสำคัญของการเจริญเติบโตคือ activity ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทวีจำนวนของเชื้อวัณโรค คือ DNA dependent-RNA polymerase

นิคมบนอาหารแข็ง มีลักษณะกลมนูน หนา ผิวเป็นเม็ดหรือเหี่ยวย่น มีสีขาวหรือเหลืองอ่อน ถ้าเลี้ยงในอาหารเหลวจะพบลักษณะเป็นเม็ดที่ผิวอาหาร เมื่ออายุมากขึ้นนิคมจะหนา และเหี่ยว นิคมของสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง ผิวมักจะหยาบขรุขระ ส่วนสายพันธุ์ที่ก่อโรคไม่รุนแรงนิคมจะขรุขระน้อยกว่า เชื้อถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนหรือขบวนการพาสเจอร์ไรส์ แต่ทนทานต่อสารเคมีและความแห้งแล้ง เชื้อวัณโรคเจริญได้ดีขึ้นถ้าในบรรยากาศ มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 6-8 เกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ ได้แก่ สังกะสี, ฟอสฟอรัส, แมกนีเซียม และเหล็ก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซีรัม ควรเติมแร่เหล็กเนื่องจากในซีรัมมี transferin ซึ่งสามารถจับเหล็กได้ ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขาดเหล็กได้ ขบวนการเมตาบอลิสมของเชื้อวัณโรคเป็นแบบเดียวกับแบคทีเรียอื่นๆ มีการใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานโดยขบวนการ Embden-Meyerhof (EMP) และpentose phosphate pathway มี tricarboxylic acid cycle (TCA) มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเปอร์ออกซิเดส สำหรับกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจากขบวนการหายใจ

Mycobacteriophage

เชื้อวัณโรคมีแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีพันธุกรรม ดีเอ็นเอสายคู่ มีปริมาณ G+C คล้ายกับดีเอ็นเอของเชื้อ *M. tubercolosis* โครงสร้างของฟาจประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหางโดยส่วนหัวเป็นรูปไข่หรือหกเหลี่ยมส่วนหางยาวนอกจากนี้มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ บางชนิดมีฟอสโฟลิพิดด้วย ฟาจของ *M. tubercolosis* มี 4 ฟาจทัยป์ คือ A, B, C และ I *M. tubercolosis* ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่จัดอยู่ในฟาจทัยป์ A สำหรับในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ พบฟาจทัยป์ B ร่วมด้วย ในสหรัฐอเมริกาพบทั้งฟาจทัยป์ A, B และ C ส่วนในอินเดียพบฟาจทัยป์ A และI ฟาจทัยป์ต่างๆเหล่านี้ค่อนข้างคงตัว แม้แบคทีเรียมีการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ดื้อยา แต่ฟาจทัยป์ส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้จำแนกมัยโคแบคทีเรียโดยฟาจทัยป์ออกเป็น 8 ทัยป์ คือทัยป์ 1- 8 ประโยชน์สำคัญของฟาจทัยป์คือ ใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามแหล่งแพร่เชื้อของวัณโรคและติดตามการระบาดของเชื้อวัณโรคในชุมชนโดยอาศัยหลักว่าถ้าเชื้อมาจากแหล่งเดียวกันจะมีฟาจทัยป์เดียวกัน นอกจาก นี้ยังช่วยระบุผู้ป่วยว่าได้รับเชื้อใหม่หรือเป็นการติดเชื้อซ้ำจากเชื้อเดิม และ ช่วยยืนยันการติดเชื้อของทารกจากมารดาได้ด้วย

ลักษณะของแอนติเจน

เมื่อตรวจแยกแอนติเจนของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟี่ร่วมกับ immuno-diffusion พบว่า *M. tuberculosis* มีแอนติเจนไม่น้อยกว่า 20 ชนิด บางชนิดพบเฉพาะในสปีซีส์ *M. tubercolosis* บางชนิดพบในมัยโคแบคทีเรียอื่น หรือพบใน *Nocardia* และ *Corynebacterium* สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ปรากฏอยู่ในผนังเซลล์ มีทั้งที่เป็นโปรตีน ลิพิด และพอลีแซคคาไรด์ พวกโปรตีนทำให้เกิด delayed hypersensitivity พวกพอลีแซคคาไรด์ทำให้เกิด immediate hypersensitivity และพวกลิพิดซึ่งส่วนใหญ่เป็น glycolipid บางส่วนเป็นแอนติเจนกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี ในคน และบางส่วนเป็น Freund ‘s adjuvant

