

การประเมินกระบวนการจัดการสิ่งส่งตรวจ เพื่อการเพาะเลี้ยง Mycobacteria Evaluation of Specimen Processing for Mycobacteria Cultivation

สุวรรณา เพ็ชรโต* และถวัลย์ ฤกษ์งาม

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสีต ด้าบลคลองหนึ่ง อำเภอกลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

วิจิตร วงศ์ลำชำ

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยมหิดล แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร 10700

Suwanna Petto* and Thaval Rerksngarm

Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Wijit Wonglumsom

Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology,
Mahidol University, Siriraj, Bangkoknoi, Bangkok 10700

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก การเก็บและจัดการเสมหะจากผู้ป่วยอย่างเหมาะสมจะส่งผลต่อการตรวจพบ mycobacteria ได้ การเพาะเชื้อวิธีมาตรฐานมีทั้งการใช้เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติและการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีที่เหมาะสมเพื่อเตรียมเสมหะก่อนทำการเพาะเชื้อ โดยเปรียบเทียบวิธี decontamination ที่จากเดิมใช้ 4 % NaOH ร่วมกับ N-acetyl-L-cysteine (NALC) เปรียบเทียบกับการใช้ 4, 6 และ 8 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่ผ่านการกรอง และใช้ 4 % NaOH เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ได้ศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งเสมหะต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ และศึกษาประสิทธิภาพของการใช้วิธีการแนะนำการเก็บเสมหะร่วมกับแบบเอกสารแนะนำ ผลการศึกษาพบว่าการใช้ 4 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่ผ่านการกรองแล้ว เมื่อใช้เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติมีอัตราการพบ mycobacteria ที่ไม่มีการปนเปื้อนสูงสุดร้อยละ 88.4 พบอัตราการปนเปื้อนร้อยละ 11.6 และเมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราการพบเชื้อร้อยละ 97.7 พบอัตราการปนเปื้อนร้อยละ 2.3 การพบอัตราการปนเปื้อนจากการใช้เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติสูงกว่าการเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเครื่องอัตโนมัติมีการเติม growth supplement ทำให้เชื้อชนิดอื่นสามารถเจริญได้มาก การแช่เสมหะที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่ออัตราการตรวจพบ mycobacteria และการใช้เอกสารแนะนำการเก็บเสมหะมีผลให้การเก็บเสมหะมีคุณภาพดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$) ในด้านปริมาณเสมหะ ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

คำสำคัญ : เชื้อวัณโรค; การกำจัดการปนเปื้อน; การเตรียมเสมหะ

Abstract

Tuberculosis is an important infectious disease worldwide. An appropriate collection and processing of patient sputum usually affect mycobacterial detection. Cultivation by conventional culture media and using automation system is considered as a gold standard method for tuberculosis diagnosis. This research study is a proper decontamination method to manage sputum specimens before cultivation. Decontamination process using 4 % sodium hydroxide (NaOH) in combination with N-acetyl-L-cysteine (NALC) was compared with those using 4, 6 and 8 % NaOH with filtered NALC and 4 % NaOH alone. Effect of freezing sputum on mycobacterial detection by culture was also evaluated. Questionnaires related to sputum collection were analyzed. Our results showed that the decontamination with 4 % NaOH and filtered NALC increased mycobacterial growth rate with no contamination up to 88.4 % when using automate and 97.7 % when culturing by conventional method. Storage sputum at -20 °C for 5 days had not affected significantly on detection rate of mycobacteria in all decontamination methods tested. A suggestion leaflet for sputum collection could help improve sputum quality with statistical significance ($p\text{-value} < 0.01$) in term of a quantity of sputum and appearance characteristics under macroscopic and microscopic examination.

Keywords: mycobacteria; decontamination; sputum preparation

1. บทนำ

วัณโรคเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2555 มีผู้ป่วยรายใหม่เกิดขึ้นทั่วโลกจำนวน 8.6 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตจากโรคจำนวน 1.3 ล้านคน [1] ในประเทศไทยมีจำนวนผู้ติดเชื้อรายใหม่ประมาณ 93,000 รายต่อปี และมีอุบัติการณ์ของวัณโรคประมาณ 130,000 ราย โดยร้อยละ 16 เป็นผู้ป่วยโรคเอดส์ [2] การวินิจฉัยวัณโรคในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปใช้วิธีการเตรียมตัวอย่างบนสไลด์ด้วย

