รหัสโครงการ SUT1-104-42-12-44

รายงานการวิจัย

การเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยวิธี Ziehl-Neelsen Stain ด้วยการใช้ไฮโปคลอไลท์ร่วมกับ Tween 80

(Sensitivity Improvement of Ziehl-Neelsen Stain Examination for *Mycobacterium tuberculosis* Detection with the Use of Hypochlorite and Tween 80)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-42-12-44

อภินันทนาการ

รายงานการวิจัย

การเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยวิธี Ziehl-Neelsen Stain ด้วยการใช้ไฮโปคลอไลท์ร่วมกับ Tween 80

Sensitivity Improvement of Ziehl-Neelsen Stain Examination for *Mycobacterium tuberculosis* Detection with the Use of Hypochlorite and Tween 80

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. คมสัน พิระภัทรุ่งสุริยา

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. นายแพทย์ เฉลิมชัย ดีสระวินิจ
2. นายเชษฐ์ ศาสตร์ใหม่
3. นายเศวต ชำนาญกรม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2542

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

เมษายน 2546

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ "ศูนย์วัณโรคเขต 5 นครราชสีมา" ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้วยดีต่องานวิจัยนี้

"การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2542" เป็นจำนวนเงิน 41,000 บาท

บทคัดย่อ

วิธีการเตรียมตัวอย่างเสมหะเพื่อการตรวจตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test ถูกออกแบบโดยใช้ไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite/NaOCl) และ ไฮโปคลอไรท์ร่วมกับ Tween 80 เพื่อให้การตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุวัณโรค *M. tuberculosis* มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ด้วยความมุ่งหวังว่าจะได้วิธีที่ใช้ได้จริง ไม่ต้องการเครื่องมือ หรือวัสดุราคาแพง เพื่อลดอุปสรรคในการนำไปใช้จริงในเชิงปฏิบัติ และลดโอกาสการติดเชื้อจากเสมหะของเจ้าหน้าที่ ผลพบว่า การใช้ NaOCl แต่เพียงอย่างเดียวไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับวิธีปกติ ($p<0.05$) เมื่อตัวอย่างเป็นเสมหะ (N=59), กึ่งเสมหะ (N=42), หรือทั้งเสมหะ และกึ่งเสมหะ (N=101) ผลนี้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานการวิจัย อาจเนื่องจากใช้ปริมาตรตัวอย่างน้อยเกินไป (0.5 มล.) เมื่อปรับปริมาตรตัวอย่างเป็น 1.0 มล. ในวิธี TB-NaOCl-80 ผลพบว่า การใช้ NaOCl ให้ผลการตรวจที่ดีกว่าวิธีปกติ และที่สำคัญการใช้ NaOCl ร่วมกับ Tween 80 ให้ผลดีที่สุด (N=105) โดยมีค่า sensitivity สูงกว่าวิธีปกติ 33% ดังนั้นจึงมีแนวโน้มสูงที่จะได้ประโยชน์จาก NaOCl และ Tween 80 ในการตรวจ, รักษา, เฝ้าระวัง และควบคุมวัณโรค หากดำเนินการทดสอบค่า accuracy และ specificity ให้ผลที่ดี และมีการพัฒนาวิธีนี้ขึ้นใช้ข้อดีที่สำคัญคือ ใช้ประโยชน์ได้จริง เพียงแค่เพิ่มวัสดุ อุปกรณ์ (เครื่องปั่นเหวี่ยง) ที่มีราคาไม่แพงก็สามารถปฏิบัติได้แล้ว อีกทั้งยังมีข้อดีที่สำคัญคือ ช่วยปิดโอกาสการติดเชื้อจากเสมหะของเจ้าหน้าที่ได้สมบูรณ์เมื่อใช้ NaOCl

Abstract

Sample preparation for Ziehl-Neelsen staining test was designed to make use of hypochlorite (NaOCl) and hypochlorite with Tween 80 to examine *M. tuberculosis* with better sensitivity in the hope that the developed method is actually practical without high operating cost and expensive equipment in order to alleviate the burdern of practical application and, very importantly, to eliminate the infection of social work practice in laboratory officials. The result indicated that the use of NaOCl alone showed no statistically significant difference ($p<0.05$) with sample of sputum (N=59), semi-sputum (N=42) or both (N=101) This result did not support our research assumption and might due to too small sample size of 0.5 ml. When double sized sample of sputum was used in the alternative treatment "TB-NaOCl-80", NaOCl involved treatment gave better result as expected over the control treatment. Most importantly, the treatment that used both NaOCl and Tween 80 produced best result with 33% higher that the control in sensitivity in sample sputum (N=105). There is therefore high tendency of using both NaOCl and Tween 80 in examination, mediation, surveillance and management of tuberculosis (TB). When becoming an alternative method after specificity and accuracy had been confirmed as reliable, only small amout of budget are required to put into practice. As a result of having NaOCl in sample preparation, tuberculosis officials and those involve in Thailand will have slim chance to get laboratory infection because NaOCl kills all *M. tuberculosis* cells in sputum.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อ ..... ข

Abstract ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

คำอธิบายศัพท์/คำย่อ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

Hypochlorite (NaOCl) 3

ความสำคัญของ NaOCl ต่อเสมหะ และการติดเชื้อ 3

ความสำคัญของ NaOCl ต่อเสมหะ และการติดเชื้อ 3

Tween 80 4

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

สมมุติฐานการวิจัย 4

ขอบเขตของการวิจัย 4

ข้อตกลงเบื้องต้น 5

ขอบเขตของการวิจัย 4

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 5

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 5

คำสำคัญ 5

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สมมุติฐานการวิจัย 6

2.2 แหล่งที่มาของข้อมูล 6

2.2.1 ขั้นเตรียมตัวอย่างของวิธี Ziehl-Neelsen Staining Test 7

2.2.2 ขั้นย้อมสีตามวิธี Ziehl-Neelsen Staining Test 7

2.2.3 แนวปฏิบัติในการสำรวจผ่านกล้อง 8

2.3 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานในการออกแบบการทดลอง 8

2.4 การออกแบบวิจัย และวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล 9

2.4.1 การทดลอง TB-NaOCl 9

2.4.1.1 *TB-NaOCl A* 9
2.4.1.2 *TB-NaOCl B* 9
2.4.1.3 *TB-NaOCl C* 10
2.4.2 การทดลอง TB-NaOCl-80 10
2.4.2.1 *TB-NaOCl-80 A* 10
2.4.2.2 *TB-NaOCl-80 B* 10
2.4.2.3 *TB-NaOCl-80 C* 10
2.5 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล 10
บทที่ 3 ผลการทดลอง
3.1 ผลข้อมูลก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ 12
3.1.1 ผล TB-NaOCl 12
3.1.2 ผล TB-NaOCl-80 12
3.2 ผลวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง TB-NaOCl 12
3.2.1 ลักษณะของ Treatment ควบคุม 12
3.2.2 ลักษณะของ Treatment ดัดแปลง 12
3.3 ผลวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง TB-NaOCl-80 13
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์
4.1 TB-NaOCl 16
4.2 TB-NaOCl-80 17
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 19
บรรณานุกรม 21
ภาคผนวก
ตารางที่ 6 ผลจากวิธี 2.4.1 "การทดลอง TB-NaOCl" ..... ภาคผนวก ก
ตารางที่ 7 ผลจากวิธี 2.4.2 "การทดลอง TB-NaOCl-80" ..... ภาคผนวก จ
NPar Tests: TB-NaOCl (Sputum) ..... ภาคผนวก ฉ
NPar Tests: TB-NaOCl (Semi-sputum) ..... ภาคผนวก ญ
NPar Tests: TB-NaOCl (Both Sputum and Semi-sputum) ..... ภาคผนวก ฎ
NPar Tests: TB-NaOCl-80 ..... ภาคผนวก ฏ
NPar Tests: TB-NaOCl-80, A & B ..... ภาคผนวก ฐ
NPar Tests: TB-NaOCl-80, A & C ..... ภาคผนวก ฑ
NPar Tests: TB-NaOCl-80, B & C ..... ภาคผนวก ฒ
ประวัติผู้วิจัย ..... ภาคผนวก ณ

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl โดยวิธี Kruskal-Wallis Test 13
ตารางที่ 2 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl-80 โดยวิธี Kruskal-Wallis Test 14
ตารางที่ 3 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl-80 โดยวิธี Mann-Whitney Test 14
ตารางที่ 4 ค่า Mean Rank ของ Treatment A, B และ C ในการทดลองวิธี TB-NaOCl-80 15
ตารางที่ 5 ค่าจากวิธี TB-NaOCl-80 เพื่อการคำนวณ Relative Sensitivity 18
ตารางที่ 6 ผลจากวิธี 2.4.1 "การทดลอง TB-NaOCl" .....ภาคผนวก ก
ตารางที่ 7 ผลจากวิธี 2.4.2 "การทดลอง TB-NaOCl-80" .....ภาคผนวก ข

คำอธิบายศัพท์/คำย่อ

AFB: แบคทีเรียกลุ่ม acid-fast bacilli

NaOCl: สารไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite)

TB: วัณโรค (tuberculosis)

Tween 80: ชื่อทางการค้าของ Polyoxyethylene Sorbitan Monocleate (polyoxyethylene sorbitan monooleat) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม surfactant

TB-NaOCl: ชื่อเฉพาะของวิธี หรือ กลุ่มทดลอง (treatment) หนึ่งที่ใช้ NaOCl แต่ไม่ได้ใช้ Tween 80

TB-NaOCl A, B หรือ C: ชื่อเฉพาะของกลุ่มทดลอง (treatment) A, B หรือ C

TB-NaOCl-80: ชื่อเฉพาะของวิธี หรือ กลุ่มทดลอง (treatment) หนึ่งที่มีการใช้ Tween 80

TB-NaOCl-80 A, B หรือ C: ชื่อเฉพาะของกลุ่มทดลอง (treatment) A, B หรือ C

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

วัณโรค (tuberculosis, TB) เป็นโรคร้ายแรง ที่ก่อปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข, สังคม และเศรษฐกิจ วัณโรคเป็นโรคติดเชื้อที่ทำให้มีผู้เสียชีวิตมากที่สุดในโลก (Laszlo, 1996; WHO, 2003) ผู้ป่วยรายใหม่ทั่วโลกแต่ละปีสูงถึง 8 ล้านราย และมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 1.9 ล้านคน/ปี (WHO, 2003). องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ยังได้สรุปว่า TB (1) เป็นสาเหตุที่ทำให้ประชาชน (ทั้งเด็กและผู้ใหญ่) เสียชีวิตมากกว่าโรคติดเชื้อชนิดอื่นใด (2) เกิดขึ้นมากที่สุด (95%) ในประเทศกำลังพัฒนา (3) แม้แต่ประเทศที่พัฒนาแล้วก็ยังมีอัตราการติดเชื้อเพิ่มสูงขึ้น และกลับมาเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ (4) เป็นโรคที่ทำให้ผู้ป่วยเอดส์เสียชีวิตมากที่สุด (5) TB เป็นโรคสำคัญที่ทำให้เด็กป่วย และเสียชีวิตจำนวนมาก โดยเฉพาะจากพ่อแม่ป่วยด้วยเอดส์ (ไม่มีรายงานตัวเลขในแต่ละปี) (WHO, 2003).

การเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยเอดส์มีผลให้จำนวนผู้ไว (sensitive) ต่อวัณโรคมีเพิ่มขึ้น ประกอบกับสถานการณ์เชื้อดื้อยาที่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ทำให้อุบัติการของวัณโรคทวีความรุนแรงสูงขึ้นกว่าแต่ก่อนในภาพรวมของประเทศทั่วโลก การเกิดเชื้อดื้อยาหลายขนานของ *M. tuberculosis* เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยเอดส์ และเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดผู้ป่วยรายใหม่ในประเทศกำลังพัฒนา (Cohn, Bustreo and Raviglione, 1997; Davies, 1996; Laszlo, 1996; WHO, 1999) วัณโรคจึงเป็นโรคติดต่อร้ายแรงโรคหนึ่งที่สำคัญทางสาธารณสุข

กระทรวงสาธารณสุขรายงานว่า จากข้อมูลย้อนหลังระยะเวลา 10 ปี พบว่าสถานการณ์วัณโรคเริ่มมีแนวโน้มลดลงอย่างช้า โดยต่ำสุดในปี พ.ศ. 2534 คือมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่เพียง 76 คน/100,000 คน และกลับมาสูงขึ้นในปี พ.ศ. 2535-2536 คือเป็น 85 คน/100,000 คน ซึ่งคาดว่าได้ผลกระทบจากการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ จากนั้นจำนวนผู้ป่วยรายใหม่มีทั้งเพิ่มและลงในแต่ละปีอย่างไม่แน่นอน สอดคล้องกับจำนวนขึ้นลงของผู้ป่วยโรคเอดส์ของประเทศ คือปี พ.ศ. 2543 มีผู้ป่วยประมาณ 70 คน/100,000 คน โดยมีผู้ป่วยรายใหม่ทั้งประเทศประมาณ 1 แสนคน และคาดว่าผู้ไม่รู้ว่าตัวเองป่วยด้วยโรคนี้ 20,000-30,000 คน ในปี พ.ศ. 2543-2545 ดังนั้นปัญหาวัณโรคจึงยังเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย (และอีกหลายประเทศในเอเชีย มีผู้ป่วยประมาณ 62% ของทั้งโลก)

วิธีการวินิจฉัยพื้นฐานที่ใช้ในโครงการควบคุมวัณโรคสมัยใหม่ และได้รับการแนะนำ/รับรองจาก Foulds and O'Brien (1998), WHO และ Centers for Disease Control and Prevention (CDC) แห่งสหรัฐอเมริกาคือ การตรวจเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่เรียกว่า Ziehl-Neelsen staining (Laszlo, 1996, WHO, 1999).

แม้ว่ามีวิธีใหม่ในการวินิจฉัยโรคที่ทราบผลเร็วขึ้น (เช่น radiometric technology, genetic probes, immunoassay of mycobacterial antigens, และ tuberculin skin test) แต่ค่าใช้จ่ายในการตรวจ และดูแลระบบที่สูงขึ้นกว่าวิธีดั้งเดิมก็เป็นปัญหาสำคัญต่อการนำไปใช้จริงในประเทศกำลังพัฒนา ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ใช้วิธีการตรวจสอบเบื้องต้นแบบดั้งเดิมที่เรียก Ziehl-Neelsen staining test ในการวินิจฉัย และตรวจสอบอาการผู้ป่วยทุกราย การปรับปรุงวิธีทดสอบให้สามารถใช้เชิงปฏิบัติได้จริงจึงเป็นแนวทางที่ควรได้รับความสนใจพัฒนา เพื่อประโยชน์ต่อประชาชนส่วนใหญ่ของโลกที่อยู่ในประเทศกำลังพัฒนา

Ziehl-Neelsen staining test ไม่เป็นแต่เพียงวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายที่สุด แต่ยังเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดในการตรวจตัวอย่างทางคลินิค จึงใช้เป็นข้อมูลการวินิจฉัยลำดับแรกสำหรับการบ่งชี้การติดเชื้อ *Mycobacterium* spp. Ziehl-Neelsen staining test ยังสามารถประมาณปริมาณแบคทีเรียสาเหตุวัณโรคได้อีกด้วย จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการประเมินระดับเซลล์ในผู้ป่วยเพื่อประโยชน์ในการรักษา และสำรวจการแพร่กระจายของโรค ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกของ Ziehl-Neelsen staining test ถูกพิจารณาว่าติดเชื้อวัณโรค เพราะสามารถแพร่โรคได้ โดยการไอ, จาม หรือแม้แต่ร้องเพลง และพูดคุย

แม้ว่า Ziehl-Neelsen staining test เป็นวิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการที่เร็วคือสามารถทราบผลภายใน 1 วัน (วิธีที่ให้ยืนยันสมบูรณ์ใช้เวลา 4 สัปดาห์) แต่มีข้อจำกัดคือ ความไว (sensitivity) ต่ำ (ต้องมีอย่างน้อย 10,000 acid-fast bacilli (AFB) / มล. ของเสมหะ) อีกทั้งได้มีรายงานว่าผู้ป่วยวัณโรค (pulmonary tuberculosis) ที่ให้ผลบวกของการทดสอบนี้มีเพียง 50-80% (American Thoracic Society Medical Section of American Lung Association, 1990).

ดังนั้นจึงมีความต้องการเร่งด่วนในการพัฒนาวิธีการรวดเร็ว ให้ความไวสูง และมีความเฉพาะมาทดแทน Ziehl-Neelsen staining ที่ใช้กันทั่วโลก ดังที่เสนอโดย Foulds and O'Brien (1998) and WHO recently (Kochi, 1999). ที่จริงแล้ว มีการวิจัยหลายงานที่พยายามปรับปรุง Ziehl-Neelsen staining ให้ดีขึ้น (Gebre *et al.*, 1995; Githui *et al.*, 1993; Habeenzu, Ipuge *et al.*, 1996; Lubasi and Fleming, 1998; Harries *et al.*, 1998; Huebner *et al.*, 1997; Laszlo, 1996; Nguyen *et al.*, 1999; Rattan *et al.*, 1994; Samb, *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997; VanDeun and Portaels, 1998; Wilkinson and Sturm, 1997). วิธีการพัฒนา Ziehl-Neelsen staining ให้เป็น fluorescent stain ให้ผลที่ดีขึ้น แต่ประสบอุปสรรคในการนำไปใช้จริงในด้านการจัดหาเครื่องมือที่มีราคาสูงในหลายประเทศ รวมทั้งประเทศไทย (Githui *et al.*, 1993; Kupper *et al.*, 1995; Woods, *et al.*, 1995).

การวิจัยพัฒนาวิธีการเพื่อแทน Ziehl-Neelsen staining test แบบดั้งเดิมสามารถใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ย่อย (กรด, ตัวรีดิวซ์ เป็นต้น) ได้ เพราะ *Mycobacterium tuberculosis* มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม และสารเคมีสูงกว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมด สารเคมีที่ใช้เพื่อการย่อย

(digestion) และหยุดการปนเปื้อนให้ผลที่ดีในการแยก และเพาะเลี้ยง *M. tuberculosis* จากตัวอย่างทางคลินิก (American Thoracic Society Medical Section of American Lung Association, 1990). แนวทางหนึ่งที่เพิ่มประสิทธิภาพของ Ziehl-Neelsen staining คือการเพิ่มจำนวนเซลล์ในตัวอย่างก่อนทำการเสมียร์ ซึ่งต้องเปลี่ยนให้ตัวอย่างเสมหะมีความหนืดลดลง วิธีการที่ง่าย และประหยัดให้ความเป็นไปได้สูงในการนำไปใช้คือ การย่อยเสมหะ ซึ่งส่วนใหญ่คือ โปรตีน ด้วยไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite, NaOCl) ผลงานวิจัยด้านนี้หลายงานให้ผลที่ดีในเชิงปรับปรุง (Habeenzu, Lubasi and Fleming, 1998: Miorner *et al.*, 1996; Rattan *et al.*, 1994).

Hypochlorite (NaOCl)

ความปลอดภัย และความเหมาะสมในการใช้ NaOCl มีรายงานดังนี้ Rutala and Weber (1997) กล่าวว่า NaOCl ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) นานมากกว่า 100 ปี NaOCl มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง และให้ chlorate (ClO_3^-) และ HCl จึงใช้เป็นสารฆ่าเชื้อที่ดีหลายประการ คือ ฆ่าเชื้อได้เร็ว, กว้าง (broadspectrum), คงตัว, ใช้ง่าย, ละลายน้ำได้ดี, คงตัวในน้ำประปาในเวลาที่เหมาะต่อการใช้, ไม่เป็นพิษร้ายในความเข้มข้นใช้งานทั่วไป (ความเข้มข้นสูงมากสามารถใช้ฆ่าเชื้ออากาศในห้องได้ ซึ่งอันตรายหากสูดดม), ไม่มีสารพิษเหลือตกค้าง, ไม่มีสี, ไม่ทำให้เกิดรอยเปื้อน, ทนต่อสารซักฟอกทั้ง (anionic and non-ionic) และราคาถูก รูปที่แสดงกิจกรรม (active) คือ undissociated hypochlorous acid (HOCl) ไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เป็นพิษต่อจุลินทรีย์เกือบทั้งหมด โดยเฉพาะไวรัส และเซลล์ร่างกายของแบคทีเรีย (ซึ่งทั้งสองนี้ไวต่อ NaOCl มากกว่าแบคทีเรียที่สร้าง endospore, ฟังไจ และโปรโตซัว) ประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ลดลงเมื่อมีโลหะหนัก, สารอินทรีย์, รังสียูวี และ biofilm ในสภาพที่มีอุณหภูมิ และพีเอชต่ำ มีการใช้ในน้ำประปาเพื่อฆ่าจุลินทรีย์กลุ่ม legionella เพื่อฆ่าเชื้อในเสื้อผ้าที่ใช้ในโรงพยาบาล, เพื่อกำจัดเชื้อในบริเวณที่มีเลือดหก อุปกรณ์ น้ำเสียของโรงพยาบาล หรือคลินิก แม้ว่ามีสารฆ่าเชื้อขึ้นมาอีกหลายชนิด แต่ NaOCl ก็ยังมีใช้ในปัจจุบันทั่วไป

ความสำคัญของ NaOCl ต่อเสมหะ และการติดเชื้อ

NaOCl สลายโปรตีนโดยการเกิดปฏิกิริยากับ side chain ของกรดอะมิโน (Hawkins and Davies, 1998) หรือโดยการทำให้เกิดออกซิเดชั่นของโปรตีน ทำให้เกิด nitrogen-centered radical และ chloramine ซึ่งส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนถูกย่อยสลาย

ผลของ NaOCl นอกจากทำให้เสมหะมีความหนืดลดลง โดยการย่อยโปรตีนแล้ว ยังมีผลทำลายเซลล์ *M. tuberculosis* ที่อยู่ในเสมหะอีกด้วย ซึ่งนับเป็นเรื่องสำคัญ เพราะตัวอย่างเสมหะจัดว่าเป็นแหล่งแพร่เชื้อ (Habeenzu, Lubasi and Fleming, 1998; Nyirenda *et al.*, 1998; Samb, *et al.*, 1997) ดังนั้นหากมีการใช้ NaOCl ในการเตรียมตัวอย่างเสมหะ ผลดีที่สำคัญประการหนึ่งคือ ช่วยลดการติดเชื้อของเจ้าหน้าที่ หรือผู้เกี่ยวข้องกับห้องปฏิบัติการตรวจวัณโรค

Tween 80

แม้ว่า NaOCl สามารถย่อยสลายกรดไขมันหลายชนิด (oleic, linoleic, linolenic, และ arachidonic) และ phosphatidylcholine acyl chains ได้ (Panasenko *et al.*, 1996; Wang and Tao, 1998) แต่ยังคงมีลิพิดอื่นอยู่ในเสมหะ (Kattan *et al.*, 1993) และรบกวนการปั่นเหวี่ยงเซลล์ให้ตกตะกอน ดังนั้นการใส่สารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น Tween 80 น่าจะช่วยทำให้เซลล์ในตัวอย่างเสมหะเข้มข้นได้