พยาธิกำเนิด (8)

M. tuberculosis เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคปอดในคน พบว่าร้อยละ 90 ของวัณโรคในคนเกิดจากเชื้อนี้ อีกไม่ถึงร้อยละ 1 มีสาเหตุจากเชื้อสปีซีส์อื่น เช่น *M. bovis, M. africanum* ส่วน *M. bovis* มักก่อให้เกิดโรคในสัตว์ ซึ่งอาจติดต่อมาสู่คนได้โดยการบริโภคนมที่ไม่ได้ผ่านขบวนการฆ่าเชื้อ

เชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น ทางหายใจ ผิวหนังและทางเดินอาหาร การแพร่หรือติดต่อที่สำคัญคือ ทางเดินหายใจ เมื่อผู้ป่วยวัณโรคปอดไอ ละอองเสมหะที่มีเชื้อวัณโรคปนออกมา ละอองที่มีขนาดเล็กตั้งแต่ 1 ถึง 10 ไมโครเมตร จะลอยและกระจายอยู่ในอากาศ ละออง

เล็กๆ เหล่านี้อาจมีเชื้อวัณโรคอยู่ 1-3 เซลล์ เมื่อผู้อื่นสูดเข้าไปตามลมหายใจ จะเข้าไปถึงแขนงปอด (bronchiole) และถุงลม (alveoli) และก่อการอักเสบขึ้นได้ ส่วนละอองใหญ่กว่านี้มักจะตกลงสู่พื้น หรือหากถูกสูดหายใจเข้าไป มักติดอยู่ตามเยื่อเมือกในหลอดลมขนาดใหญ่และถูกขับออกเมื่อเกิดการอักเสบ จะมีเม็ดเลือดขาวมารวมตัวกันเพื่อกำจัดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อเชื้อวัณโรคที่ถูกกินอยู่ภายในเซลล์จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ ในขณะเดียวกันมีพวกแมคโครฟาจมาห้อมล้อมหนาขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงและมีลิมโฟซัยต์มาล้อมรอบ ๆ และมีแคลเซียมมาเกาะ ซึ่งจะทำให้เห็นเป็นเงาในภาพถ่ายรังสีได้ ปรากฏการณ์ทางเนื้อเยื่อวิทยาต่อเชื้อวัณโรคมี 2 ลักษณะ คือ

1. Proliferative type เป็นการอักเสบแบบเกิดเป็นก้อน เซลล์จำนวนมากมาหลอมรวมกันเป็นเซลล์ยักษ์ ซึ่งมีนิวเคลียสเรียงอยู่รอบเซลล์ ในไซโทพลาสซึมมีเชื้อวัณโรคที่ยังมีชีวิตอยู่ เรียกเซลล์ที่มีลักษณะเช่นนี้ว่า giant cell ด้านนอกจะมีพวกเอพิธิริออยด์เซลล์หุ้มอยู่ (Epitheliioid cell) มีลิมโฟซัยต์และไฟโบรบลาสต์มาจับ เกิดเป็นพังผืด ตรงกลางของก้อนแกรนูโลมาจะมีการทำลายเพิ่มขึ้น เกิดการตายของเนื้อเซลล์และมีไขมันมาเกาะ ดูคล้ายเนยแข็งเรียกว่า caseous necrosis

2. Exudate type เป็นการอักเสบชนิดที่มีน้ำ ไฟบรินและเม็ดเลือดขาว ทั้งชนิดที่มีโมโนนิวเคลียสและโพลีมอร์โฟนิวเคลียสล้อมรอบเชื้อวัณโรค มักเกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำและได้รับเชื้อที่มีความรุนแรงจำนวนมาก