กล้องจุลทรรศน์ และเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเพาะเลี้ยงถือเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยวัณโรค [3] โดยทั่วไปเสมหะมีสภาพหนืดและอาจมีเชื้อประจำถิ่นในทางเดินหายใจส่วนบนปะปนมาได้ จึงมีขั้นตอนการเตรียมเสมหะก่อนการเพาะเลี้ยง mycobacteria โดยใช้สารเคมีในการย่อยให้เสมหะเป็นของเหลวและกำจัดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น การทำ decontamination มีรายงานการใช้สารเคมีหลายชนิด ได้แก่ การใช้ 4% sodium

hydroxide (NaOH) และ 4 % NaOH ร่วมกับ N-acetyl-L-cysteine (NALC) [4] หรือการใช้ 2 % NaOH และ 2 % NaOH ร่วมกับ 0.5 % NALC [5] เป็นต้น สาร NALC มีสมบัติย่อยสลายเชื้อเมื่อได้ดี และ NaOH มีผลลดจุลชีพที่ปนเปื้อนในตัวอย่างลงได้ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในการเตรียมเสมหะเพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเก็บเสมหะอย่างถูกวิธีจะทำให้ได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพดี ส่งผลต่อการตรวจพบเชื้อในการเพาะเลี้ยงเชื้อทางห้องปฏิบัติการ เสมหะที่ดีควรเก็บในตอนเช้าให้ได้ปริมาณที่เพียงพอ และมีจำนวนเซลล์บุผิวโดยเฉลี่ยน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อฟิล์ม ที่กำลังขยาย 100 เท่า [6,7] หรือมีจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยเฉลี่ยมากกว่า 25 เซลล์ต่อฟิล์มที่ กำลังขยาย 100 เท่า [8] เสมหะที่เก็บได้ควรนำส่งเพื่อการเพาะเลี้ยงทันทีหรือควรแช่เย็นขณะนำส่ง การส่งตัวอย่างที่ล่าช้าจะมีผลต่อการมีชีวิตของ mycobacteria ได้ทำให้เกิดผลลบปลอมในการเพาะเชื้อ [9-12] งานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีดำเนินการเกี่ยวกับสิ่งส่งตรวจเสมหะให้ถูกต้องเหมาะสมเพื่อลดอัตราการปนเปื้อนในการเพาะแยกเชื้อ และช่วยเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ รวมถึงการศึกษาหาแนวทางที่สามารถนำไปใช้แนะนำผู้ป่วยในการเก็บสิ่งส่งตรวจเสมหะให้ได้อย่างถูกต้องและมีคุณภาพดี โดยศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิดการปนเปื้อนของการเพาะ mycobacteria จากเสมหะที่ผลการย้อม acid fast bacilli เป็นบวก (AFB+) โดยใช้วิธี decontamination ที่แตกต่างกัน และศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการเพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะ นอกจากนี้ได้ศึกษาสถานการณ์ความเข้าใจของเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบการให้คำแนะนำวิธีการเก็บเสมหะแก่ผู้ป่วยที่ส่งเสมหะไปเพาะเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ decontamination ต่อผลการเพาะเชื้อ

กลุ่มตัวอย่างเป็นเสมหะจากผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 18 ปี จากโรงพยาบาลในเครือข่ายสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 กรุงเทพมหานคร โดยเป็นตัวอย่างเสมหะที่ AFB+ จำนวน 43 ตัวอย่าง แบ่งเสมหะเพื่อการเตรียมตัวอย่างก่อนนำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้วิธี decontamination ด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ (1) 4 % NaOH + 2.9 % sodium citrate + NALC ที่ไม่ผ่านการกรอง (วิธี O) (2) 4 % NaOH + 2.9 % sodium citrate + NALC ที่ผ่านการกรอง (วิธี A) (3) 6 % NaOH + 2.9 % sodium citrate + NALC ที่ผ่านการกรอง (วิธี B) (4) 8 % NaOH + 2.9 % sodium citrate + NALC ที่ผ่านการกรอง (วิธี C) และ (5) 4 % NaOH เพียงอย่างเดียว (วิธี D) ซึ่งการกรอง NALC ทำโดยกรองด้วยกระดาษกรองชนิด cellulose acetate ที่มีขนาดรู 0.45 ไมครอน โดยขั้นตอนการ decontamination ด้วยวิธี O และวิธี D ทำโดยผสมเสมหะในสัดส่วนที่เท่ากันกับ 4 % NaOH + 2.9 % sodium citrate + NALC หรือ 4 % NaOH เพียงอย่างเดียว เขย่าด้วย vortex mixer นาน 15-30 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ต่อมาเติม 0.067 M phosphate buffer solution (PBS) pH 6.8 ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ส่วนขั้นตอนการ decontamination ด้วยวิธี A, B และ C มีการย่อยเสมหะด้วย sodium citrate และ NALC ก่อนการกำจัดจุลชีพอื่นด้วย 4, 6 และ 8 % NaOH โดยผสมเสมหะกับ sodium citrate และ NALC ในสัดส่วนที่เท่ากัน เมื่อเสมหะหายหนืดแล้วจึงเติม 4, 6 และ 8 % NaOH ปริมาตรเท่ากับสารละลาย sodium citrate และ NALC ที่ใช้ไป ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และเติม PBS ให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่น