สารเคมี Tween 80 เป็นชื่อทางการค้าของ polyoxyethylene sorbitan monooleate (polyethylene glycol sorbitan monooleate, polysorbate 80) มี oleic acid 70% Polyoxyethylene sorbitan monooleate จัดอยู่ในกลุ่ม polysorbate ที่ไม่เป็นพิษ และไม่ทำให้เกิดอาการระคายเคือง Tween เป็นชื่อทางการค้าของ ICI Americas Inc., USA. Tween 80 ใช้เป็น food additive มีสมบัติเป็นสารในกลุ่ม non-ionic surfactant หรือ detergent ที่ช่วยลดแรงตึงผิว ใช้ผสมในยาสำหรับกิน เป็น pharmaceutical excipient

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ ปรับปรุงความไวของวิธี Ziehl-Neelsen staining test โดยการปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างให้มีค่า specificity สูงขึ้น ด้วยการใช้ hypochlorite (NaOCl) และ Tween 80 โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปปรับใช้ได้จริงตามศักยภาพของห้องปฏิบัติการของศูนย์วัณโรค

สมมุติฐานการวิจัย

การใช้ (โซเดียม) ไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) แบบ commercial grade อย่างเดียว หรือร่วมกับ Tween 80 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจ *M. tuberculosis* ได้ดีกว่าวิธีปกติที่ใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการของศูนย์วัณโรค (เขต 5) โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นน่าจะช่วยให้การเตรียมตัวอย่างเสมหะมีการสะสมของเซลล์แบคทีเรีย *M. tuberculosis* หลังการปั่นเหวี่ยง และยังคงเอกลักษณ์การติดสี carbol fuschsin ทำให้สามารถตรวจพบเซลล์ได้ แม้ตัวอย่างมีเซลล์น้อย ซึ่งวิธีเดิมอาจให้ผลตรวจเป็นลบ โดยวิทยาศาสตร์ของสารเคมีทั้งสองคือ NaOCl สามารถละลายให้ตัวอย่างมีความหนืดลดลง และ Tween 80 ช่วยให้แรงตึงผิวของตัวอย่างเสมหะลดลง เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วตัวอย่างจึงมีความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น สำรวจได้เร็ว และชัดเจนขึ้นผ่านกล้องจุลทรรศน์

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการวัดความเป็นไปได้ในการปรับปรุงวิธีการเตรียมตัวอย่างเสมหะ เพื่อการเตรียมสไลด์ตัวอย่างแบบ Ziehl-Neelsen staining test โดยใช้สารเคมีสองชนิดคือ NaOCl และ Tween 80 ที่เชื่อว่าสามารถทำให้ sensitivity ของการทดสอบดีขึ้น เหตุผลหนึ่งที่เลือก

ใช้ NaOCl คือต้องการให้แบคทีเรียสาเหตุของโรคตาย เพื่อเป็นการลดโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อของเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องในการตรวจรักษาของห้องปฏิบัติการ สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้เลือกคุณภาพต่ำ เพราะคำนึงเรื่องความเป็นไปได้ในการนำไปใช้จริง และตามข้อจำกัดของทุนวิจัยที่ได้ โดยอยู่ในระดับที่ให้ผลที่เชื่อถือได้ สถานที่ทำการวิจัยเลือกที่ ศูนย์วัณโรคเขต 5 เนื่องจากความตระหนักในเรื่องความรุนแรงของโรค

ข้อตกลงเบื้องต้น

เนื่องจากข้อจำกัดของงบวิจัย การดำเนินงานบางส่วนจึงเป็นส่วนที่เป็นงานประจำของเจ้าหน้าที่ของศูนย์วัณโรคเขต 5 นครราชสีมา ดังนั้นจึงได้ตัวอย่างที่เป็นกึ่งเสมหะร่วมมาด้วย ซึ่งต่างไปจากวัตถุประสงค์ อย่างไรก็ตาม ได้ดำเนินการวิเคราะห์แยก และรวมความแตกต่างของตัวอย่างที่เป็นเสมหะ และกึ่งเสมหะ

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1) การทดสอบผลของ NaOCl และ Tween 80: มีด้วยกัน 3 treatment ในการเตรียมตัวอย่าง คือ (A) แบบที่ใช้ NaOCl, (B) แบบที่ใช้ทั้ง NaOCl และ Tween 80 และ (C) แบบไม่เตรียมตัวอย่าง (ไม่มีการใช้ NaOCl หรือ Tween 80 ซึ่งเป็นวิธีปกติที่ใช้ของห้องปฏิบัติการ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน แล้วดูดตะกอนที่ได้ไปเตรียมเป็นสไลด์ตามวิธีปกติ

2) การทดสอบผลของความเข้มข้น NaOCl: เนื่องจากระดับความเข้มข้นของ NaOCl ก่อให้เกิดปัญหาระคายเคืองของผิวหนัง และเยื่อบุผิวของผู้ปฏิบัติ จึงได้ทดสอบความแตกต่างของการเจือจางด้วยน้ำต่อผล จึงแบ่ง treatment เป็น 3 วิธีคือ (A) เติมน้ำหลังตัวอย่างสัมผัส NaOCl แล้ว 15 นาที (B) เติมน้ำพร้อมกับที่ตัวอย่างสัมผัส NaOCl และ (C) วิธีปกติ จากนั้นเปรียบเทียบผลความแตกต่างของทั้งสามวิธี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

การควบคุม ดูแล รักษาผู้ป่วย หรือต้องสงสัยป่วยเป็นวัณโรคดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายของห้องปฏิบัติการของศูนย์วัณโรคในประเทศไทยทั่วประเทศ

คำสำคัญ

tuberculosis (TB), Ziehl-Neelsen, hypochlorite, NaOCl, Tween 80, diagnosis, sputum smear, sample preparation, laboratory infection, sensitivity

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สมมุติฐานการวิจัย

การใช้ NaOCl หรือ NaOCl และ Tween 80 ในการเตรียมตัวอย่างตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test ที่ใช้ทั่วประเทศ น่าจะช่วยให้การตรวจหา *M. tuberculosis* จากเสมหะดีขึ้น

2.2 แหล่งที่มาของข้อมูล

ข้อมูลได้จากศูนย์วัณโรคเขต 5 นครราชสีมา ที่ให้บริการตรวจ และรักษาผู้ป่วยวัณโรคของจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดใกล้เคียง ข้อมูลเป็นจำนวนเซลล์ *M. tuberculosis* ที่ได้จากการนับโดยประมาณผ่านกล้องจุลทรรศน์ของตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยหรือผู้สงสัยว่าป่วยเป็นวัณโรค ซึ่งเตรียมด้วยวิธีมาตรฐาน Ziehl-Neelsen staining test (หรือ acid-fast direct smear test) ที่ WHO, CDC แห่งสหรัฐอเมริกา, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) และหน่วยงานอื่นแนะนำว่าเป็นหนึ่งในวิธีมาตรฐาน ที่ใช้กันแทบทุกประเทศทั่วโลก CDC (2003)

หลักการของวิธีทดสอบคือ เนื่องจากเซลล์ของ *M. tuberculosis* สามารถยึดสีย้อม carbol fuschsin ให้ติดนานได้ แม้ว่าจะล้างออกด้วย acid alcohol หรือ sulfuric acid จึงเรียกคุณสมบัติของแบคทีเรียนี้ว่า acid-fast เมื่อ *M. tuberculosis* ติดสีย้อมดังกล่าวแล้ว จะไม่ติดสี methylene blue ที่ย้อมทับ ผลบวกคือ เซลล์ *M. tuberculosis* ติดสีแดง/ชมพู ของ carbol fuschsin เซลล์แบคทีเรียอื่น ถ้ามี ติดสีน้ำเงินของ methylene blue

ตัวเลขของข้อมูลมีเพียง 4 ค่า คือ 0, +1, +2 และ +3 ที่แทนจำนวนเซลล์ที่นับได้โดยประมาณ โดย +3 มีจำนวนเซลล์มากกว่า +2 ประมาณ 10 เท่า และในทำนองเดียวกัน +2 มากกว่า +1 ประมาณ 10 เท่า ข้อมูลที่เป็นบวกทั้งสามค่า (+3, +2 และ +1) ถือว่าเจ้าของตัวอย่างมีเซลล์ของ *M. tuberculosis* และยิ่งมีจำนวนเซลล์มากเท่าใด ยิ่งมีโอกาสแพร่เชื้อได้มากเท่านั้น ข้อมูล 0 หมายถึง ตรวจไม่พบเซลล์ และข้อมูล 0 หมายความว่าเจ้าของตัวอย่าง "อาจไม่ติดเชื้อ" มีการใช้ระบบ positive/negative control ทุกครั้งที่มีการทดสอบ เพื่อควบคุมผล

ความหมายของตัวอย่างที่ให้ผลลบคือ ไม่พบเห็นเซลล์ที่ติดสีของ carbol fuschsin ภายใน 100 วงภาพที่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายรวม 1000X ตัวอย่างที่ให้ผลบวกคือ เซลล์ *M. tuberculosis* ติดสีแดง/ชมพูของ carbol fuschsin ตัดกับพื้นหลังสีน้ำเงิน เซลล์นี้อาจเป็นท่อน โค้ง เม็ดก็ได้ และอาจอยู่เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่มก็ได้

ระบบตัวเลขของข้อมูลนี้ใช้เป็นมาตรฐานของห้องปฏิบัติการของศูนย์วัณโรค ข้อมูลถือว่าเป็น ordinal scale ที่มีความถูกต้อง เพราะผู้ทำการเตรียมตัวอย่างตาม Ziehl-Neelsen staining test ผ่านการอบรมโดยเฉพาะ และรับผิดชอบดำเนินการเป็นประจำอยู่แล้ว ณ ศูนย์วัณโรคเขต 5

2.2.1 ขั้นเตรียมตัวอย่างของวิธี Ziehl-Neelsen Staining Test

- ใช้สไลด์แก้วแผ่นใหม่ทุกครั้ง สไลด์แก้วต้องทำความสะอาดโดยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ และเช็ดให้แห้ง หรือผ่านเปลวไฟ ซึ่งช่วยลดการเกิด "น้ำมัน/ไขมัน" ที่รบกวนผลการตรวจ (ไม่มีการนำสไลด์เก่ากลับมาใช้)
- เปิดภาชนะเก็บตัวอย่างเสมหะอย่างช้าเพื่อเลี่ยงการกระจายตัวอย่างในอากาศ
- ใช้แท่งไม้เพื่อแตะส่วนของตัวอย่างเสมหะมาป้ายเป็นวงกลางแผ่นแก้วสไลด์ ให้มีขนาดยาวประมาณ 2 ซม. และมีความหนาของรอยเสมียร์ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ สามารถอ่านตัวหนังสือที่มองผ่านรอยเสมียร์ได้ และมีความชัดใกล้เคียงกัน (เสมหะที่ยิ่งข้นขาว ยิ่งมีโอกาสพบจำนวนแบคทีเรียสูง)
- ปล่อยให้รอยเสมียร์แห้งเองเป็นเวลาประมาณ 15-30 นาที (ไม่ควรใช้ไฟผาเพื่อให้รอยเสมียร์แห้งเร็ว เพราะทำให้เกิดหยดตัวอย่างในอากาศได้)
- เมื่อรอยเสมียร์แห้งแล้ว ให้ตรึงรอยเสมียร์โดยผ่านเปลวไฟสีน้ำเงินของตะเกียงบุนเสน โดยใช้ปากคีบ และผ่านเปลวไฟสามครั้ง ให้ด้านเสมียร์อยู่บน (ไม่เผารอยเสมียร์มากเกินไป เพราะทำให้เซลล์เสียหายได้ และถ้าผ่านเปลวไฟน้อยไป อาจทำให้รอยเสมียร์หลุดลอกได้ง่าย ในช่วงล้างสี)