การดำเนินโรค มี 2 ลักษณะ คือ

1. แบบไม่ลุกลาม รอยโรคหายเป็นปกติ ไม่พบเซลล์แมคโครฟาจและเอพิธิริออยด์เซลล์ ภาพถ่ายรังสีปกติหรืออาจเกิดเป็นพังผืดมาแทนที่ พยาธิสภาพบริเวณเนื้อเยื่อตายและมีคอลลาเจนเกิดขึ้น ล้อมรอบเชื้อวัณโรค มีลักษณะคล้ายเนยอยู่ตรงกลาง ลักษณะโรคแบบนี้เชื้อยังไม่ตาย มีโอกาสกลับเป็นใหม่ได้อีก การที่เกิดเป็นหินปูนเกาะ เมื่อหายจากโรคแล้ว ทำให้เห็นรอยโรคอยู่

2. แบบลุกลาม เชื้อวัณโรคลุกลามต่อไปได้ 3 ลักษณะ คือ

2.1 การลุกลามเฉพาะที่ เชื้อขยายลุกลามเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยรอบบริเวณที่ติดเชื้อ ทำให้รอยโรคขยายขึ้น

2.2 การลุกลามคล้ายเนยแข็ง เชื้อถูกสูดเข้าไปตามแขนงหลอดลมทำให้เกิดการกระจายของโรคไปสู่เนื้อปอดส่วนอื่นๆ

2.3 การลุกลามผ่านระบบน้ำเหลือง เป็นวิธีลุกลามของโรคที่สำคัญในการรับเชื้อวัณโรคครั้งแรก จากระบบน้ำเหลืองอาจแพร่ไปสู่ระบบอื่นๆ (9)

อาการแสดงทางคลินิก

อาการโดยทั่วไปของวัณโรค ได้แก่ น้ำหนักลด หรือน้ำหนักไม่เพิ่ม หรือเพิ่มช้า ผอม ถ้าเป็นเด็ก น้ำหนักและส่วนสูงจะต่ำกว่าเกณฑ์อายุ มีไข้ต่ำๆ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร หงุดหงิด นอกจากนั้นยังมีอาการเฉพาะที่อื่นๆ เช่นวัณโรคที่ปอดจะมีอาการไอรุนแรง มีเสมหะและไอเป็นเลือด หากเป็นที่อวัยวะอื่น เช่น กระดูกสันหลังจะมีอาการปวดหลัง เป็นต้น (9)

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ (10)

การตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อวัณโรค

1. **ปริมาณเสมหะ**

การเก็บเสมหะแต่ละครั้งไม่ควรน้อยกว่า 5 มิลลิลิตร และเสมหะต้องมีคุณภาพคือ มีลักษณะเป็นเมือก เหนียว สีขุ่นเข้มคล้ายหนอง ต้องได้จากการไอ ไม่ใช่การขับจากลำคอ

2. **ปริมาณเชื้อวัณโรคในเสมหะ**

การตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์มีโอกาสพบเชื้อวัณโรค เมื่อเสมหะ 1 มล. มีเชื้อประมาณ 10,000 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งมีโอกาสพบเชื้อเพียงร้อยละ 50 แต่ถ้าในเสมหะมีปริมาณเชื้อถึง 500,000 เซลล์ หรือมากกว่า จะมีโอกาสตรวจพบเชื้อถึงร้อยละ 99.95 ถ้ามีปริมาณเชื้อน้อยกว่า 10,000 เซลล์ โอกาสตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะน้อยลงมาก แต่ถ้าใช้วิธีตรวจโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจะช่วยในการวินิจฉัยโรคได้มากยิ่งขึ้น

1. **จำนวนครั้งที่ตรวจ** ในทางปฏิบัติ มีการแนะนำให้ส่งตรวจเสมหะ 3 ครั้งดังนี้คือ

ครั้งที่ 1 ให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะทันที (spot sputum) บ้วนใส่ภาชนะแล้วส่งตรวจ

ครั้งที่ 2 ให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะเมื่อตื่นนอนตอนเช้าก่อนแปรงฟัน ให้บ้วนเสมหะใส่ภาชนะแล้วนำมาส่งตรวจ (collect sputum)