ด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วรอบ 3000 x g นาน 15 นาที เทของเหลวข้างบนทิ้งไปและเติม PBS ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งออกเป็นสองส่วน Löwenstein-Jensen medium (LJ medium) โดยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปเพาะเลี้ยงในขวดสำหรับเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติเครื่อง BACTEC MGIT 960 [13,14] ซึ่งมีวิธีการตรวจพบ mycobacteria โดยอาศัยการเรืองแสงของ MGIT tube และปริมาตร 100-250 ไมโครลิตร ไปเพาะเลี้ยงใน LJ medium จำนวนสองขวด [15] นำเข้าบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลโดยสังเกตโคโลนีลักษณะที่จำเพาะกับ mycobacteria [16] ทุกสัปดาห์จนครบ 8 สัปดาห์ ขวดเพาะเลี้ยงที่ตรวจพบเชื้อที่สงสัยนำมาย้อมสีทึนกรด ถ้าพบ AFB รายงานผล AFB+ สำหรับการรายงานผลการปนเปื้อน (contamination) จากจุลินทรีย์อื่นในอาหารเพาะเลี้ยงชนิด MGIT tube สังเกตจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นและเมื่อย้อมสีทึนกรดแล้วพบแบคทีเรียชนิดอื่นที่ไม่ใช่ลักษณะของ mycobacteria การปนเปื้อนบน LJ medium สังเกตจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนสี เปลี่ยนจากสภาพอาหารแข็งเป็นอาหารเหลว หรือมีโคโลนีของเชื้อชนิดอื่นเจริญบนหน้าอาหารประมาณสองในสามส่วนของพื้นที่ผิวหน้าอาหาร ส่วนของเสมหะที่ทำให้เข้มข้นที่เหลื่อย้อมด้วยสีทึนกรดและอ่านผลการย้อมด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป ข้อมูลในเชิงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี decontamination ต่อผลการเพาะเลี้ยงเชื้อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติการทดสอบ Chi-square

2.2 การศึกษาผลของการแช่แข็งเสมหะต่อผลการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยจำนวน 66 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ทำ decontamination ด้วยวิธีทั้งห้าวิธีตามข้อ 2.1 และเพาะเชื้อด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติและเพาะบน LJ medium

ส่วนที่ 2 นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน แล้วทำ decontamination และเพาะเชื้อในท่อนองเดียวกันกับส่วนที่ 1 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติการทดสอบ Chi-square

2.3 แบบสอบถามสำหรับเจ้าหน้าที่เก็บตัวอย่างเสมหะ

ประเมินสถานการณ์ความเข้าใจของเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบการให้คำแนะนำวิธีการเก็บเสมหะแก่ผู้ป่วย โดยแบบสอบถามส่งให้เจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลเครือข่ายของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 กรุงเทพมหานคร กรมควบคุมโรค จำนวน 43 คน เป็นการสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลทั่วไปของผู้ตอบแบบสอบถามและเกี่ยวกับความรู้ความเข้าใจในการเก็บเสมหะและแนวทางการแก้ไขปัญหาที่พบจากการเก็บเสมหะผู้ป่วย ข้อมูลที่ได้ถูกเก็บรวบรวมเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติการทดสอบ one-way ANOVA