2.2.2 ขั้นย้อมสีตามวิธี Ziehl-Neelsen Staining Test

1) วางสไลด์ตัวอย่างบนราง ที่วางอยู่เหนืออ่างน้ำ ให้รอยเสมียร์อยู่ด้านบน และวางให้เป็นแบบเดียวกัน เพื่อง่ายต่อการสังเกต และปฏิบัติเช่นเดียวกัน
2) ไม่วางสไลด์ชิดติดกัน เพื่อเลี่ยงการไหลของตัวอย่างจากสไลด์หนึ่งไปอีกสไลด์หนึ่ง
3) ทุกครั้งที่ย้อมต้องมีตัวอย่างควบคุมทั้งบวก และลบ (ไม่ควรย้อมเกิน 12 สไลด์/ครั้ง)
4) หยดสีย้อมให้ท่วมรอยเสมียร์
5) ใช้เปลวไฟจากตะเกียงบุนเสน หรือตะเกียงแอลกอฮอล์ลนด้านล่างสไลด์อย่างช้า จนกระทั่งเห็นไอของ carbol fuschsin ลอยขึ้น.
6) ให้ความร้อนระดับนี้นานประมาณ 5 นาที เพื่อให้โมเลกุลของ carbol fuschsin ซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ (ไม่ควรให้ความร้อนจนเกิดการเดือด เพราะทำให้รูปร่างของเซลล์เปลี่ยน ซึ่งอาจทำให้ได้ผลลบปลอม)
7) ล้างสีออกด้วยน้ำ จนกระทั่งไม่มีสีออกเพิ่ม ระวังไม่ให้รอยเสมียร์หลุดออก
8) เอียงสไลด์ให้น้ำส่วนเกินออก เพื่อไม่ให้สารที่ใช้เจือจางเกิน

9) หยดรอยเสมียร์ด้วย decolorizing solution เช่น acid alcohol นาน 3 นาที หากนานไม่พอ องค์ประกอบของเสมหะยังคงติดสี carbol fuschsin และอาจทำให้ได้ "ผลลบปลอม"

10) ล้างออกด้วยน้ำ โดยระวังรอยเสมียร์หลุด และเอียงสไลด์เพื่อให้น้ำส่วนเกินออก หากเสมียร์ทั้งหมดยังคงมีสีแดง/ชมพูของ carbol fuschsin ให้ล้างออกด้วย decolorizing solution ซ้ำอีก เป็นเวลา 1 ถึง 30 นาที

11) ย้อมทับ โดยการหยดรอยเสมียร์ด้วย methylene blue นาน 1 นาที

12) ล้างออกด้วยน้ำอีกครั้ง โดยระวังรอยเสมียร์หลุด และเอียงสไลด์ให้น้ำส่วนเกินออก และปล่อยให้แห้งเอง (ต้องไม่ซับน้ำส่วนเกินออก)

2.2.3 <u>แนวปฏิบัติในการสำรวจผ่านกล้อง</u> ที่ได้ดำเนินการคือ

1) ตัวอย่างแห้งสนิท
2) รอยเสมียร์ไม่โดนแสงแดด เพราะทำให้สีจางได้
3) หากด้านหลังของสไลด์เปื้อน ให้ล้างออกด้วยผ้าชุบแอลกอฮอล์
4) สารทั้งหมดที่ใช้ต้องระบุวันหมดอายุ และไม่มีการใช้ที่หมดอายุแล้ว
5) หากสาร carbol fuschsin มีตะกอนให้ กรองตะกอนของสาร carbol fuschsin ออกก่อน ถ้ายังคงมีตะกอนอยู่อีก ให้ทิ้ง
6) ผู้เข้ารับการตรวจผ่าน "เสมหะ (sputum หรือ phlegm)" จากปอดลงในภาชนะที่ปลอดเชื้อ และปฏิบัติในห้องที่เตรียมเฉพาะ ตัวอย่าง และภาชนะตัวอย่างอาจแพร่เชื้อได้ จึงควรต้องฆ่าเชื้อ และทิ้งอย่างเหมาะสม
7) หลังจากบันทึกผลเรียบร้อยแล้ว ตัวอย่างเสมหะ, ภาชนะ และสไลด์ ถูกนำไปฆ่าเชื้อโดยไม่มีการนำภาชนะ และสไลด์กลับมาใช้อีก เพื่อเลี่ยงความผิดผลาด ในกรณีการฆ่าเชื้อเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ การฆ่าเชื้อเป็นได้ทั้งเผา, ต้ม และนึ่งด้วยความดัน
8) มีการใช้สไลด์ตัวอย่างควบคุมทั้งผลบวก และลบทุกครั้ง

2.3 วรรณกรรมที่เป็นพื้นฐานในการออกแบบการทดลอง

Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) รายงานว่า การใช้ NaOCl ช่วยเพิ่ม sensitivity ของ Ziehl-Neelsen staining test จาก 43.4% เป็น 76.3% โดยการใช้ 4-5% NaOCl ผสมกับ 1-2 มล. ของตัวอย่างเสมหะในปริมาณที่เท่ากัน และเขย่าให้ผสมกันในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มล. ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10-15 นาที โดยมีการเขย่าเป็นช่วงเพื่อให้ผสมเข้ากันดี จากนั้นจึงใส่ 8 มล. ของน้ำ และนำไปเหวี่ยงเป็นเวลา 15-20 นาที หลังจากทิ้งส่วนใส ส่วนข้นที่ก้นหลอดผสมกับหยดน้ำที่ค้าง และนำไปทำเสมียร์ต่อไปตามวิธี Ziehl-Neelsen staining

2.4 การออกแบบวิจัย และวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

เพื่อให้ทราบผลของการใช้ NaOCl และ NaOCl ร่วมกับ Tween 80 งานวิจัยนี้ถูกออกแบบให้มีการทดลอง 2 ช่วง คือ การทดสอบว่า (1) NaOCl และ (2) NaOCl ร่วมกับ Tween 80 มีผลดีต่อการตรวจพบ *M. tuberculosis* หรือเรียก AFB (acid-fast bacilli) ตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test ช่วงแรกเรียก TB-NaOCl และช่วงที่สองเรียก TB-NaOCl-80

การเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมดดำเนินการเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ "ศูนย์วัณโรคเขต 5 นครราชสีมา" ซึ่งได้รับการฝึกในการตรวจแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ตามมาตรฐานของกรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ตัวอย่างเสมหะได้จากผู้เข้ารับการตรวจที่ศูนย์วัณโรคเขต 5

2.4.1 **"การทดลอง TB-NaOCl"**

การทดลอง TB-NaOCl ถูกออกแบบเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลของ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ที่ใส่น้ำหลังการผสมกันของเสมหะและ NaOCl และเพื่อทดสอบว่าน้ำที่ใส่ให้ผสมกับเสมหะก่อนผสมกับ NaOCl มีผลแตกต่างกันหรือไม่ การวิจัยนี้ได้ปรับไปตามความเหมาะสมของศูนย์ และทุนวิจัยด้วยทำให้มีสภาพต่างไปจากของ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ดังนี้คือ (1) ปริมาณเสมหะเป็น 500 ไมโครลิตร เพราะโดยเฉลี่ยเสมหะของคนไทยมีในระดับนี้ (2) ใช้ NaOCl ที่เป็น commercial grade เพื่อให้เกิดความประหยัด เมื่อนำไปใช้จริง แต่ได้คำนวณให้มีความเข้มข้นของ NaOCl ประมาณ 5%

<u>วิธี "TB-NaOCl"</u> มีด้วยกัน 3 กลุ่ม (Treatment)

2.4.1.1 TB-NaOCl A

1. ผสม 500 ไมโครลิตรของ 5% NaOCl กับ 500 ไมโครลิตรของเสมหะ ในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มล.
2. เขย่าเป็นเวลา 1 นาทีที่เวลา 0, 5 และ 9 นาที
3. เติมน้ำกลั่น 4 มล., เขย่า และปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
4. เทส่วนใส และแตะส่วนที่อยู่ก้นหลอดด้วยแท่งไม้ เพื่อนำไปทำเสมียร์บนสไลด์, ย้อมสี และนับตามวิธี Ziehl-Neelsen staining ตามมาตรฐานศูนย์วัณโรค

2.4.1.2 TB-NaOCl B

- ปฏิบัติเช่นเดียวกับ treatment TB-NaOCl A แต่เปลี่ยนการใส่ 4 มล. ของน้ำกลั่นเป็นใส่พร้อมกับ NaOCl โดยใช้ตัวอย่างเสมหะเดียวกับที่ใช้ใน treatment "TB-NaOCl A"

2.4.1.3 TB-NaOCl C

- ปฏิบัติตาม Ziehl-Neelsen staining มาตรฐานของศูนย์วัณโรค โดยใช้ตัวอย่างเสมหะเดียวกันกับ treatment "TB-NaOCl **A** และ **B**" เพื่อเป็น treatment เปรียบเทียบ (ไม่มีการเติมสารใด และไม่ปั่นเหวี่ยง) ซึ่งเป็นวิธีปกติที่ศูนย์ฯ ใช้อยู่

2.4.2 **"การทดลอง TB-NaOCl-80"**

"การทดลอง TB-NaOCl-80" ถูกออกแบบให้ มีการใช้ NaOCl ร่วมกับ Tween 80 เมื่อผสมกันเป็นเวลา 10 นาทีจึงใส่น้ำนำไปปั่นเหวี่ยง และส่วนข้นที่ได้นำไปทำเสมียร์และย้อมสีตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test

"TB-NaOCl-80" มีด้วยกัน 3 กลุ่ม (Treatment)

2.4.2.1 TB-NaOCl-80 A

1. ผสม 1000 ไมโครลิตรของ 5% NaOCl กับ 1000 ไมโครลิตรของเสมหะ และ 3 หยดของ Tween 80 ในหลอดฝาเกลียวขนาด 10 มล.
2. เขย่าเป็นเวลา 1 นาทีที่เวลา 0, 5 และ 9 นาที
3. เติมน้ำกลั่น 4 มล., เขย่า และปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
4. เทส่วนใส และแตะส่วนที่อยู่ก้นหลอดด้วยแท่งไม้ เพื่อนำไปทำเสมียร์บนสไลด์, ย้อมสี และนับตามวิธี Ziehl-Neelsen staining ตามมาตรฐานศูนย์วัณโรค

2.4.2.2 TB-NaOCl-80 B

- ปฏิบัติเช่นเดียวกับ "TB-NaOCl-80 **A**" แต่ไม่มี Tween 80

2.4.2.3 TB-NaOCl-80 C

- ปฏิบัติตาม Ziehl-Neelsen staining มาตรฐานของศูนย์วัณโรค โดยใช้ตัวอย่างเสมหะเดียวกันกับ treatment "TB-NaOCl-80 **A** และ **B**" เพื่อเป็น treatment เปรียบเทียบ (ไม่มีการเติมสารใด และไม่ปั่นเหวี่ยง) ซึ่งเป็นวิธีปกติที่ศูนย์ฯ ใช้อยู่

2.5 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้ SPSS และใช้ one-way analysis of variance ตามรูปแบบของการทดลอง เนื่องจากข้อมูลเป็นตัวเลข ซึ่งมีด้วยกันทั้งหมด 4 ค่า คือ 0, 1, 2 และ 3 ซึ่งเรียกข้อมูลแบบนี้ว่า ordinal scale (ที่ใช้บอกความแตกต่างได้ แต่บอกขนาดของความแตกต่างไม่ได้) จึงใช้

สถิติวิเคราะห์แบบ non-parametric test โดยใช้ Kruskal-Wallis H Test (ซึ่งเทียบเท่ากับ one-way ANOVA) สำหรับบ่งชี้ความแตกต่างระหว่าง treatment ตั้งแต่ 3 ขึ้นไป และใช้ Mann-Whitney U test (ซึ่งเทียบเท่ากับ t-test) ในการเปรียบเทียบระหว่าง 2 treatment

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลข้อมูลก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ

3.1.1 ผล "TB-NaOCl"