ครั้งที่ 3 เป็นตัวอย่างเสมหะ spot sputum ที่เก็บหลังจากที่นำส่งตัวอย่างครั้งที่ 2 มาส่งแล้ว

วิธีเก็บเสมหะ

การเก็บเสมหะที่ถูกต้องมีความสำคัญเท่าๆ กับการตรวจที่ถูกต้องในห้องปฏิบัติการ ถ้าวัตถุส่งตรวจ (specimen) ด้อยคุณภาพอาจไร้ประโยชน์ ให้ผลการตรวจที่ผิดพลาด ภาชนะที่ใช้เก็บเสมหะ ควรใช้ขวดหรือถ้วยทำด้วยพลาสติก แก้ว หรือโลหะ แต่ไม่ควรใช้กระดาษชุบเทียนไข (paraffin) หรือน้ำมัน เพราะสารเหล่านี้ อาจติดอยู่บน smear เป็นสิ่งแปลกปลอมที่ติดสี acid-fast หรืออาจทำปฏิกิริยากับ Non- acid-fast bacteria ทำให้ปรากฏลักษณะเหมือน acid-fast ได้ ภาชนะควรมีปากกว้างและลึกพอสมควร เพื่อให้ผู้ป่วยบ้วนเสมหะได้สะดวก ควรมีฝาเกลียวปิดได้แน่น

ป้องกันการรั่วไหล ขวดควรมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ซ.ม. หรือมีความจุประมาณ 12 มล. ก่อนส่งขวดให้ผู้ป่วยควรติดฉลากชื่อและหมายเลขที่ข้างภาชนะให้เรียบร้อยก่อน

วิธีเก็บเสมหะจากผู้ป่วย ควรปฏิบัติตามลำดับดังนี้ (10)

1. อธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจถึงเหตุผลของการเก็บเสมหะและวิธีไอ ขากและบ้วนให้ถูกต้อง

2. ให้ผู้ป่วยบ้วนปากให้สะอาดก่อนเก็บตัวอย่าง เพื่อไม่ให้มีเศษอาหารปน

3. เปิดฝาถ้วยและเก็บฝาไว้ ส่งเฉพาะตัวถ้วยให้ผู้ป่วย

4. ให้ผู้ป่วยไอ โดยให้ปิดปากและจมูกด้วยผ้าเช็ดปากหรือผ้าเช็ดหน้าก่อน การไอที่ถูกต้องคือสูดหายใจลึกๆ กลั้นหายใจชั่วครู่ แล้วออกแรงไอให้เสมหะขึ้นมาจากหลอดลม เมื่อได้เสมหะแล้วให้ยกปากถ้วยขึ้นชิดปากล่างค่อยๆปล่อยให้เสมหะไหลลงในถ้วยเสมหะ ระวังอย่าถ่มจนกระเซ็นเปรอะเปื้อนออกมาภายนอก ควรเก็บเสมหะให้ได้อย่างน้อย 5 มล.

5. ตรวจดูเสมหะที่เก็บได้ เสมหะที่ใช้ตรวจได้ดีควรมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว เป็นยวงอาจขุ่นข้นมีสีปนเหลือง หรือปนเขียว ไม่ใช่น้ำลายซึ่งมีลักษณะใสหรือเป็นฟอง ถ้าสิ่งที่เก็บได้ไม่ถูกต้องหรือมีปริมาณน้อยเกินไป ควรให้ผู้ป่วยเก็บเพิ่ม และถ้าผู้ป่วยไม่สามารถไอได้ภายใน 2-3 นาที ควรให้ผู้ป่วยพักพอสมควร เมื่อรู้สึกว่าจะมีเสมหะจึงค่อยไอใหม่ ผู้ป่วยที่ไม่ไอหรือไอแล้วไม่มีเสมหะควรให้ดื่มน้ำมากๆ รอสักครู่แล้วไอ หรือใช้น้ำกลั้วคอ หรือฉีดละอองของน้ำเกลือเข้าหลอดลม จะช่วยกระตุ้นให้ผู้ป่วยไออย่างแรงและขับเสมหะออกมาได้ การจัดท่าให้ผู้ป่วยนอนคว่ำใช้หมอนหนุนหน้าอกให้ศีรษะห้อยลงใช้ฝ่ามือเคาะด้านหลังเบาๆ อาจทำให้ผู้ป่วยขับเสมหะออกได้ดี