2.4 การศึกษาวิธีการให้คำแนะนำการเก็บเสมหะที่ดี

กลุ่มตัวอย่างเป็นเสมหะจากผู้ป่วย 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ เสมหะที่เก็บจากวิธีเดิมโดยการแนะนำการเก็บด้วยการอธิบาย และกลุ่มที่ 2 คือ เสมหะที่เก็บจากการอธิบายและได้รับเอกสารวิธีการเก็บเสมหะ จำนวนอย่างละ 50 ตัวอย่าง เกณฑ์การพิจารณาเสมหะที่มีคุณภาพสำหรับการเพาะเลี้ยง mycobacteria มีทั้งด้วยการตรวจดูเสมหะแต่ละดิลล์ด้วยตาเปล่า และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเกณฑ์เสมหะที่มีคุณภาพ [17] ได้แก่ เสมหะควรมีปริมาตร 2-5 มิลลิลิตร เสมหะมีลักษณะขุ่นและเป็นหนอง แต่บางครั้งอาจเหลวและมีชิ้นส่วนของเมือกปนหนองผสมอยู่ อาจมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียวหรือสีแดงจนถึงน้ำตาลเมื่อมีเลือดปน และลักษณะตัวอย่างเสมหะที่ดีทางกล้องจุลทรรศน์ [18] ได้แก่ จำนวนเม็ด

เลือดขาวมากกว่าหรือเท่ากับ 25 เซลล์ต่อหัว 10X objective lens และจำนวนเซลล์บุผิวน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 เซลล์ต่อหัว 10X objective lens เก็บรวบรวมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบผลของการให้คำแนะนำทั้งสองวิธีโดยใช้สถิติการทดสอบ Chi-square

3. ผลการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ decontamination ทั้ง 5 วิธี (วิธี O, A, B, C และ D) ต่อผลการเพาะเชื้อโดยใช้ตัวอย่างเสมหะที่ AFB+ จำนวน 43 ตัวอย่าง ซึ่งมีผล AFB scanty จำนวน 6 ราย ผล AFB 1+

จำนวน 13 ราย ผล AFB 2+ จำนวน 7 ราย และผล AFB 3+ จำนวน 17 ราย ผลการศึกษาทั้ง 5 วิธี พบว่าการเพาะเชื้อด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติมีการเจริญของเชื้อจากวิธี A และ C ซึ่งตรวจพบ mycobacteria จำนวน 100 % พบการเจริญของเชื้อโดยไม่มีการปนเปื้อนจากวิธี A และ C ในอัตราสูงสุด 88.4 % และการเพาะเชื้อด้วย conventional method ด้วย LJ medium พบการเจริญของเชื้อจากวิธี A และ C ซึ่งตรวจพบ mycobacteria จำนวนสูงสุด 97.7 พบการเจริญของเชื้อโดยไม่มีการปนเปื้อนโดยวิธี A ในอัตราสูงสุด 97.7 % ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลเพาะ mycobacteria ในเสมหะที่ผ่านการ decontamination ด้วยวิธีต่าง ๆ จำนวน 43 ตัวอย่าง

	จำนวนตัวอย่างเสมหะที่ทำ decontamination (%)				
	วิธี O	วิธี A	วิธี B	วิธี C	วิธี D
BACTEC MGIT 960					
ตรวจพบ mycobacteria	42 (97.7)	43 (100)	42 (97.7)	43 (100)	42 (97.7)
เวลาเฉลี่ยที่พบการเจริญ (วัน)	13.64	13.74	13.78	13.84	13.90
ตรวจพบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	35 (81.4)	38 (88.4)	35 (81.4)	38 (88.4)	34 (79.1)
จำนวนที่พบการปนเปื้อน	7 (16.3)	5 (11.6)	7 (16.3)	5 (11.6)	8 (18.6)
L-J medium					
ตรวจพบ mycobacteria	30 (69.8)	42 (97.7)	40 (93.0)	42 (97.7)	40 (93.0)
ตรวจพบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	28 (65.1)	42 (97.7)	39 (90.7)	41 (95.3)	37 (86.0)
จำนวนที่พบการปนเปื้อน	2 (4.7)	0 (0)	1 (2.3)	1 (2.3)	3 (7.0)

โดย O = 4 % NaOH + NALC ที่ไม่ได้กรอง, A = 4 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, B = 6 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, C = 8 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, D = 4 % NaOH