รายละเอียดของข้อมูลที่ได้จาก 2.4.1 "การทดลอง TB-NaOCl" แสดงในภาคผนวก หน้า ก-ง ข้อมูลประกอบด้วยรายชื่อผู้ป่วย ชนิดของตัวอย่าง (เสมหะ หรือ กึ่งเสมหะ), วันที่เข้ารับการตรวจ, และผลการตรวจตาม treatment TB-NaOCl **A**, **B** และ **C** โดยมีจำนวนผู้เข้ารับการตรวจ (N) เท่ากับ 101 ราย (เป็นตัวอย่างเสมหะ 59 ราย และ กึ่งเสมหะ 42 ราย)

3.1.2 ผล "TB-NaOCl-80"

รายละเอียดของข้อมูลที่ได้จาก 2.4.2 "การทดลอง TB-NaOCl-80" แสดงในภาคผนวก หน้า จ-ซ ข้อมูลประกอบด้วยรายชื่อผู้ป่วย ชนิดของตัวอย่าง (เสมหะ), และผลการตรวจตาม treatment TB-NaOCl-80 **A**, **B** และ **C** โดยมีจำนวนผู้เข้ารับการตรวจทั้งหมด 105 ราย (N=105)

3.2 ผลวิเคราะห์ข้อมูลจาก "การทดลอง TB-NaOCl"

3.2.1 ลักษณะของ "Treatment ควบคุม (TB-NaOCl C)"

Treatment TB-NaOCl **C** ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (ปกติ) ให้ผลปกติ และสอดคล้องกับตัวอย่างสไลด์ควบคุม คือสไลด์ควบคุมผลบวก ให้เซลล์ที่ติดสีของ carbol fuschsin และสไลด์ควบคุมผลลบ ไม่พบมีเซลล์ที่ติดสีของ carbol fuschsin

3.2.2 ลักษณะของ "Treatment ดัดแปลง (Treatment TB-NaOCl **A** และ **B**)"

Treatment ดัดแปลงทั้ง TB-NaOCl **A** และ **B** ให้ผลใกล้เคียงกับ treatment ควบคุม (treatment TB-NaOCl **C**) มาก โดยไม่มีความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดย treament ดัดแปลงทั้งสองให้ผลดีกว่า treatment ควบคุมในบางตัวอย่าง และกลับกัน จึงเป็นการพิสูจน์ประการหนึ่งว่าสามารถใช้วิธีดัดแปลงทั้งสองทดแทนได้ และให้ผลเช่นเดียวกับ treatment ควบคุม แต่ไม่เป็นตามสมมุติฐานการวิจัยที่เชื่อว่าวิธีดัดแปลงน่าจะดีกว่า และไม่สอดคล้องกับ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ที่กล่าวว่าค่า sensitivity ที่ดัดแปลงขึ้นนั้นดีกว่า treatment ควบคุม

ผลดังข้างต้นนี้วิเคราะห์จากตัวอย่างที่เป็นทั้งเสมหะ และกึ่งเสมหะ และแม้ว่าจะวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับตัวอย่างที่เป็นเสมหะอย่างเดียว หรือกึ่งเสมหะอย่างเดียวก็ยังให้ผลทำนองเดียวกันคือ ทั้ง treatment ดัดแปลง และ treatment ควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 1

ที่ความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ผลพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่าง treatment ทั้ง 3 (TB-NaOCl **A, B** และ **C**) ไม่ว่าตัวอย่างจะเป็นเสมหะ (N=59), กึ่งเสมหะ (N=42), หรือทั้งเสมหะ และกึ่งเสมหะ (N=101) โดยมีค่า Asymp. Sig. เท่ากับ .985, .858 และ .977 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาคผนวก ฌ-ฎ

ตารางที่ 1 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl โดยวิธี Kruskal-Wallis Test

TB-NaOCl			
Type of Sample	**N**	**Asymp. Sig.** of Treatment A, B & C	**Page (Appendix A)**
Sputum	59	.985	5
Semi-sputum	42	.858	6
Sputum and Semi-sputum	101	.977	7

3.3 ผลวิเคราะห์ข้อมูลจาก "การทดลอง TB-NaOCl-80"

3.3.1 ลักษณะของ "Treatment ควบคุม (TB-NaOCl-80 C)"

Treatment TB-NaOCl **C** ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (ปกติ) ให้ผลปกติ และสอดคล้องกับตัวอย่างสไลด์ควบคุม คือสไลด์ควบคุมผลบวก ให้เซลล์ที่ติดสีของ carbol fuschsin และสไลด์ควบคุมผลลบ ไม่พบมีเซลล์ที่ติดสีของ *carbol fuschsin*

3.3.2 ลักษณะของ "Treatment ดัดแปลง (TB-NaoCl-80 A และ B)"

ผลจากตัวอย่างเสมหะพบว่า treatment ดัดแปลงทั้ง TB-NaOCl-80 **A** และ **B** มีแนวโน้มที่ให้ผลดีกว่า treatment ควบคุม (treatment TB-NaOCl-80 **C**) โดยมีน้อยมากที่ให้ผลแย่กว่า treatment ควบคุม และมีหลายตัวอย่างที่ treatment ควบคุมให้ผลลบ แต่ treatment ดัดแปลงให้ผลบวก โดยแนวโน้มคือ treatment **A** ให้ผลบวกสูงกว่า treatment **B** (มีเพียงไม่ถึง 4% ของตัวอย่างทั้งหมดที่พบว่า treatment ควบคุมให้ผลบวกมากกว่า) ผลโดยสรุปคือ ทั้งสาม treatment (TB-NaOCl-80 **A, B** และ **C**) มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยมีค่า Asymp. Sig. เท่ากับ .000 ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาคผนวก ฏ จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วย Mann-Whitney Test เพื่อเปรียบเทียบว่า treatment คู่ใดต่างกันบ้าง และได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 และภาคผนวก ฐ-ฒ

ตารางที่ 2 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl-80 โดยวิธี Kruskal-Wallis Test

TB-NaOCl-80			
Type of Sample	**N**	**Asymp. Sig.** of Treatment A, B & C	**Page (Appendix A)**
Sputum	105	.000	8

ตารางที่ 3 ค่า Asymp. Sig. ของวิธี TB-NaOCl-80 โดยวิธี Mann-Whitney Test

TB-NaOCl-80			
Treatment	**N**	**Asymp. Sig.** of Treatment A, B & C	**Page (Appendix A)**
A & B	105	.000	9
A & C	105	.000	10
B & C	105	.014	11

ผลการเปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างระหว่าง treatment แต่ละคู่ของวิธี TB-NaOCl-80 แสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่า "ทุกคู่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%" คือ **"A ต่างจาก B"** โดยมีค่า Assymp. Sig. .000, **"A ต่างจาก C"** และ **"B ต่างจาก C"** โดยมีค่า 0.00, และ .014 ตามลำดับ

เมื่อพบว่าทั้งสาม treatment มีความแตกต่าง จึงสามารถใช้ค่า Mean Rank ของแต่ละ treatment เพื่อสรุปว่าวิธีใดดีกว่า จากผลค่า Mean Rank ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Kruskal-Wallis Test ที่ระบุว่า **A, B** และ **C** มีค่า Mean Rank เท่ากับ 209.64, 146.15 และ 118.21 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า treatment ที่ให้ผลดีที่สุด และรองลงมาคือ A และ B ซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานการวิจัย ซึ่งนำไปสู่ความหวังในการพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรียสาเหตุวัณโรคที่ดีขึ้น

ตารางที่ 4 ค่า Mean Rank ของ Treatment A, B และ C ในการทดลองวิธี TB-NaOCl-80

TB-NaOCl-80			
Treatment	**N**	**Mean Rank**	**Page (Appendix A)**
A	105	209.64 [a]	8
B	105	146.15 [a]	8
C	105	118.21 [a]	8
Total	**315**		

หมายเหตุ [a] แสดงว่าค่าที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$)

บทที่ 4
ข้อวิจารณ์

4.1 TB-NaOCl

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการพิสูจน์ว่า NaOCl (treatment TB-NaOCl **A** และ **B**) ที่ออกแบบตามการรายงานของ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) มีประสิทธิภาพการตรวจหา *M. tuberculosis* ได้ดีกว่าวิธีปกติที่ใช้เป็นมาตรฐานของศูนย์วัณโรค (TB-NaOCl **C**) ในขั้นการเตรียมตัวอย่างตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test หรือไม่ ลักษณะของ TB-NaOCl **A** และ **B** โดยสรุปเป็นดังนี้คือ **A** สอดคล้องตามวิธีของ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) คือมีการใส่น้ำกลั่นที่ 0 นาที ภายหลังการผสมกันของเสมหะ และ NaOCl **B** ได้ออกแบบให้เหมือนกับ **A** ต่างตรงที่ใส่น้ำกลั่นที่เวลา 10 นาที หลังการผสมกันของเสมหะ และ NaOCl อุปกรณ์ วิธีการ และขั้นตอนอื่นโดยรวมเหมือนกันทั้ง **A**, **B** และ **C** ผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ว่าวิธี **A** และ **B** ไม่ดีกว่า **C** (วิธีปกติ) ($p<0.05$) ซึ่งต่างจากรายงานดังกล่าว ไม่ว่าตัวอย่างจะเป็นเสมหะ หรือกึ่งเสมหะ (ข้อวิจารณ์ที่ 1) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้สันนิษฐานว่าอาจเกิดความแตกต่างของ NaOCl ที่ต่างกัน โดยไม่น่าจะเป็นเพราะตัวอย่างที่ใช้จำนวนหนึ่งเป็น **"กึ่งเสมหะ"** เพราะว่าจากผลการแยกวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับตัวอย่างที่เป็นเสมหะอย่างเดียว (N=59) หรือ กึ่งเสมหะ (N=42) ให้ผลเช่นเดียวกันกับตัวอย่างที่มีทั้งเสมหะ และกึ่งเสมหะ (N=101)

งานวิจัยนี้ใช้ NaOCl คุณภาพ commercial grade ซึ่งเป็นไปตามข้อจำกัดของเงินทุน และด้วยความหวังว่าจะให้ผลที่แทนกันได้ เพราะว่าหากได้ผลดีจริง น่าจะช่วยให้มีการนำวิธีดัดแปลงไปพัฒนาใช้เชิงปฏิบัติจริง และได้สะดวก

อย่างไรก็ตามเป็นผลดีที่พบว่า (ข้อวิจารณ์ที่ 2) สามารถใช้ NaOCl ระดับ commercial grade ได้จริง เพราะให้ผลที่เทียบเท่าได้กับวิธีปกติ (ตามรายงานของ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ที่ใช้เป็นพื้นฐานออกแบบวิจัยมิได้ระบุว่า NaOCl ที่ใช้คุณภาพระดับใด) และ (ข้อวิจารณ์ที่ 3) ได้ข้อมูลสำหรับการออกแบบวิธีดัดแปลงลำดับที่สอง (**"วิธี TB-NaOCl-80"**) ที่มีการใช้ Tween 80 เข้าร่วมในการเตรียมตัวอย่างด้วย

เซลล์ของ *M. tuberculosis* ติดสีของ carbol fuschsin ในวิธีที่ดัดแปลง และไม่มีเซลล์อื่นติดสี carbol fuschsin อีกทั้งระดับความเข้มของการติดสีมีแนวโน้มว่าติดสีดีขึ้นกว่าวิธีปกติ จึงน่าจะมีแนวโน้มที่ดี