6. ปิดฝาถ้วยเสมหะให้แน่นแล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ หากไม่สามารถนำส่งได้ทันทีในวันนั้นควรเก็บในความเย็น และอย่าให้ถูกแสงแดดส่อง มิฉะนั้นเสมหะจะบูดเน่า มีกลิ่นเหม็น (แต่อาจมีโอกาสตรวจพบเชื้อวัณโรคได้ โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์) จากนั้นล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่

1. วิธีตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อวัณโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.1 วิธีป้ายจากเสมหะโดยตรง (direct smear) เตรียมโดยใช้ไม้เขี่ยเสมหะแล้วป้ายลงบนกระจกสไลด์โดยตรง วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว สามารถทำได้ในสถานบริการสาธารณสุขทุกระดับ ผลการตรวจพบเชื้อวัณโรคขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อในเสมหะซึ่งต้องมีจำนวนมากพอจึงจะตรวจพบ ข้อควรคำนึงคือ การกระจายของเชื้อวัณโรคในเสมหะไม่เท่ากัน ดังนั้นการเลือกเขี่ยเสมหะมาป้ายบนกระจกสไลด์จึงสำคัญมาก ถ้าเขี่ยบริเวณที่ไม่มีเชื้อหรือมีเชื้อจำนวนน้อยมาป้าย อาจตรวจไม่พบหรือพบเชื้อได้ยาก จึงจำเป็นต้องเลือกตรวจตัวอย่างส่วนที่คาดว่ามีเชื้อมากที่สุด คือส่วนที่เป็นก้อนเมือกเหนียว สีขุ่น สีเข้ม คล้อยหนองจะพบเชื้อได้ง่ายขึ้น

1.2 วิธีป้ายจากตะกอนเสมหะ(concentrated smear) เตรียมโดยนำตัวอย่างผ่านกรรมวิธีการย่อยเสมหะด้วยสารเคมีก่อน ทำให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จะได้ตะกอนที่เข้มข้นนำมาป้ายบนแผ่นกระจกสไลด์ จะทำให้ตรวจพบเชื้อได้ง่ายขึ้น แต่ต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีแรงปั่นเหวี่ยงสูงถึง 3,000 g จึงจะทำให้เชื้อตกตะกอนได้

สารเคมีที่มีการแนะนำให้ใช้สำหรับย่อยสลายเสมหะคือ น้ำยาฟอกผ้าขาว ซึ่งมีจำหน่ายทั่วไป เช่น clorox ที่มีส่วนผสมของ sodium hypochlorite ประมาณร้อยละ 5-10 ผสมกับเสมหะในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันดีประมาณ 5 นาที แล้วปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที หรือเทียบเป็นค่า Relative Centrification Force (RCF) ได้เท่ากับ 3,000 xg หรือมากกว่า เป็นเวลานาน 15 นาที เพื่อให้เชื้อวัณโรคในเสมหะตกตะกอน เทน้ำส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเสมหะมาป้ายบนกระจกสไลด์ เพื่อย้อมสี วิธีนี้ทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น หากปฏิบัติด้วยความระมัดระวังใน bio-safety cabinet ผู้ปฏิบัติงานจะไม่เป็นอันตราย ประกอบกับสารเคมีนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อในเสมหะได้ดี จึงเหมาะสำหรับใช้เฉพาะวิธีตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เท่านั้น ไม่เหมาะสำหรับนำไปเพาะเชื้อ เนื่องจากเชื้อวัณโรคจะตาย (11)

2. **การตรวจเสมหะหาเชื้อวัณโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ** มีจุดประสงค์ดังนี้ เพื่อค้นหาผู้ป่วยวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจที่ไม่สามารถตรวจหาด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้

2.1 เพื่อเพิ่มปริมาณและพิสูจน์ชนิดเชื้อ รวมทั้งยืนยันความมีชีวิตของเชื้อโรค โดยการทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมี

2.2 เพื่อทดสอบความไวของเชื้อต่อยารักษา สำหรับใช้เป็นแนวทางในการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ

2.3 เฝ้าระวังการดื้อยาของเชื้อวัณโรคในชุมชน หรือในพื้นที่พิเศษเฉพาะเช่นในเรือนจำชายแดน เป็นต้น

ชนิดของตัวอย่างเพื่อการเพาะเชื้อ

แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. Pulmonary specimens เช่น เสมหะ หนอง
2. Extrapulmonary specimens เช่น น้ำไขสันหลัง, gastric wash, urine, plural fluid และtissue biopsy

การส่งตรวจเพาะเลี้ยงเชื้อ ควรดำเนินการในกรณีต่อไปนี้ (10)

1. กรณีผู้ป่วยใหม่ เพื่อการวินิจฉัย
    - เมื่อตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ไม่พบเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้งขึ้นไป
    - เมื่อต้องการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยาที่ใช้รักษา

- เมื่อมีประวัติสัมผัสหรือใกล้ชิดกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคที่ดื้อยาหลายขนาน
- เมื่อมีการเฝ้าระวังการดื้อยารักษาวัณโรค

2. ในผู้ป่วยที่กำลังติดตามผลการรักษา หรือกลับเป็นซ้ำ
    - เมื่อสิ้นสุดระยะเข้มข้นตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อ AFB (ได้รับยาครบทั้ง 4 ชนิดเป็นเวลา 2 เดือน คือ ไอโซไนอะสิด,ไรแฟมปิซิน,พัยราซินาไมด์, สเตร็ปโตมัยซิน)
    - เมื่อต้องการประเมินว่าผู้ป่วยหายจากโรควัณโรค
    - เมื่อตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อ AFB ในเดือนสุดท้ายของการรักษา
3. ในผู้ป่วยที่กลับเป็นซ้ำ
    - เมื่อตรวจเสมหะพบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์
    - เมื่อติดตามผลการรักษา โดยตรวจเป็นระยะ ๆ ในระหว่างการรักษา

การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรค

การเพาะและพิสูจน์เชื้อเป็นวิธีที่ตรวจหาเชื้อได้แน่นอน และสามารถยืนยันการติดเชื้อได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ การเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรียมีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน อีกทั้งเชื้อบางชนิดเช่น *M. leprae* ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ต้องเลี้ยงในสัตว์ทดลอง จึงเป็นสาเหตุให้ห้องปฏิบัติการเพียงบางแห่งที่ให้บริการเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการเพาะและพิสูจน์เชื้อมัยโคแบคทีเรียมีประโยชน์และจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ช่วยสนับสนุนการรักษาและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อโรค (11)

วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคสามารถดำเนินการได้ตามวิธีมาตรฐาน โดยใช้อาหารผสมไข่ ได้แก่ Ogawa media และ Lowenstein-Jensen ทั้งนี้ขึ้นกับความพร้อมของอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติ ซึ่งได้แก่ เครื่องปั่น เหวี่ยงความเร็วสูงแบบทำความเย็นได้ โดยต้องมีความเร็วรอบไม่ต่ำกว่า 3,000 xg ต่อนาที เนื่องจากขั้นตอนการกำจัดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆในสิ่งส่งตรวจ จะใช้สารละลาย 4%NaOH แตกต่างกันที่ Ogawa media ใช้วิธีดำเนินการตาม " Ogawa method" ที่สามารถถ่ายตัวอย่างที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนแล้ว ลงบนอาหาร Ogawa โดยตรง แต่วิธีที่ใช้อาหาร Lowenstein-Jensen (LJ) ต้องนำตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆแล้ว ไปปั่นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ หรือสารละลาย phosphate buffer โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ก่อนถ่ายตัวอย่างที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนแล้ว ลงบนอาหาร LJ ตามวิธีของ "Petroff's method" ข้อดีของวิธี LJ คือ มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้มากขึ้น

การเพาะเชื้อวัณโรควิธี Ogawa method

1. อุปกรณ์ เครื่องใช้ และน้ำยา

- น้ำยา 4% NaOH ที่ปราศจากเชื้อ
- อาหารเลี้ยงเชื้อ 3% Ogawa medium
- pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อ
- transfer pipette ที่ปราศจากเชื้อ
- ขวดแก้ว Mac-Cartney
- หลอดพลาสติกฝาเกลียว ความจุ 50 มิลลิลิตร สำหรับปั่น