การศึกษาผลของการแช่แข็งเสมหะที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงทันทีโดยไม่แช่แข็งจากตัวอย่างเสมหะเดียวกัน จำนวนอย่างละ 66 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่

decontamination วิธี O, A, B, C และ D เป็นคนละตัวอย่าง) เมื่อนำเสมหะมาผ่านวิธี decontamination ทั้ง 5 วิธี แล้วนำมาเพาะเชื้อด้วยเครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ พบว่าผลการเพาะ mycobacteria จาก

เสมหะที่ผ่านการแช่แข็งและไม่แช่แข็งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$) ยกเว้นวิธี B มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} = 0.047$) โดยเสมหะที่ไม่ผ่านการแช่แข็งตรวจพบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อนมากกว่าเสมหะที่ผ่านการแช่แข็ง ส่วนการเพาะเชื้อด้วยวิธี conven-

tionnal method โดยการเพาะใน LJ medium พบว่าผลการเพาะ mycobacteria จากเสมหะที่ผ่านการแช่แข็งไม่มีความแตกต่างจากเสมหะที่ไม่ผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} \geq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลการเพาะ mycobacteria จากเสมหะที่ผ่านการแช่แข็งและเสมหะที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง โดยใช้เครื่องอัตโนมัติด้วยวิธี decontamination ต่าง ๆ จำนวน 66 ตัวอย่าง

	วิธี decontamination									
	วิธี O		วิธี A		วิธี B		วิธี C		วิธี D	
	N	F	N	F	N	F	N	F	N	F
ตรวจพบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	9	9	12	9	8	1	9	5	10	10
ตรวจพบเชื้อและมีการปนเปื้อน	1	0	0	1	0	0	2	1	0	0
ตรวจไม่พบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	51	52	49	53	51	59	52	56	49	50
ตรวจไม่พบเชื้อและมีการปนเปื้อน	5	5	5	3	7	6	3	4	7	6
p-value	0.799		0.555		0.047		0.622		0.957	

โดย O = 4 % NaOH + NALC ที่ไม่ได้กรอง, A = 4 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, B = 6 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, C = 8 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, D = 4 % NaOH

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการเพาะ mycobacteria จากเสมหะที่ผ่านการแช่แข็งและเสมหะที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง โดยเพาะเลี้ยงบน LJ medium ด้วยวิธี decontamination ต่าง ๆ จำนวน 66 ตัวอย่าง

	วิธี decontamination									
	วิธี O		วิธี A		วิธี B		วิธี C		วิธี D	
	N	F	N	F	N	F	N	F	N	F
ตรวจพบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	9	9	10	7	9	9	9	7	8	8
ตรวจพบเชื้อและมีการปนเปื้อน	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
ตรวจไม่พบเชื้อและไม่มีการปนเปื้อน	53	51	52	56	49	49	53	55	52	54
ตรวจไม่พบเชื้อและมีการปนเปื้อน	4	5	4	3	7	8	4	4	6	4
p-value	0.765		0.664		0.785		0.866		0.803	

โดย O = 4 % NaOH + NALC ที่ไม่ได้กรอง, A = 4 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, B = 6 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, C = 8 % NaOH + สารละลาย NALC-sodium citrate แล้วกรอง, D = 4 % NaOH

จากการใช้แบบสอบถามสำหรับเจ้าหน้าที่เก็บตัวอย่างเสมหะเพื่อประเมินระดับความเข้าใจในการเก็บส่งตรวจเสมหะของเจ้าหน้าที่ จำนวน 43 คน พบว่าผู้ตอบแบบสอบถามเป็นเพศชาย 11 คน เพศหญิง 32 คน ส่วนใหญ่มีอายุระหว่าง 30-39 ปี มีการศึกษาระดับปริญญาตรี เป็นผู้ที่มียาตำแหน่งเป็นพยาบาล และมีประสบการณ์รับผิชอบเก็บส่งตรวจมากกว่า 4 ปี ขึ้นไป พบว่ามีคะแนนความเข้าใจในการ

เก็บส่งตรวจเฉลี่ยเป็น 25.05 ± 3.65 คะแนน จากคะแนนเต็ม 35 คะแนน โดยมีคะแนนจำแนกตามเพศ อายุ ระดับการศึกษา ตำแหน่งงานและประสบการณ์ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าคะแนนความเข้าใจของผู้รับผิชอบเก็บส่งตรวจในแต่ละกลุ่มประเภททั้งหมดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} \geq 0.05$)