4.2 TB-NaOCl-80

งานวิจัยส่วนนี้เป็นการพิสูจน์ว่า NaOCl-80 (treatment TB-NaOCl-80 **A** และ **B**) ที่ออกแบบขึ้นมีประสิทธิภาพการตรวจหา *M. tuberculosis* ได้ดีกว่าวิธีปกติ (TB-NaOCl-80 **C**) ที่ใช้เป็นมาตรฐานของศูนย์วัณโรคในขั้นการเตรียมตัวอย่างตามวิธี Ziehl-Neelsen staining test หรือไม่ ลักษณะของ treatment TB-NaOCl-80 **A** และ **B** โดยสรุปเป็นดังนี้คือ **A** มีการใช้ NaOCl และ Tween 80 ส่วน **B** ต่างจาก **A** ตรงที่ไม่มี Tween 80 อุปกรณ์ วิธีการ และขั้นตอนอื่นโดยรวมเหมือนกันทั้ง **A**, **B** และ **C** โดยตัวอย่างเป็นเสมหะทั้งหมด ผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ว่าวิธี **A** ดีกว่า **B** และ **B** ดีกว่า **C** (วิธีปกติ) ($p<0.05$, $N=105$) (ข้อวิจารณ์ที่ 4) ผลที่เป็นเช่นนี้น่าจะเนื่องมากจากผลของ Tween 80 ที่มีผลในการลดแรงตึงผิว จึงช่วยให้ NaOCl ทำหน้าที่ออกซิไดซ์สารอินทรีย์ในตัวอย่างเสมหะได้ดีขึ้น และช่วยให้เซลล์รวมกันหลังการปั่นเหวี่ยง จึงทำให้ผลบวกทางสถิติสูงขึ้นใน TB-NaOCl-80 **A**

(ข้อวิจารณ์ที่ 5) ส่วนผลของ TB-NaOCl-80 **B** ดีกว่า **C** นั้นเป็นไปตามสมมุติฐานการวิจัย และสอดคล้องกับ Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ด้วยเหตุผลที่ว่า NaOCl ช่วยย่อยสารอินทรีย์ทำให้ลดแรงตึงผิวลงได้ระดับหนึ่ง ส่งผลให้ลดสารรบกวนการติดสีย้อม และช่วยให้เซลล์รวมตัวกันหลังการปั่นเหวี่ยง จึงทำให้ผลบวกทางสถิติสูงขึ้นกว่าที่ได้จากวิธีปกติ (C) แต่ผลนี้ไม่สอดคล้องกับที่ได้จากวิธี TB-NaOCl ซึ่งอาจเป็นเพราะ (ข้อวิจารณ์ที่ 6) ปริมาตรรวมของ reaction mixture คือ 1.0 มล. (ปริมาตรตัวอย่างในวิธี TB-NaOCl คือ 0.5 มล.) จึงทำให้เห็นผลชัดกว่าก็ได้ ฉะนั้นจึง (ข้อวิจารณ์ที่ 7) มีแนวโน้มว่า NaOCl คุณภาพ commercial grade เหมาะสมที่จะใช้จริงในการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหา *M. tuberculosis* ตามวัตถุประสงค์การวิจัย

เนื่องจากผลของ **A** ดีกว่าวิธีปกติ (C) จึงทำการคำนวณหาค่า sensitivity เปรียบเทียบกันระหว่างวิธี TB-NaOCl-80 **A** และ C โดยเชื่อถือวิธีปกติ (TB-NaOCl เป็นวิธีมาตรฐาน) สูตร, ตาราง และข้อมูลจาก "การทดลอง TB-NaOCl-80" เพื่อการคำนวณ relative specificity (SP) แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่าจากวิธี TB-NaOCl-80 เพื่อการคำนวณ Relative Sensitivity

Response of Alternative Method	**Standard Method**	
	Positive (+ /)	Negative (- /)
Positive (/+)	(- / +) Positive Agreement (PA) = 77	(- / +) True Positive (TP) = 26
Negative (/-)	(+ / -) False Negative (FN) = 0	(- / -) Negative Agreement (NA) = 2

Relative Sensitivity (SE) = (PA+TP)/(PA+FN) x 100

PA + TP + FN + NA = 105

SE = (77+26) / (77+0) x 100 = 133.77 %

จากการคำนวณพบว่าวิธี TB-NaOCl-80 **A** ที่พัฒนาขึ้นมีค่า SE เท่ากับ 133.8% เมื่อเทียบกับวิธีปกติ (TB-NaOCl-80 **C**) ซึ่งชี้ว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นดีกว่าในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุวัณโรคในตัวอย่างเสมหะ เป็นไปตามความมุ่งหวังของงานวิจัยนี้

(ข้อวิจารณ์ที่ 8) จากผลที่ได้ทั้งหมดบ่งชี้ว่า มีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดประโยชน์ต่อการควบคุมรักษาวัณโรคในประเทศไทย โดยการนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ แต่ควรต้องทำการสำรวจค่า relative accuracy และ specificity ต่อไป (ซึ่งต้องมีการสร้าง treatment ที่ทราบจำนวนเซลล์แน่นอน และรับรองได้)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

โดยรวมสรุปได้ว่า การใช้ (โซเดียม) ไฮโปคลอไลท์ (NaOCl) แบบ commercial grade ร่วมกับ Tween 80 บวกกับการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงสามารถสร้างวิธีเตรียมตัวอย่างของ Ziehl-Neelsen staining test เพื่อการตรวจหาแบคทีเรีย *M. tuberculosis* ได้ดีขึ้นกว่าวิธีปกติที่ศูนย์วัณโรค (เขต 5) ใช้อยู่โดยมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเซลล์ยังคงเอกลักษณ์การติดสี carbol fuschsin

จากการคำนวณค่า sensitivity ที่สูงขึ้นกว่าวิธีปกติ 32% ช่วยให้เห็นผลบวกได้ชัดและเร็วขึ้น และอาจช่วยให้ผล false negative เป็น true positive ได้ในวิธีที่พัฒนาขึ้น ทำให้เกิดผลดีต่อการตรวจ และควบคุมวัณโรคของประเทศ

อย่างไรก็ตาม การใช้ NaOCl อย่างเดียวให้ผลที่ต่างไปจากสมมุติฐานการวิจัย และที่รายงานไว้โดย Habeenzu, Lubasi and Fleming (1998) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารรบกวนใน NaOCl ที่เป็น commercial grade ที่ใช้ หรือปริมาตรของตัวอย่างเสมหะที่ต่างไป หรืออาจเป็นเพราะตัวอย่างส่วนหนึ่งเป็น "กึ่งเสมหะ"

การใช้ตัวอย่างที่เป็นกึ่งเสมหะนี้เป็นไปตามรูปแบบการตรวจของศูนย์ฯ (ซึ่งจริงแล้วมีการใช้แม้กระทั่งน้ำลายเป็นตัวอย่าง) ด้วยความจำกัดของเงินวิจัยทำให้ต้องปฏิบัติให้สอดคล้องกับงานตรวจของศูนย์ฯ ไปพร้อมกันจึงทำให้มีการใช้ตัวอย่างที่เป็นกึ่งเสมหะ

งานวิจัยนี้ให้ผลที่บ่งชี้ว่าสมมุติฐานการวิจัยเป็นจริง และมีแนวโน้มนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง เพราะพื้นฐานของความมุ่งหวังของงานนี้คือ ความเป็นไปได้สูงที่จำนำข้อมูล และวิธีที่พัฒนาขึ้นไปใช้ในเชิงปฏิบัติในศูนย์วัณโรคทุกแห่งของประเทศไทย และประเทศอื่นที่มีข้อจำกัดในการใช้วิธีตรวจที่มีค่าใช้จ่ายสูง

ข้อเสนอแนะ (1) ควรมีการทดสอบวิธี TB-NaOCl-80 A ที่พัฒนาขึ้นนี้ในค่าของ accuracy และ specificity เพื่อเป็นการบ่งชี้ประสิทธิภาพโดยรวม ก่อนนำไปพัฒนาให้เหมาะสมและใช้จริงต่อไป (2) วิธีนี้แม้ว่ามีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้ในเชิงปฏิบัติ โดยใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างเพิ่มขึ้น แต่ก็ไม่มากนัก คือ แต่ละวันที่มีการตรวจต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นประมาณครึ่งชั่วโมงเท่านั้น แต่เวลาที่ใช้เพื่อการตรวจตัวอย่างอาจสั้นลงได้ (3) โดยต้องมีการจัดซื้อวัสดุ (ไฮโปคลอไลท์ และ Tween 80) และอุปกรณ์ (เครื่องปั่นเหวี่ยงหลอดแบบพื้นฐาน) เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งราคาไม่สูง

ข้อเสนอแนะที่เป็นผลพลอยได้จากการวิจัยนี้พบว่า (4) ไม่ควรใช้ตัวอย่างที่เป็นกึ่งเสมหะ หรือน้ำลาย ในการตรวจ เพราะว่าโอกาสมีปริมาณเซลล์น้อย ทำให้ตรวจไม่พบมีมาก โดยเฉพาะกรณีของน้ำลายที่มีเซลล์อยู่น้อยมาก ทั้งนี้เป็นข้อมูลที่แนะนำโดย WHO, CDC แห่งสหรัฐ

อเมริกา, และ International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) สาเหตุที่ศูนย์เลือกตัวอย่างกึ่งเสมหะ และน้ำลาย เพราะว่าผู้รับการตรวจส่วนหนึ่งไม่สามารถให้เสมหะได้ โดยเฉพาะเด็ก หรือได้กินยาละลายเสมหะ (5) ศูนย์ฯ ควรใช้วิธีง่ายและสะดวก ดังที่แนะนำโดย IUATLD คือ การสูดไอของน้ำเกลือ (saline mist) เข้าทางลมหายใจ ทำให้ผู้รับการตรวจให้เสมหะได้ง่ายขึ้นมาก *(แต่เป็นเสมหะแบบใส ที่ใช้เป็นตัวอย่างได้ดี ซึ่งต่างจาก "กึ่งเสมหะ และน้ำลาย")*

(6) ศูนย์วัณโรคควรพัฒนาวิธีการตรวจที่ใช้ NaOCl ขึ้นใช้ เพราะว่ามีข้อดีที่เป็นผลพลอยได้สำคัญ (อันเป็นความมุ่งหวังสำคัญประการหนึ่งของงานวิจัยนี้) คือ ช่วยลดโอกาสการรับเชื้อวัณโรคของเจ้าหน้าที่ ซึ่งเป็นปัญหาที่พบบ่อย เพราะว่า NaOCl มีผลฆ่าเชื้อ

จากผลทางสถิติ และข้อดีหลายประการดังกล่าว โดยเฉพาะความง่ายสะดวกของวิธีการ วิธีการเตรียมตัวอย่างของ Ziehl-Neelsen staining test ที่ใช้ทั่วประเทศ และทั่วโลกควรมีการปรับปรุง โดยใช้ไฮโปคลอไรท์ ร่วมกับ Tween 80

บรรณานุกรม

American Thoracic Society Medical Section of American Lung Association. (1990). Diagnostic standards and classification of tuberculosis. American Review of Respiratory Disease. 142. 3. 725-735.

CDC. 2003, May. Diagnosis of TB Infection and Disease. Module 3: page 15-16 (Online). Available URL: http://www.phppo.cdc.gov/phtn/tbmodules.

Cohn, D.L., F.Bustreo and M.C. Raviglione. (1997) . Drug-resistant tuberculosis: Review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. Clinical Infectious Diseases. 1.24. S1. S121-S130.

Davies, P.D.O. (1996). Tuberculosis in the elderly-epidermiology and optimal management. Drugs & Aging. 8. 6. 436-444.

Foulds, J. and R.O'Brien. (1998). New tools for the diagnosis of tuberculosis: the perspective of developing countries Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 2. 10. 778-783.

Gebre, N, U. Karlsson, G. Jonsson, R. Macaden, A. Wolde, A. ASSEFA and H. Miorner. (1995). Improved microscopic diagnosis of pulmonary tuberculosis in developing-countries. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89. 2. 191-193.

Githui, W., F. Kitui, E.S. Juma, D.O. Obwana, J. Mwai and D. Kwamanga. (1993). A comparative-study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Nielsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. East African Medical Journal. 70. 5. 263-266.

Habeenzu, C., D. Lubasi and A.F. Fleming. (1998). TI: Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid- fast bacilli in sputum in developing countries. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 92. 4. 415-416.