2. วิธีปฏิบัติ

- ถ่ายเสมหะจากถ้วยเสมหะใส่ในขวดแก้วหรือหลอดพลาสติกฝาเกลียว
- เติมน้ำยา 4% NaOH ลงในภาชนะบรรจุเสมหะในอัตราส่วน 1:1 เท่าของปริมาณเสมหะ ถ้าเสมหะมีความเหนียว หนืด สกปรก ให้เพิ่มอัตราส่วนของ 4% NaOH เป็น 2 เท่าของปริมาณเสมหะ ปิดฝาขวดหรือหลอดให้แน่น
- ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องเขย่าผสม vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีโดยใช้มือเขย่าเป็นระยะๆ
- เมื่อครบเวลาใช้ pasteur pipette หรือ transfer pipette ดูดสารแขวนลอยในตัวอย่างเสมหะที่กำจัดเชื้อปนเปื้อนแล้ว หยดลงบนอาหาร 3% Ogawa ขวดละ 100 ul (ประมาณ 4 หยด)
- นำเข้าตู้อบเชื้อ อุณหภูมิ 37° C นาน 8 สัปดาห์
- ตรวจดูหลอดเพาะเชื้อทุกสัปดาห์จนกระทั่งพบการเจริญของเชื้อ
- บันทึกผลการเพาะเชื้อ และดำเนินการตรวจสอบยืนยันชนิดของเชื้อวัณโรคต่อไป

การเพาะเชื้อวัณโรควิธี Petroff's method

1.อุปกรณ์ เครื่องใช้ และน้ำยา

- น้ำยา 4%NaOH ที่ปราศจากเชื้อ
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lowenstein-Jensen medium
- pasteur pipette ที่ปราศจากเชื้อ
- transfer pipette ที่ปราศจากเชื้อ
- ขวดแก้ว Mac-Cartney
- หลอดพลาสติก ฝาเกลียว ความจุ 50 มิลลิลิตร สำหรับปั่น

2. วิธีปฏิบัติ

- ดำเนินการเช่นเดียวกับวิธี Ogawa method ข้างต้นจนครบกำหนดเวลาการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยน้ำยา 4% NaOH 15 นาที

- เมื่อตั้งทิ้งไว้ครบ 15 นาทีแล้ว ให้เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงในหลอดทดสอบ จนถึงขีดบอกปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 xg นาน 15 นาที
- เทน้ำใสส่วนบนทิ้งโดยให้มีน้ำเหลือติดก้นหลอดทดสอบประมาณ 0.5 มิลลิลิตร
- เขี่ยตะกอนให้กระจายตัวดี แล้วใช้ pasture pipette หรือ transfer pipette ดูดสารแขวนลอยที่เตรียมได้หยดลงบนอาหาร Lowenstein-Jensen medium 2 ขวดๆละ 100 ul (ประมาณ 4 หยด)
- นำเข้าตู้อบเชื้อ อุณหภูมิ 37° Cนาน 8 สัปดาห์
- ตรวจดูทุกสัปดาห์จนกระทั่งพบการเจริญเติบโต

การอบเพาะเชื้อ (Incubation)

การอบเพาะเชื้อ primary culture อุณหภูมิของตู้อบทั่วไปใช้ 37° C และควรตรวจเช็คอุณหภูมิของตู้อบเป็นประจำทุกเช้า โดยมีสมุดบันทึกอุณหภูมิในแต่ละวัน เพื่อควบคุมการทำงานของตู้อบ

การอ่านผลเพาะเชื้อ primary culture ควรเริ่มอ่านเมื่อผ่านการอบแล้ว 3-5 วัน เพื่อตรวจดูกลุ่มเชื้อ (colony) ที่อาจเป็นเชื้อเจริญเร็ว (rapid growers) และต่อมาควรอ่านทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลารวมทั้งสิ้น 8 สัปดาห์นับตั้งแต่เริ่มอบเชื้อ โดยลงบันทึกผลการเพาะเชื้อในสมุดบันทึกผล โดยเฉพาะถ้าครบ 8 สัปดาห์แล้วไม่สังเกตเห็นกลุ่มเชื้อเจริญ จึงรายงานว่า “No growth”

สิ่งที่ต้องบันทึกในการอ่านผลได้แก่

1. อัตราการเจริญ (growth rate) เพื่อแยกเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ
   - เจริญเติบโตเร็ว (rapid grower) มีอัตราการเจริญน้อยกว่า 7 วัน
   - เจริญเติบโตช้า (slow grower) มีอัตราการเจริญเกินกว่า 7 วัน
2. จำนวนกลุ่มเชื้อที่พบบนอาหาร การรายงานจำนวนกลุ่มเชื้อ ดังในตารางที่ 2 (12)

ตารางที่ 2 การรายงานจำนวนกลุ่มเชื้อที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จำนวนกลุ่มเชื้อที่ตรวจพบ	การรายงานผล
ไม่พบกลุ่มเชื้อเลย	No growth
< 50 colonies	จำนวนกลุ่มเชื้อที่นับได้
50-100 colonies	1+
100-200 colonies	2+
200-500 colonies (almost confluent)	3+
>500 colonies (confluent)	4+

นอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ยังมีระบบการเพาะเชื้อแบบอัตโนมัติ ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีสารกัมมันตภาพรังสี เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค เช่น BACTEC 12B เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อวัณโรคสำเร็จรูปที่ใช้กับเครื่องอ่านผลการเพาะเชื้ออัตโนมัติ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปฟลูออเรสเซนต์ เป็นตัววัดการเจริญเติบโตของเชื้อวัณโรค เช่น MGIT อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเหล่านี้จะใช้อาหาร Middlebrook 7H9 เป็นส่วนประกอบหลัก และมีการดัดแปลงตามความเหมาะสม

หลักการเพาะแยกเชื้อแบบอัตโนมัติ คือการเพาะเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว เป็นอาหารจำเพาะที่ผลิตขึ้นมาในรูปอาหารเหลวและบ่มในตู้บ่มระบบอัตโนมัติ เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วกว่าวิธีประจำ ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการตรวจได้มากว่า 1 สัปดาห์ เช่น

BACTEC 12B medium คือสารกัมมันตรังสี 14C ในรูปเกลือ palmitate เชื้อมัยโคแบคทีเรียในสิ่งส่งตรวจจะใช้สารประกอบ palmitate ในการเจริญเติบโต เกิดผลิตผลเป็น CO_2 ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง แล้วแปลงค่าเป็นดัชนีการเจริญเติบโต (growth index = GI) โดยทั่วไปกำหนดค่า GI>10 แสดงว่ามีการเจริญเติบโตของจุลชีพในขวด BACTEC 12B วิธีนี้สามารถลดระยะเวลาในการเพาะเชื้อลงเหลือประมาณ 12-18 วัน และอาศัยหลักการเดียวกันนี้ในการพิสูจน์เชื้อว่าเป็น *M. tuberculosis* complex และทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคได้ โดยได้ผลภายใน 1-2 สัปดาห์ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้สารกัมมันตรังสี นอกจากนี้เครื่องมือและน้ำยายังมีราคาแพง

MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) เป็นการตรวจหาเชื้อมัยโคแคทีเรียจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิก ประกอบด้วยหลอดสำเร็จรูปที่บรรจุอาหารเหลว (liquid medium) ปริมาตร 4 มล. บริเวณก้นหลอดเคลือบด้วยสาร silicone ที่มีสารประกอบ fluorescence ประเภท oxygen sensitive fluorescence sensor ตรึงติดอยู่ สารประกอบนี้มีความไวต่อ O_2 ที่ละลายปนอยู่ในอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในหลอด ทดสอบโดยนำตัวอย่างส่งตรวจมาผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ แล้วเพาะลงในหลอด อบที่ 37°C อ่านผลโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV ขนาดความยาวคลื่น 365 nm ถ้ามีการเรืองแสงจะเกิดแสงสีส้ม (7)