ตารางที่ 4 ระดับคะแนนความเข้าใจของเจ้าหน้าที่ที่รับผิดชอบการเก็บเสมหะสำหรับการเพาะเชื้อ จำนวน 43 คน จำแนกตามเพศ อายุ ระดับการศึกษา ตำแหน่ง และประสบการณ์

ประเภท	กลุ่ม	จำนวน	ระดับคะแนน (mean $\pm$ SD)	P-value
เพศ	ชาย	11	25.64 ± 4.11	0.541
	หญิง	32	24.84 ± 3.53	
อายุ	20 - 29 ปี	5	26.2 ± 4.27	0.049
	30 - 39 ปี	16	23.06 ± 2.67	
	40 - 49 ปี	15	26.33 ± 3.92	
	50 - 60 ปี	7	26 ± 3.27	
ระดับการศึกษา	ต่ำกว่าปริญญาตรี	3	23 ± 1.73	0.505
	ปริญญาตรี	35	25.46 ± 3.84	
	ปริญญาโท	4	23.5 ± 2.65	
	อื่น ๆ	1	23	
ตำแหน่ง	พยาบาล	23	25.13 ± 3.49	0.12
	นักวิชาการสาธารณสุข	13	26.38 ± 3.48	
	เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์	1	22.00	
	อื่น ๆ	6	22.33 ± 3.72	
ประสบการณ์	น้อยกว่า 1 ปี	10	24.2 ± 3.99	0.395
	1 - 2 ปี	5	26 ± 4.53	
	มากกว่า 2 - 3 ปี	7	23.43 ± 3.91	
	มากกว่า 3 - 4 ปี	1	22.00	
	มากกว่า 4 ปีขึ้นไป	20	25.95 ± 3.14	
	รวม	43	25.05 ± 3.65	

ผู้ตอบแบบสอบถามมีแนวทางการแก้ไขปัญหที่เกิดจากการได้รับเสมหะที่ไม่เหมาะสมจากผู้ป่วย โดยจำนวน 60.5 % ของผู้ตอบแบบสอบถามให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะใหม่เมื่อพบว่าเสมหะครั้งแรกเป็นน้ำลาย เมื่อผู้ป่วยเก็บเสมหะได้น้อยเกินไปมีการแนะนำให้ผู้ป่วยขากเสมหะใหม่อีกครั้งและช่วยผู้ป่วยเคาะปอด จำนวน 62.8 และ 38.9 % ของผู้ตอบแบบสอบถาม ตามลำดับ มีการแนะนำให้ผู้ป่วยเก็บเสมหะให้มีการปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่นปริมาณน้อยที่สุด โดยการให้ผู้ป่วยไอลึก ๆ ก่อนเก็บเสมหะ 83.7 % และให้ผู้ผู้ป่วยบ้วนปากก่อนขากเสมหะ 60.5 % นอกจากนี้ผู้ตอบแบบสอบถามเห็นด้วยกับการแนบคำแนะนำการเก็บเสมหะไปพร้อมกับภาชนะสำหรับเก็บตัวอย่างเพื่อให้มีการเก็บเสมหะที่มีคุณภาพที่ดีโดยมีความเห็นด้วยมากถึงมากที่สุดถึง 83.7 %

ผู้วิจัยจึงศึกษาผลการปรับเปลี่ยนกระบวนการให้คำแนะนำการเก็บเสมหะให้แก่ผู้ป่วย จากข้อมูล

ความเหมาะสมของเสมหะที่เก็บได้ จำนวน 50 ตัวอย่าง ก่อนการปรับเปลี่ยนกระบวนการให้คำแนะนำการเก็บเสมหะจากเดิมด้วยการอธิบายเท่านั้น พบว่าเสมหะที่มีความเหมาะสมในปริมาณ ลักษณะทางกายภาพและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีจำนวน 11, 9 และ 18 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่หลังการปรับเปลี่ยนกระบวนการให้คำแนะนำเป็นการอธิบายพร้อมทั้งแนบใบแนะนำการเก็บเสมหะไปพร้อมกับตลับเสมหะให้กับผู้ป่วย จากเสมหะที่เก็บมา 50 ตัวอย่าง พบว่าเสมหะที่มีความเหมาะสมในปริมาณ ลักษณะทางกายภาพและลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีจำนวน 41, 21 และ 36 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 ซึ่งวิธีการแนะนำการเก็บเสมหะด้วยวิธีที่ปรับปรุงใหม่ทำให้เก็บได้เสมหะที่มีคุณภาพดีกว่าการเก็บแบบเดิม ในด้านจำนวนปริมาณเสมหะ ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$)

ตารางที่ 5 จำนวนเสมหะที่เก็บได้อย่างเหมาะสมก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนกระบวนการให้คำแนะนำแก่ผู้ป่วย

ความเหมาะสมทางด้าน	จำนวนตัวอย่างเสมหะ (%)		P-value
	ก่อน	หลัง	
ปริมาณเสมหะ	11 (22.0)	41 (82.0)	<0.01
ลักษณะทางกายภาพ	9 (18.0)	21 (42.0)	<0.01
ลักษณะทางกายใต้กล้องจุลทรรศน์ สำหรับการเพาะเชื้อ	18 (36.0)	36 (72.0)	<0.01

4. วิจัยและสรุป

วิธีการเตรียมเสมหะให้เข้มข้นเพื่อการเพาะเลี้ยง mycobacteria โดยใช้เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติและเพาะบน LJ medium ด้วยการใส่ 4, 6 และ 8 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่กรองแล้ว ให้ผลการเจริญของ mycobacteria โดยไม่มีการปนเปื้อนมากกว่าการใช้ 4 % NaOH เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของรายงานอื่น ๆ [13,14] ซึ่ง

รายงานว่าการใช้ NaOH ร่วมกับ NALC ในการ decontamination ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกมากกว่าการใช้ NaOH เพียงชนิดเดียว และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้เสมหะที่ผ่านการ decontamination ด้วย 4 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่ผ่านการกรองแล้วให้ผลการเจริญของเชื้อโดยไม่มีการปนเปื้อนมากกว่าการใช้เสมหะที่ decontamination ด้วย 4 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่ไม่ผ่านการกรอง ดังนั้น

การกรอง NALC ก่อนการผสมกับสารละลาย 4 % NaOH น่าจะมีส่วนช่วยในการลดการปนเปื้อนได้ยิ่งขึ้นจากการทดลองนี้การใช้ 4 % NaOH ร่วมกับ NALC ที่กรองแล้วในการ decontamination น่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับงานประจำ เพราะแม้ว่าจะพบการเจริญที่ใกล้เคียงกับวิธีอื่น แต่การใช้ปริมาณ NaOH ที่น้อยที่สุดจะทำให้โอกาสที่เชื้อจะถูกทำลายน้อยลงด้วย

จากการศึกษานี้ การเก็บรักษาเสมหะด้วยการแช่แข็งไม่มีผลต่อการเพาะเชื้อด้วยวิธีการใช้เครื่องเพาะเชื้ออัตโนมัติ แต่การแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 2 เดือน จะทำให้เกิดการสูญเสียดีเอ็นเอของ *M. tuberculosis* ได้ [18] การเก็บรักษาเสมหะไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะมีผลลดอัตราการเพาะเลี้ยงพบ mycobacteria ลงได้ตามระยะเวลาที่เก็บรักษา [19] ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เวลาในการแช่แข็งเสมหะเป็นเวลาเพียง 5 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาปกติที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเสมหะก่อนทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในงานประจำ ดังนั้นในการเก็บรักษาเสมหะไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สามารถใช้ในงานประจำได้โดยผลการเพาะเลี้ยง mycobacteria ไม่มีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเสมหะทันทีโดยไม่ผ่านการแช่แข็ง

การปรับเปลี่ยนกระบวนการให้คำแนะนำการเก็บเสมหะให้แก่ผู้ป่วย ซึ่งจากเดิมเป็นการแนะนำด้วยคำพูดเท่านั้น เปลี่ยนเป็นการแนะนำด้วยคำพูดพร้อมทั้งแนบใบแนะนำการเก็บเสมหะไปพร้อมกับตลับเสมหะให้กับผู้ป่วย เป็นแนวทางหนึ่งที่มีผลให้การเก็บตัวอย่างเสมหะมีคุณภาพขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.01$) ทั้งด้านได้ปริมาณที่เหมาะสม มีลักษณะเสมหะที่ดี และมีคุณภาพดีเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คำแนะนำที่มีให้สำหรับการเก็บตัวอย่างเสมหะที่มีคุณภาพจะมีผลต่อการตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยเพิ่มอัตราการพบเชื้อจากการเพาะเลี้ยง [20] การแนบ

ใบแนะนำในการเก็บตัวอย่างสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานประจำเพื่อการพัฒนาคุณภาพการเก็บตัวอย่างเสมหะที่ดี

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.พ.อ.โสภณ สิริสาส์น ที่ให้คำแนะนำสำหรับเนื้อหาและแหล่งข้อมูลทางวิชาการ รวมทั้งสถิติวิเคราะห์ ที่เป็นประโยชน์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1 กรุงเทพมหานคร และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชันสูตรทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการเก็บข้อมูลต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] World Health Organization, Global tuberculosis report 2013, Available Source: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf, June 9, 2014.
- [2] World Health Organization, Country Office for Thailand, Tuberculosis (TB), Available Source: <http://www.searo.who.int/thailand/areas/tuberculosis/en>, June 9, 2014.
- [3] Mukherjee, A., Lodha, R. and Kabra, S.K., 2012, Recent advances in diagnosis of tuberculosis, *Ped. Infect. Dis.* 4: 45-50.
- [4] Kubica, G.P., Dye, W.E., Cohn, M.L. and Middlebrook, G., 1963, Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodiumhydroxide for culture of mycobacteria, *Am. Rev. Respir. Dis.* 87: 775-779.

- [5] Lorian, V. and Lacases, M.L., 1967, N-Acetyl-L-cysteine sputum homogenization and its mechanism of action on isolation of tubercle bacilli, *Dis. Chest* 51: 275-277.
- [6] Baron, E.J. and Thomson, Jr, R.B. 2011, Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology, pp. 228-271, In Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Warnock, D.W., *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- [7] Murray, P.R., 1975, Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum, *Mayo Clin. Proc.* 50: 339-344.
- [8] van Scoy, R.E., 1977, Bacterial sputum cultures: a clinician's viewpoint, *Mayo Clin. Proc.* 52: 39-41.
- [9] Paramasivan, C.N., Narayan, A.S.L., Prabhakar, R., Rajagopal, M.S., Somasundaram, P.R. and Tripathy, S.P., 1983, Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results, *Tubercle* 64: 119-124.
- [10] Padmanabha, R.K., Nair, S.S., Cabbold, N. and Naganathan, N., 1966, Some operational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *Bull. W.H.O.* 34: 589-604.
- [11] Sula, L., Sundaresan, T.K. and Langerova, M., 1960, Effect of storage and transport on the cultivability of mycobacteria, *Bull. W.H.O.* 23: 635-651.
- [12] Traore, I. and Slosarek, M., 1981, Survival of mycobacteria in sputum at different temperature, *Czech. Med.* 4: 203-208.
- [13] Lu, D., Heeren, B. and Dunne, W.M., 2002, Comparison of the automated mycobacteria growth indicator tube system (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimen, *Am. J. Clin. Pathol.* 118: 542-545.
- [14] Siddiqi, S.H, Hwangbo CC., 1986, A new antimicrobial mixture (polymixin B, amphotericin B, naildixic acid, trimethoprim and azlocillin) for effective suppression of non-mycobacterial contamination during primary isolation of mycobacteria, *ASM Annual Meeting Washington, DC.* Abstract U35.
- [15] Somoskovi, A., Kodmon, C., Lantos, A., Bártfai, Z., Tamási, L., Füzy, J. and Magyar, P., 2000, Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC 960 system, the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen médium, *J. Clin. Microbiol.* 38: 2395-2397.
- [16] Ken, P.T. and Kubica, G.P., 1985, *Public Health Microbiology: A Guide for the Level III Laboratory*, Centers for Disease Control, Division of Laboratory Training and Consultation, Department of Health and Human Services, US Government Printing Office, Atlanta, G.A..

- [17] Morgan, M.A., Horstmeier, C.D., DeYoung, D.R. and Roberts, G.D., 1983, Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens, *J. Clin. Microbiol.* 18: 384-388.
- [18] Pathak, D., Chakravorty, S., Hanif, M. and Tyagi, J.S., 2007, Lysis of tubercle bacilli in fresh and stored sputum specimens: Implications for diagnosing tuberculosis in stored and paucibacillary specimens by PCR, *BMC Microbiol.* 7: 83.
- [19] Banda, H.T., Harries, A.D., Boeree, M.J., Nyirenda, T.E., Banerjee, A. and Salaniponi, F.M.L., 2000, Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4: 272-274.
- [20] Khan, M.S., Dar, O., Sismanidis, C., Shah, K. and Godfrey-Faussett, P., 2007, Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum-submission instructions: A pragmatic randomized controlled trial, *Lancet* 369: 1955-1960.