Harries, A.D., T.E. Nyirenda, A. Banerjee, C. Mundy and F.M. Salaniponi. (1998). District sputum smear microscopy services in Malawi. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2. 11. 914-918.

Hawkins, C.L. and M.J. Davies. (1998). Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. Biochemical Journal. 332. Pt3. 617-625.

Hawkins, C.L. and M.J. Davies. (1999). Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. Biochemical Journal. 340. Pt2. 539-548.

Huebner, R.E., T.L. Moeti, N.J. Binkin and D.W. Rumisha. (1997). TI: Survey of physician use of radiography and sputum smear microscopy for tuberculosis diagnosis and follow-up in Botswana. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 1. 4. 333-338.

Ipuge, Y.A.I., H.L. Rieder and D.A. (1996). The yield of acid-fast bacilli from serial smears in routine microscopy laboratories in rural Tanzania. Enarson. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 90. 3. 258-261.

Kupper, T., U. Steffen. K. Wehle, G. Richartz and P. Pfitzer. (1995). Morphological study of bacteria of the respiratory system using fluorescence microscopy of Papanicolaou-stained smears with special regard to the identification of *Mycobacteria* sp. Cytopathology. 6. 6. 388-402.

Laszlo, A. (1996). Tuberculosis bacteriology laboratory services and incremental protocols for developing countries. Clinics in Laboratory Medicine. 16. 3. 697.

Miorner, H., G.Ganlov, Z.Yohannes and Y.Adane. (1996). Improved sensitivity of direct microscopy for acid-fast bacilli: Sedimentation as an alternative to centrifugation for concentration of tubercle bacilli. Journal of Clinical Microbiology. 34. 12. 3206-3207.

Nguyen, T.N.L., C.D. Wells, N.J. Binkin, D.L. Pham and V.C. Nguyen. (1999). The importance of quality control of sputum smear microscopy: the effect of reading errors on treatment decisions and outcomes. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 3. 6. 483-487.

Nyirenda, T.E., C.J.F. Mundy, A.D. Harries, A. Banerjee and F.M. Salaniponi. (1998). Safety in laboratories carrying out sputum smear microscopy: a dilemma for resource-poor countries. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2. 8. 690-693.

Panasenko, O.M., J. Arnhold, V.I. Sergienko, K. Arnold, Y.A. Vladimirov. (1996). Stoichiometry of hypochlorite interaction with unsaturated bonds of phosphatidylcholine and free fatty acids in liposomes. Biologicheskie Membrany. 13. 3. 271-281.

Rattan, A., I. Kishore, S. Singh, M. Jaber, I. Xess and R. Kumar. (1994). Evaluation of a safe sputum processing method for detecting tuberculosis. Journal of Clinical Pathology. 47. 5. 411-413.

Rutala, W.A. and D.J. Weber. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clinical Microbiology Reviews. 10. 4. 597-611.

Samb, B., D. Henzel, C.L. Daley, F. Mugusi, T. Niyongabo, N. MlikaCabanne, G. Kamanfu, P. Aubry, I. Mbaga, B. Larouze and J.F. Murray. (1997). Methods for diagnosing tuberculosis among in-patients in Eastern Africa whose sputum smears are negative. International journal of tuberculosis and lung disease. 1. 1. 25-30.

Stone. B.L., W.J. Burman, M.V. Hildred, E.A. Jarboe, R.R. Reves and M.L. Wilson. (1997). The diagnostic yield of acid-fast-bacillus smear-positive sputum specimens. Journal of Clinical Microbiology. 35. 4. 1030-1031.

VanDeun, A. and F. Portaels. (1998). Limitations and requirements for quality control of sputum smear microscopy for acid-fast bacilli. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 9. 756-765.

Wang, P.L. and B.Y. Tao. (1998). Soy fatty acid oxidation with sodium hypochlorite monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists Society. 75. 1. 9-14.

Wilkinson, D. and A.W. Sturm. (1997). Diagnosing tuberculosis in a resource-poor setting: the value of sputum concentration. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 91. 4. 420-421.

WHO. 2003, May. Fact Sheet 13 Tuberculosis (TB) (Online). Available URL: http://www3.who.int/whosis/factsheets_hiv_nurses/fact-sheet-1/index.html

Woods, G.L., E. Pentony, M.J. Boxley and A.M. Gatson. (1995). Concentration of sputum by cytocentrifugation for preparation of smears for detection of acid-fast bacilli does not increase sensitivity of the fluorochrome stain. Journal of Clinical Microbiology. 33. 7. 1915-1916.

ภาคผนวก

ตารางที่ 6 ผลจากวิธี 2.4.1 "การทดลอง TB-NaOCl"

จำนวน	วันที่	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl		
			เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
1	20-Jun-00	นายจำรูญ ทราบพรมราช	✓		0	0	0
2	21-Jun-00	น.ส. ทองใบ อุทะปา	✓		0	0	0
3	21-Jun-00	นางพันธ์ บุญน้อย	✓		0	0	0
4	21-Jun-00	นางพิม น้อยโคกสูง	✓		0	0	0
5	21-Jun-00	นางเหรียญ อุดทะกา	✓		0	0	0
6	21-Jun-00	นางอั้ว เชยสูงเนิน	✓		0	0	0
7	21-Jun-00	นายเกิด ปรอยกระโทก	✓		0	0	0
8	21-Jun-00	นายน้อย ขอมสระน้อย	✓		2	2	2
9	21-Jun-00	นายโพธิ์ แรมสูงเนิน	✓		0	0	0
10	21-Jun-00	นายมิ้น น้อยโคกสูง	✓		0	0	0
11	21-Jun-00	นายยวง สูงใหม่	✓		0	0	0
12	21-Jun-00	นายสง่า ชุ่มกลาง	✓		0	0	0
13	21-Jun-00	นายสมชาย พานุช	✓		3	2	2
14	21-Jun-00	นายสุชีพ อุสาหรัมย์	✓		0	0	0
15	21-Jun-00	พภ. ไพล อยู่บำรุงพงศ์	✓		3	3	3
16	22-Jun-00	นางกองเมือง กล้ารวด	✓		0	0	0
17	22-Jun-00	นางมณี เคนเหลื่อม	✓		3	3	3
18	22-Jun-00	นางหมิว ดามะดัน	✓		3	3	2
19	22-Jun-00	นางหลงมา พังเมื่นไวย	✓		0	0	0
20	22-Jun-00	นายณรงค์ อร่ามทิพย์	✓		2	2	2
21	22-Jun-00	นายวิโรจน์ จามจุรี	✓		0	0	0
22	23-Jun-00	นายประกอบ โล่พันดุง	✓		3	3	3
23	23-Jun-00	นายอินทร์ ตองติดรัมย์	✓		2	3	2
24	24-Jun-00	นางถ่ำ จิตตะคุ	✓		0	0	0
25	24-Jun-00	นางมะลิ นาคทะเล	✓		0	0	0
26	24-Jun-00	นายช้าง อามสันเทียะ	✓		0	0	0

จำนวน	วันที่	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl		
			เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
27	24-Jun-00	นายบุญมี ชาวกระโทก	✓		3	3	3
28	24-Jun-00	นายแบะ กลิ่นศรีสุข	✓		0	0	0
29	24-Jun-00	นายสึก โสประโคน	✓		0	0	0
30	24-Jun-00	นายสุรัตน์ ใจดี	✓		0	0	0
31	26-Jun-00	นายพนา เมินดี	✓		0	0	0
32	27-Jun-00	นางสน แสงไธสง	✓		0	0	0
33	27-Jun-00	นางหล่ำ ยอดทองหลาง	✓		0	0	0
34	27-Jun-00	นายคำดี ภรมภักดี	✓		0	0	0
35	27-Jun-00	นายวัน บุตรมัง	✓		0	0	0
36	27-Jun-00	นายวิชัย วังสูงเนิน	✓		0	0	0
37	27-Jun-00	นายสมชัย ถอยกระโทก	✓		0	0	0
38	27-Jun-00	นายสุข เถลิงพล	✓		2	2	2
39	27-Jun-00	นายสุเทพ พะวงสด	✓		0	0	0
40	29-Jun-00	นางอ่อน ปรอยกระโทก	✓		0	0	0
41	29-Jun-00	นายเที่ยง แซะจอหอ	✓		0	0	0
42	29-Jun-00	นายม่งต้อง วิทยาพรพิพัฒน์	✓		0	0	0
43	29-Jun-00	นายเสน่ห์ มาหมื่นไวย	✓		0	0	0
44	29-Jun-00	พภ. ชื่น อักษร	✓		0	0	0
45	30-Jun-00	นางบุญเกิด สรวงษ์	✓		3	3	3
46	30-Jun-00	นางสมชาย ทมโคกกรวด	✓		0	0	0
47	30-Jun-00	นางอ่อน ส้มมาสงเนิน	✓		0	0	0
48	30-Jun-00	นายอานนท์ โพธิบัณ	✓		3	3	3
49	3-Jul-00	นางกาหวัง ฉัตรจังหรีด	✓		0	0	0
50	3-Jul-00	นางเกลี้ยง กฤตกลาง	✓		0	0	0
51	3-Jul-00	นางมุ่ง ปัมรัมย์	✓		0	0	0
52	3-Jul-00	นายโชติ กระรัมย์	✓		3	3	3
53	3-Jul-00	สอ.เฉลิมชัย รวมผักแว่น	✓		1	2	2
54	4-Jul-00	นางกริ่ม แดขุนทด	✓		0	0	0
55	4-Jul-00	นายประพล อ้อมนอก	✓		0	0	0
56	4-Jul-00	นายปริด เข็มเอี่ยม	✓		3	3	2

จำนวน	วันที่	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl		
			เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
57	4-Jul-00	นายสิน วิเศษแก้ว	✓		0	0	0
58	5-Jul-00	นายนัฏพล แก้วดอนรี	✓		2	2	2
59	5-Jul-00	นายสำเราญ มาธรรม	✓		0	0	0
60	21-Jun-00	น.ส. เสาร์ เพชรศรี		✓	0	0	0
61	21-Jun-00	นางมณี จุติศรี		✓	1	3	2
62	21-Jun-00	นายเล็ก ศรีรวค์		✓	0	0	0
63	22-Jun-00	นายแก่น ทิศกระโทก		✓	0	0	0
64	22-Jun-00	พภ. ทอง คำสันเทียะ		✓	0	0	0
65	23-Jun-00	นางศรีแพร สาระสำคัญ		✓	2	3	2
66	23-Jun-00	นางสำรวย พระกระโทก		✓	0	0	0
67	23-Jun-00	นายเที่ยง ป้ากระโทก		✓	3	3	3
68	23-Jun-00	นายอารุณ โนใหม่		✓	0	0	0
69	24-Jun-00	นายถนัด ไชยมาตย์		✓	0	0	0
70	24-Jun-00	นายแหล่ วงศ์น้ำคำ		✓	0	0	0
71	26-Jun-00	นายไพฑูรย์ หมื่นสระเกษ		✓	0	0	0
72	27-Jun-00	นางบัวหลัน รอดหมื่นไวย		✓	0	0	0
73	27-Jun-00	นางลิ้ม กรอบพุดซา		✓	0	0	0
74	27-Jun-00	นายโน อ้อชัยภูมิ		✓	0	0	0
75	27-Jun-00	นายมา หนากลาง		✓	0	0	0
76	27-Jun-00	นายสอาด สายยศ		✓	0	0	0
77	27-Jun-00	นายสุวรรณ ป้ากระโทก		✓	0	0	0
78	29-Jun-00	นางก่วง ดีกระโทก		✓	0	0	0
79	29-Jun-00	นางทองคำ เทพศักดิ์		✓	0	0	0
80	29-Jun-00	นางมะลิ ภานุวงศ์		✓	0	0	0
81	29-Jun-00	นายชื่น ฉันประเดิม		✓	3	3	3
82	29-Jun-00	นายพันธุ์ เอื้อยฉิมพลี		✓	0	0	0
83	29-Jun-00	นายวิเชียร วงศ์พระจันทร์		✓	3	3	2
84	29-Jun-00	นายสมบูรณ์ สมรูป		✓	0	0	0
85	29-Jun-00	พภ. บุญเพ็ง หนูหล่า		✓	3	0	3
86	30-Jun-00	นางบุญมา ชีกิ่ง		✓	0	0	0

จำนวน	วันที่	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl		
			เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
87	3-Jul-00	นางคำหล้า ดีคง		✓	0	0	0
88	3-Jul-00	นางแจ่ม กมลจิตร		✓	0	0	0
89	3-Jul-00	นางสร้อย เพียขันทา		✓	0	0	0
90	3-Jul-00	นางใหญ่ กรองมะเริง		✓	0	0	0
91	3-Jul-00	นายแก้ว ไชยชาติ		✓	0	0	0
92	3-Jul-00	นายบุญเลิศ สุพิน		✓	0	0	0
93	3-Jul-00	นายอนุสิทธิ ทองอุนนท์		✓	0	0	0
94	4-Jul-00	นางพุด ป่าสังทอง		✓	0	0	0
95	4-Jul-00	นายเกียรติภูมิ มรรคุวัฒนพงษ์		✓	0	0	0
96	4-Jul-00	นายสมพงษ์ ฟักโต		✓	0	0	0
97	5-Jul-00	น.ส.สมพร กาญชนะชำนาญ		✓	0	0	0
98	5-Jul-00	นางจุรีพร อรุณเรือง		✓	0	0	0
99	5-Jul-00	นางทุมมี เคียนรัมย์		✓	0	0	0
100	5-Jul-00	นายเฉลิมชน ชาญนอก		✓	1	0	1
101	5-Jul-00	นายบุญส่ง ปานรอน		✓	0	0	0

[a] ผลจาก Ziehl-Neelsen staining test 3 มีจำนวนเซลล์มากกว่า 2, 2 มีจำนวนเซลล์มากกว่า 1 (มากกว่านี้คือ มากกว่า 10 เท่า) และ C หมายถึงไม่พบเซลล์ A, B และ C หมายถึง treatment A, B และ C

ตารางที่ 7 ผลจากวิธี 2.4.2 "การทดลอง TB-NaOCl-80"

จำนวน	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl-80		
		เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
1	นายประเสริฐ พูนสูงเนิน	✓		0	0	0
2	นายทองหล่อ ไชโพธิ์	✓		0	0	0
3	นายเฉลย ก้านสน	✓		1	0	0
4	น.ส.วิลัยจันทร์ จักรแก้ว	✓		1	0	0
5	นางเสียม ฉิมโพธิ์	✓		1	0	0
6	นายบุญสวน สะคร	✓		1	0	1
7	น.ส.หนู มากศรี	✓		1	0	1
8	นายประเสริฐ ร่องบุตรดี	✓		1	1	0
9	นางทัน เทียบฤทธิ์	✓		1	1	0
10	นายสวัสดิ์ หว่างกลาง	✓		1	1	0
11	นางละออง สนนอก	✓		1	1	0
12	นางโปรด วงศ์กระโซ่	✓		1	1	0
13	นายมนูญ จรโคกกรวด	✓		1	1	0
14	นายพร พิมพ์เครื่อง	✓		1	1	0
15	นายสุรินทร์ แผ่กระโทก	✓		1	1	1
16	นายเสงี่ยม ศรีโสภา	✓		1	1	1
17	นายถนอม ผองผา	✓		1	1	1
18	นายบัฒฑิต ขาวบัณฑิต	✓		1	1	2
19	นางยุพิน ตรงกลาง	✓		1	1	2
20	นายทองคำ เทพศักดิ์	✓		1	1	2
21	นายสด สิมมา	✓		1	1	2
22	พภ.สัน มินไธสง	✓		1	1	2
23	นายปราโมทย์ เจริญศรี	✓		2	0	0
24	นายสอาด ทุ่งตะคุ	✓		2	0	0
25	นางนาตยา สินสันเทียะ	✓		2	0	0
26	นายประดิษฐ์ แซ่โค้ว	✓		2	0	1
27	นายเทา กองโคกสูง	✓		2	0	1
28	นายปิยะชาติ อาจหาญ	✓		2	0	2

จำนวน	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl-80		
		เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
29	นางสมมาตร บรรจงปรุ	✓		2	1	0
30	นายอินกาญ สงวน	✓		2	1	0
31	นายวันชัย บุญประสม	✓		2	1	0
32	นายสวง แค่ไธสง	✓		2	1	0
33	นายอัครเดช ก้อนในเมือง	✓		2	1	0
34	นายเต็ม ค้าปลา	✓		2	1	0
35	นายสุดใจ แสงจัตุรัส	✓		2	1	0
36	นายบรรจง หนอกกระโทก	✓		2	1	1
37	นายสมบูรณ์ จิตส่งเสริม	✓		2	1	1
38	นางศึก ธุระสาร	✓		2	1	1
39	นางจรินทร์ ยอดเพชร	✓		2	1	1
40	นายอินทร์ กุดหอม	✓		2	1	1
41	นางอิด สอนสันต์	✓		2	1	1
42	นางเสงี่ยม ชูจอหอ	✓		2	1	1
43	นางเล็ก คิดเห็น	✓		2	1	1
44	นายพรชัย หาญจะบก	✓		2	1	1
45	นายสวาท คิดสูงเนิน	✓		2	1	1
46	นางจิต ยอดสุรินทร์	✓		2	2	0
47	นายว่อง จุนกลาง	✓		2	2	0
48	นายผล สอยพิมาย	✓		2	2	0
49	นางลัย มะมารัมย์	✓		2	2	0
50	นายสมจิต คชรัตน์	✓		2	2	0
51	นายคง ปัญญาปรุ	✓		2	2	1
52	นายสอน โชตินอก	✓		2	2	1
53	นายวัฒนพงษ์ กิ่งกลาง	✓		2	2	1
54	นายอภิสิทธิ์ ขาวประโคน	✓		2	2	1
55	นางเยือก ทนประโคน	✓		2	2	1
56	นายเงิน สาระพันธุ์	✓		2	2	1
57	นายเสมอ ปลั่งกลาง	✓		2	2	1
58	นายประเสริฐ บรรจงปรุ	✓		2	2	1

จำนวน	ชื่อ	ลักษณะตัวอย่าง		ผลวิธี TB-NaOCl-80[a]		
		เสมหะ	กึ่งเสมหะ	A	B	C
89	น.ส.สุภาพ มีสุข	✓		3	2	2
90	นายพรชัย ราชัยสวรรค์	✓		3	2	2
91	นายชาลี ชุมแสงสี	✓		3	2	3
92	พภ.ช่วย เลิศจะบก	✓		3	2	3
93	น.ส.รุ่งตะวัน พัฒนะแสง	✓		3	2	3
94	นายประจวบ ปั้นสันเทียะ	✓		3	2	3
95	นายอรุโณทัย อรุนเรือง	✓		3	3	1
96	นายจันทร์ น้อยไพง	✓		3	3	1
97	สอ.เฉลิมชัย รวมผักแว่น	✓		3	3	1
98	นายประเสริฐ มากฐิน	✓		3	3	1
99	นายมนัส กลอนโพธิ์	✓		3	3	1
100	นางรำ ดวงวาว	✓		3	3	1
101	นายสวัสดิ์ ทองคำกิจ	✓		3	3	1
102	นายประกอบ โลพันดุง	✓		3	3	2
103	นายปริด เข็มเอี่ยม	✓		3	3	2
104	นายดี จันทะสิทธิ	✓		3	3	2
105	นางบัว สำกลาง	✓		3	3	3

[a] ผลจาก Ziehl-Neelsen staining test 3 มีจำนวนเซลล์มากกว่า 2, 2 มีจำนวนเซลล์มากกว่า 1 (มากกว่านี้คือ มากกว่า 10 เท่า) และ 0 หมายถึงไม่พบเซลล์ A, B และ C หมายถึง treatment A, B และ C

NPar Tests: TB-NaOCl (Sputum)

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	177	.69	1.17	0	3
Treatment	177	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank
Result	A	59	89.28
	B	59	89.46
	C	59	88.26
	Total	177	

Test Statistics[a, b]

	Result
Chi-Square	.031
df	2
Asymp. Sig.	.985

[a.] Kruskal Wallis Test

[b.] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl (Semi-sputum)

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	126	.37	.94	0	3
Treatment	126	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank
Result	A	42	65.35
	B	42	61.92
	C	42	64.24
	Total	126	

Test Statistics[a, b]

	Result
Chi-Square	.307
df	2
Asymp. Sig.	.858

[a.] Kruskal Wallis Test

[b.] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl (Both Sputum and Semi-sputum)

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	303	.56	1.09	0	3
Treatment	303	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank
Result	A	101	152.97
	B	101	151.04
	C	101	152.00
	Total	303	

Test Statistics[a, b]

	Result
Chi-Square	.046
df	2
Asymp. Sig.	.977

[a] Kruskal Wallis Test

[b] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl-80

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	315	1.57	.95	0	3
Treatment	315	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank
Result	A	105	209.64
	B	105	146.15
	C	105	118.21
	Total	315	

Test Statistics[a, b]

	Result
Chi-Square	61.000
df	2
Asymp. Sig.	.000

[a] Kruskal Wallis Test

[b] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl-80, A & B

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	315	1.57	.95	0	3
Treatment	315	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Result	A	105	127.13	13349.00
	B	105	83.87	8806.00
	Total	210		

Test Statistics[a, b]

	Result
Mann-Whitney U	3241.000
Wilcoxon W	8806.000
Z	-5.443
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

[a] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl-80, A & C

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	315	1.57	.95	0	3
Treatment	315	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Result	A	105	135.50	14428.00
	C	105	75.50	7927.00
	Total	210		

Test Statistics[a, b]

	Result
Mann-Whitney U	2362.000
Wilcoxon W	7927.000
Z	-7.4777
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

[a] Grouping Variable: Treatment

NPar Tests: TB-NaOCl-80, B & C

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Result	315	1.57	.95	0	3
Treatment	315	2.00	.82	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Treatment	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Result	B	105	115.28	12104.50
	C	105	95.72	10050.50
	Total	210		

Test Statistics[a, b]

	Result
Mann-Whitney U	4485.500
Wilcoxon W	10050.500
Z	-2.457
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014

[a] Grouping Variable: Treatment

ประวัติผู้นักวิจัย

นายคมสัน พิระภัทรุ่งสุริยา เป็นอาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อ 16 ธันวาคม พ.ศ. 2506 ณ รพ. ศิริราช กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับปริญญาตรี, โท และเอกจาก มหาวิทยาลัยรามคำแหง ปี พ.ศ. 2530, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2534, และ Edinburgh University (U.K.) ปี พ.ศ. 2541 สถานที่ติดต่อ: สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, อ. เมือง, จ. นครราชสีมา, 11000 โทรศัพท์: 044-22-4294 แฟกซ์: 044-22-4633 E-mail: komson@ccs.sut.ac.th ผลงานวิจัย: (1) K. Pirapatrungsuriya. 1993. Improvement of *Pichia stipitis* CBS5773 through Mutation and Ethanol Fermentation from the Mixture of D-Glucose and D-Xylose by the Mutant. *International Symposium* of the 20th Anniversary of International Post-Graduate University Course in Microbiology, Osaka University, Japan. (๒) K. Pirapartungsuriya. CJ Thomson and SGB Amyes. 1996. *GyrA* Mutations causing ciprofloxacin-resistance in *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, and *Escherichia coli* isolated in Malaysia and Thailand. 5th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases (WPCCID). Singapore. (๓) K. Pirapartungsuriya. Antibiotic-Fluoroquinolone-resistant sequence of *gyrA* and *ParC* of *Moraxella catarrhalis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter sakazakii*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter sakazakii*. Available at National Center for Biotechnology Information URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez.