การศึกษาความแตกต่างของจำนวนน้ำจากช่องโพรงปอดที่มีผลต่อการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

นาย ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-53-2774-3
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF DIFFERENT VOLUME OF PLEURAL FLUID FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS PLEURITIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE

Mr. Nattapong Jaimchariyatam

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine
Department of Medicine
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2774-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความแตกต่างของจำนวนน้ำจากช่องโพรงปอดที่มีผลต่อการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์
โดย	นาย ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ นายแพทย์ กมล แก้วกิติณรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ นายแพทย์ กมล แก้วกิติณรงค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ วันล่า กุลวิชิต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ แพทย์หญิง กนิษฐา ภัทรกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม : การศึกษาความแตกต่างของจำนวนน้ำจากช่องโพรงปอดที่มีผลต่อการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์ (EFFECT OF DIFFERENT VOLUME OF PLEURAL FLUID FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS PLEURITIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE) อ. ที่ปรึกษา : อ. นพ. กมล แก้วกิติณรงค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นพ. วันล่า กุลวิชิต; 63 หน้า. ISBN 974-53-2774-3.

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอดโดยเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะจากปริมาณน้ำที่ส่งตรวจจำนวนต่างๆกันในการวินิจฉัยภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากวัณโรค

วิธีการวิจัย เป็นการศึกษาแบบพรรณนา ที่ทำในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่เซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นรายใหม่ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ทำการตรวจสารน้ำในโพรงปอดและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด เก็บข้อมูลการย้อมสีทนกรด การเพาะเชื้อ การตรวจทางพยาธิวิทยา โดยอาศัยเกณฑ์การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด คือ พบเชื้อวัณโรค หรือลักษณะทางพยาธิวิทยาเข้าได้ และตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค และผู้ป่วยที่ไม่เข้าเกณฑ์ดังกล่าวจัดเป็นกลุ่มควบคุม ขณะเดียวกันได้แบ่งสารน้ำโพรงปอดเป็นสี่จำนวนในแต่ละผู้ป่วย คือ 1 ml, 10 ml, 50 ml, และ 150 ml และส่งตรวจด้วยวิธี PCR ใช้สายพันธุกรรม IS6110

ผลการศึกษา ผู้ป่วยทั้งหมด 55 รายได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 29 ราย สาเหตุอื่น 26 ราย โดยที่สารน้ำที่พบผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี PCR คือ สารน้ำ1 ml พบผลบวก 6 ราย, สารน้ำ 10 ml พบผลบวก 8 ราย, สารน้ำ 50 ml พบผลบวก 12 ราย, และสารน้ำ150 ml พบผลบวก 6 ราย โดยคิดเป็นความไวเท่ากับ 20.69%, 27.59%, 41.38%, and 20.69%, ตามลำดับ และความจำเพาะ 100% ทุกจำนวนของสารน้ำ

สรุป การเพิ่มจำนวนสารน้ำโพรงปอดในการส่งตรวจเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุมปอด โดยวิธี PCR สามารถเพิ่มความไวในการตรวจได้ แต่จำนวนสารน้ำที่มากเกินไปทำให้ความไวลดลงได้

ภาควิชา .....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา .....อายุรศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา .....2548 ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4774723030 : MAJOR MEDICINE (PULMONARY)

KEYWORD : POLYMERASE CHAIN REACTION/ TUBERCULOSIS/ VOLUME

NATTAPONG JAIMCHARIYATAM. EFFECT OF DIFFERENT VOLUME OF PLEURAL FLUID FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS PLEURITIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE. THESIS ADVISOR : KAMON KAWKITINARONG, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT. 63 pp. ISBN 974-53-2774-3.

Objective: To compare diagnostic yields of four different volumes of pleural fluid by nested polymerase chain reaction.

Material and method: A descriptive study was conducted in patients with lymphocytic exudative pleural effusion from December 2004 to November 2005. Diagnosis of TB pleuritis is made by identification of *M.tuberculosis* or typical histopathological findings. Patients with other final diagnoses served as a control group. Pleural fluids were divided into four different volumes of 1, 10, 50, and 150 ml. Nested PCR using primers targeting IS6110 was performed.

Result: 29 patients and 26 controls were enrolled. In the TB group, 6, 8, 12, and 6 of 29 specimens of 1, 10, 50, and 150 ml showed positive PCR results (sensitivity of 20.69%, 27.59%, 41.38%, and 20.69%, respectively). All control samples revealed negative results in all volumes used.

Conclusion: Higher volumes of pleural fluid increase a diagnostic sensitivity of tuberculous pleuritis by PCR to a certain extent. Too-large volumes, however, are unsuitable. Appropriate pleural fluid volumes should be verified in each laboratory.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department .....Medicine..... Student's signature .....

Field of study ... Medicine..... Advisor's signature .....

Academic year .....2548 ..... Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อาจารย์นายแพทย์กมล แก้วกิติณรงค์ และคณาจารย์ในสาขาวิชาโรคระบบการหายใจและภาวะวิกฤติระบบหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ และติดตามผลการวิจัยมาโดยตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์วันล่า กุลวิชิต ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ และตรวจทานแก้ไขบทความตลอดมา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ชวิษฐ์ จันทรานุวัฒน์ ช่วยในการตรวจทางพยาธิวิทยาของเยื่อหุ้มปอดและน้ำเจาะปอด

รองศาสตราจารย์ ดร. สมหญิง ธัมวาสร ที่ได้ให้ความรู้ ทักษะ ทางด้านการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค

อาจารย์นายแพทย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข ที่ได้ให้ความรู้ ทักษะ ทางด้านการเพาะเชื้อวัณโรค

นายแพทย์วรพจน์ เหลืองจิรโณทัย แพทย์หญิงนภัทร เขียวอ่อน นายแพทย์ไชยยศ รุ่งเรืองพิทยากุล แพทย์หญิงณับผลิกา ทองพลพรหม และแพทย์ประจำบ้าน ช่วยทำหัตถการเจาะปอดและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ในผู้ป่วยหลายราย

คุณกมลธาดา นาวีวิตรผดุง ช่วยในการจัดเตรียม การเก็บ การควบคุม การใช้เทคนิคพีซีอาร์ในงานวิจัยนี้ทั้งหมด

คุณดาวรุ่ง ศิลาจำรูญ และเจ้าหน้าที่ในหน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทุกท่าน ช่วยในการจัดเตรียม การเก็บ สิ่งส่งตรวจทั้งหมด

คุณอัญชลี พัตราภรณ์ ช่วยในการกระตุ้นเตือน ประสานงาน และจัดพิมพ์รูปแบบของวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง

ภาควิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยา และภาควิชาจุลชีววิทยา

ผู้ป่วยในการศึกษานี้ทุกท่าน

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ สนับสนุนทุนวิจัยส่วนใหญ่

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญแผนภูมิ ..... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale) ... 1

คำถามการวิจัย (Research question) 3

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives) 3

สมมติฐาน (Hypothesis) 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

กรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual framework) 4

ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption) 4

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions) 6

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation) 7

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย
(expected Benefits and Application) 7

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข
(Obstacles and strategies to solve the problems) 7

2. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับวัณโรค 9

แบคทีเรียวิทยา (Mycobacteriology) 9

ชีวโมเลกุลของเชื้อวัณโรค 10

ระบาดวิทยาของวัณโรค 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ หน้า

3. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 14
พยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยา 14
อุบัติการณ์ 15
อาการทางคลินิก 15
ธรรมชาติของโรค 16
การวินิจฉัย 16
การรักษา 18
4. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเทคนิคพีซีอาร์ 19
เทคนิค PCR 19
การใช้เทคนิค PCR ตรวจสิ่งส่งตรวจต่างๆเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค 20
การใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอดเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 24
5. วิธีดำเนินการวิจัย 26
รูปแบบการวิจัย (Research design) 26
ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology) 26
วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection) 31
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) 31
ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration) 32
6. ผลการศึกษา 33
7. การอภิปรายผลการศึกษา 44
8. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 51
รายการอ้างอิง 53
ภาคผนวก 59
ภาคผนวก ก แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูลผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอด 60
ภาคผนวก ข แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม 62
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 66

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตารางแสดงงานวิจัยด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ ...	20
2	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด	32
3	ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	33
4	ลักษณะทางคลินิกและคุณสมบัติเบื้องต้นของสารน้ำเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	35
5	ความสามารถในการวินิจฉัย (diagnostic yield) วัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีต่างๆ	40
6	เปรียบเทียบผลของการวิจัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีต่างๆใน การศึกษานี้กับการศึกษาอื่น	41
7	เปรียบเทียบผลตรวจด้วย PCR จากน้ำเจาะปอดในการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น	42
8	แสดงผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจำแนกตามกลุ่มย่อย	43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิ		หน้า
1	แผนภูมิเส้นแสดงอัตราป่วยด้วยวัณโรคทุกชนิดในประเทศไทย พ.ศ.2537 – 2546	11
2	แผนภูมิเส้นแสดงผู้ป่วยวัณโรค จำแนกตามอวัยวะที่เกิดโรค ในประเทศไทย พ.ศ. 2537 – 2546	11
3	แผนภูมิแท่งแสดงจำนวนผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยเอดส์ที่ป่วยด้วยวัณโรค ในประเทศไทย พ.ศ. 2527 – 2547	12
4	แผนภูมิแท่งแสดงสารน้ำในโรคต่างๆ	36
5	แผนภูมิแท่งแสดงลักษณะข้างของปอดที่เกิดสารน้ำ	37
6	แผนภูมิแท่งแสดงลักษณะสีของสารน้ำในโรคต่างๆ	38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADA	Adenosine deaminase
AFB	Acid fast bacilli
CA	Carcinoma
DNA	Deoxyribonucleic acid
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN-gamma	Interferon gamma
LDH	Lactate dehydrogenase
PCR	Polymerase chain reaction
PMN	Polymorphonuclear cell
PPD	Purified protein derivative
RNA	Ribonucleic acid
TB	Tuberculosis
ZN	Ziehl-Neelsen

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

วัณโรคเป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (Tuberculous Pleuritis) เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคนอกปอด และพบบ่อยในประเทศไทย โดยพบประมาณ 53-60%[1, 2] ของผู้ป่วยที่มาด้วยน้ำในโพรงปอดโดยไม่ทราบสาเหตุ

ปัญหาที่สำคัญในการวินิจฉัย เนื่องจากไม่มีอาการเฉพาะเจาะจง และเชื้อที่อยู่ในน้ำในโพรงปอดมีจำนวนน้อย ทำให้ความไวในการตรวจด้วยวิธีทางโรคติดเชื้อมีค่าต่ำ เช่น การย้อมสีทนกรดให้ผลบวกเพียง 0-5 %[3, 4] ยกเว้นในผู้ป่วยเอดส์จะมีโอกาสพบมากขึ้นเป็น 20 %[5] การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดให้ผลบวก 25-50%[4, 6] การเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวก 32-76%[7-9] เป็นต้น ดังนั้นปัจจุบันจึงอาศัยการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยดูการอักเสบเฉพาะแบบแกรนูโลมา (granulomatous inflammation) ซึ่งได้ผลบวกประมาณ 50-60%[7, 8] ในการตรวจครั้งแรก, 80% ในการตรวจซ้ำและได้ผลถึง 85-90%[8] เมื่อใช้ร่วมกับการเพาะเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเชื้อใช้เวลานาน ในผู้ป่วยบางรายจึงจำเป็นต้องให้การรักษาด้วยยาต้านวัณโรคไปก่อน แล้วติดตามผลการรักษา (therapeutic diagnosis) ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงจากยาต้านวัณโรค และทำให้การวินิจฉัยโรคล่าช้าออกไปได้ จากปัญหาดังกล่าว ได้มีความพยายามพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความไวมากขึ้น เช่น การเพาะเชื้อในขวดแบบพิเศษ (Bactec)[9, 10] หรือการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด[10] การปั่นน้ำเจาะปอดปริมาณมากก่อนเพาะเชื้อ[6] เป็นต้น ซึ่งมีความไวเพิ่มขึ้นไม่มากนัก

สำหรับวิธีการตรวจใหม่ที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น อาศัยการตรวจหาสารที่เกิดจากการกระตุ้นของเซลล์กลุ่มทีลิมโฟซัยท์ (T-lymphocyte) ได้แก่การตรวจหาสารอะดีโนซีนดีอะมีเนส (adenosine deaminase-ADA) การตรวจหาสารลัยโซซัยม์ (lyzozyme) การตรวจหาสารอินเตอร์เฟียรอนแกมมา (interferon gamma-IFN-γ) และการตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม DNA ที่มีความจำเพาะกับเชื้อวัณโรคซึ่งได้แก่การใช้เทคนิค PCR เป็นต้น[4, 11-13] ในการตรวจดังกล่าวนั้น การตรวจหาสาร ADA ในน้ำเจาะปอดเป็นวิธีที่มีข้อมูลมากที่สุดและมีความไวสูง[9, 14-17] โดยเฉพาะการศึกษาในประเทศทางตะวันตก แต่ในการศึกษาต่อมา และที่ทำในชาวเอเชียพบว่าได้ผลไม่ดีเท่าในการศึกษาแรกๆ[8, 9, 13, 18] และพบผลบวกลวงได้ในหลายโรค เช่น ในภาวะสารน้ำที่เกิด

จากโรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง โรค SLE โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคมะเร็งชนิดอะดีโน[19] และโรคหนองในโพรงปอด (empyema)[20] เป็นต้น การตรวจหา lyzozyme มีความไวและความจำเพาะไม่ดีนัก การตรวจ IFN-γ โดยทั่วไปเป็นที่ยอมรับว่ามีความไวและจำเพาะกว่าการตรวจหาสาร ADA แต่ก็ยังพบผลบวกลวงได้โดยโรคที่กระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte อื่นๆ[4, 19, 21, 22]

จากการศึกษาที่ผ่านมา การวินิจฉัยโดยการใช้เทคนิค PCR ของน้ำเจาะปอดก็มีความไวแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา คือ 20-81%[23-27] และจากการศึกษาของกมลและคณะ[28] โดยใช้เทคนิค PCR ของเยื่อหุ้มปอดซึ่งมีความไวเพิ่มขึ้นเป็น 75% แต่มีข้อเสียคือต้องทำการตัดเยื่อหุ้มปอดซึ่งมีความเสี่ยงมากกว่าและผู้ทำจำเป็นต้องได้รับการฝึกฝน ดังที่กล่าวมาแล้วว่าความไวของเทคนิค PCR ในน้ำเจาะปอดมีความแตกต่างกันมาก ในแต่ละการศึกษาซึ่งสาเหตุหนึ่ง อาจเนื่องมาจากการใช้สารน้ำส่งตรวจในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ปริมาณน้ำที่มากขึ้นน่าจะมีความไวมากขึ้น แต่อาจจะยิ่งมีตัวกวน (confounding factors) มากขึ้นด้วยทำให้ความจำเพาะลดลงก็ได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อศึกษาปริมาณสารน้ำเจาะปอดที่เหมาะสมที่ใช้ในการส่งตรวจ PCR เพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ปริมาณสิ่งส่งตรวจต่างๆกันในการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR มาก่อนเช่น การศึกษาเพื่อดูความไวของน้ำในการพบ Giardia cysts และ Cryptosporidium Parvum oocysts ด้วยวิธี PCR[29], การใช้ PCR ในการทำ DNA extraction และ typing เพื่อหารหัสพันธุกรรมของ DQA1 และ PM loci จากปัสสาวะ[30] และการศึกษาถึงผลของจำนวนของสิ่งคัดหลั่งจากระบบปัสสาวะและอวัยวะสืบพันธุ์ในการวินิจฉัยหาเชื้อ Chlamydia Trachomatis โดยวิธี PCR[31] เป็นต้น

แม้ว่ายังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลของปริมาณของสารน้ำเจาะปอดที่มีต่อการตรวจด้วยวิธี PCR มาก่อนก็ตาม แต่ ข้อมูลจากการศึกษาในอดีต[6, 32] พบว่าการใช้น้ำเจาะปอดปริมาณมากกว่าปกติ (100-500 ml) ในการเพาะเชื้อจะสามารถเพิ่มความไวในการตรวจมากขึ้น คือมีโอกาสพบเชื้อวัณโรคมากขึ้นนั่นเอง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการตรวจ PCR จะให้ผลบวกมากขึ้นด้วยเนื่องจากเป็นการตรวจเพื่อหา DNA ของเชื้อวัณโรค

คำถามการวิจัย (Research question)

คำถามหลัก (Primary research question)

การเพิ่มปริมาณน้ำเจาะปอดในการส่งตรวจ PCR สามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยเยื่อหุ้มปอดได้ดีหรือไม่ โดยหวังว่าจะมีความไวไม่น้อยกว่า 75% ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดท ที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น (Lymphocytic exudative pleural effusion)

คำถามรอง (Secondary research question)

การวินิจฉัยโรควัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณน้ำเจาะปอดในการส่งตรวจ PCR ทำให้การวินิจฉัยโรคมีความไวมากกว่าหรือเท่ากับวิธีทางพยาธิวิทยา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1.เพื่อศึกษาการใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอดโดยเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะจากปริมาณน้ำที่ส่งตรวจจำนวนต่างๆกันในการวินิจฉัยภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากวัณโรค

2.เปรียบเทียบการตรวจโดยวิธี PCR ของน้ำเจาะปอดและการตรวจวิธีอื่นๆ

3.ศึกษาการเพิ่มความไวและความจำเพาะจากการตรวจซ้ำด้วยวิธี PCR ในกรณีที่ผลตรวจครั้งแรกไม่ชัดเจน

สมมติฐาน (Hypothesis)

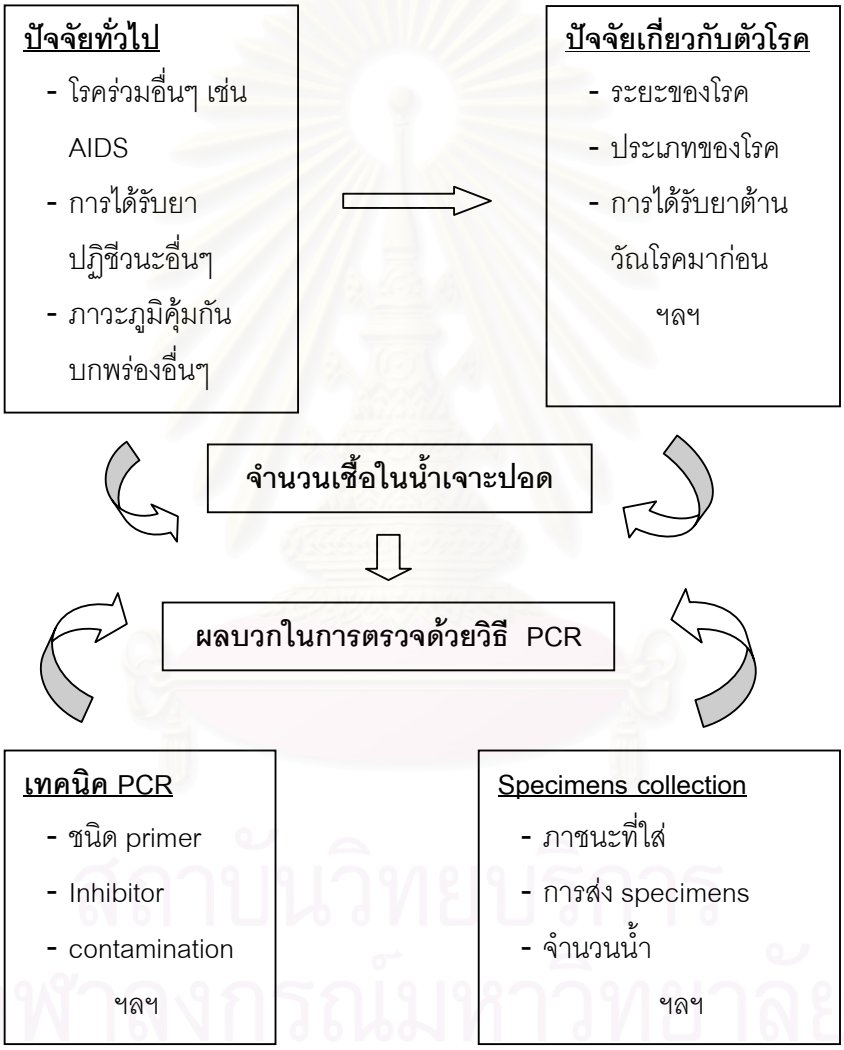
การเพิ่มจำนวนน้ำเจาะปอดในการส่งตรวจสามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยเยื่อหุ้มปอดได้โดยมีความไวไม่น้อยกว่า 75% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งที่เป็นผู้ป่วยในและผู้ป่วยนอก ในช่วงเดือนธันวาคม 2547 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2548

และรวมทั้งผู้ป่วยที่ทราบและไม่ทราบการวินิจฉัยแล้ว และมีความจำเป็นต้องทำการเจาะปอดอยู่แล้ว และคัดเลือกศึกษาเฉพาะกลุ่มที่เป็นสารน้ำแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยเด่นเท่านั้น

กรอบความคิดในการวิจัย (conceptual framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด[7, 8, 18, 33] จากข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้คือ

1. สามารถแยกเชื้อ *M.tuberculosis* ได้จากน้ำเจาะปอดหรือเยื่อหุ้มปอด

2. การตรวจทางพยาธิวิทยาของเยื่อหุ้มปอดที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคคือ Caseous granuloma หรือเป็นแบบ Granulomatous inflammation ร่วมกับย้อมสีทนกรดพบ acid fast bacilli

3. การตรวจทางพยาธิวิทยาพบ Granulomatous inflammation และประวัติลักษณะทางคลินิก การดำเนินโรคเข้าได้กับสารน้ำที่เกิดจากเชื้อวัณโรค และตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค

4. การตรวจทางพยาธิวิทยาไม่จำเพาะต่อวัณโรค แต่ประวัติ ลักษณะทางคลินิก การดำเนินโรคเข้าได้กับสารน้ำที่เกิดจากเชื้อวัณโรคและตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคกลุ่มนี้จะวินิจฉัยเป็น “น่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด” (การตอบสนองต่อการรักษาประเมินจากอาการทางคลินิกและภาพรังสีปอดที่ 8 สัปดาห์ โดยถือว่าตอบสนองเมื่อไม่มีไข้ ไอ เจ็บหน้าอก มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ภาพรังสีปอดสารน้ำลดลงมากกว่า 50%)

การวินิจฉัยภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากมะเร็ง[34] จากข้อใดข้อหนึ่งดังต่อไปนี้ คือ

1. พบเซลล์มะเร็งในน้ำเจาะปอดจากการตรวจทางเซลล์วิทยา
2. พบเซลล์มะเร็งในชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดจากการตรวจทางพยาธิวิทยา

ในรายที่ผลการเจาะสารน้ำและตัดเยื่อหุ้มปอดตรวจให้ผลลบไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยทั้งวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและสารน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากมะเร็งนั้น มีแนวการปฏิบัติดังนี้

1. ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกบ่งว่าน่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จะให้การรักษาวัณโรคไปเลย และติดตามดูการตอบสนองต่อการรักษาโดยประเมินจากอาการทางคลินิกและภาพรังสีปอดที่เวลา 8 สัปดาห์หลังการรักษา จะถือว่ามีการตอบสนองต่อการรักษาเมื่อผู้ป่วยหายจากอาการไข้ ไอ เหนื่อย เจ็บหน้าอก มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ภาพรังสีปอดมีปริมาณสารน้ำลดลงมากกว่า 50% ในผู้ป่วยบางรายอาจยังมีอาการเจ็บเสียดหน้าอกเวลาหายใจลึกหรือจาม หรือสะอึกซึ่งสัมพันธ์กับการที่มีเยื่อหุ้มปอดหนาซึ่งอาจคงอยู่ได้นาน ในรายที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาให้พิจารณาเจาะน้ำและตัดเยื่อหุ้มปอดซ้ำ

2. ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกและผลการสืบค้นอื่นๆ บ่งชี้ว่าสารน้ำน่าจะมีสาเหตุจากมะเร็งให้พิจารณาเจาะปอดและตัดเยื่อหุ้มปอดซ้ำ สำหรับในรายที่มีโรคมะเร็งในระบบอื่นกำลังดำเนินอยู่และสามารถอธิบายการเกิดสารน้ำในโพรงปอดได้และไม่พบโรคอื่นที่อาจเป็นสาเหตุได้ จะให้การวินิจฉัยว่ามีภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง (Paramalignant pleural effusion)

3. การวินิจฉัยว่าสารน้ำมีสาเหตุจากโรคอื่นๆเมื่อพบโรคที่อธิบายสาเหตุของสารน้ำในโพรงปอดนั้นได้และมีลักษณะทางคลินิก ลักษณะของสารน้ำ การวินิจฉัยเฉพาะ การดำเนินโรค และการตอบสนองต่อการรักษาสอดคล้องร่วมไปกับโรคนั้นๆ ซึ่งจะได้รับการตรวจเพิ่มเติมตามมาตรฐานการวินิจฉัยโรคที่สงสัยว่าเป็นสาเหตุต่อไป

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational definitions)

1. วัณโรคเยื่อหุ้มปอดให้ถือตามเกณฑ์การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดดังกล่าวข้างต้น

2. ภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากมะเร็ง (Malignant pleural effusion) คือพบเซลล์มะเร็งในน้ำเจาะปอดหรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดจากการตรวจทางพยาธิวิทยา

3. ภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง (Paramalignant pleural effusion) คือไม่พบเซลล์มะเร็งในน้ำเจาะปอดหรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดจากการตรวจทางพยาธิวิทยา แต่การเกิดของสารน้ำเกี่ยวข้องกับมะเร็ง

4. ภาวะสารน้ำแบบเอกซูเดท (Exudative pleural effusion)[35] หมายถึง สารน้ำที่เกิดเนื่องจากความผิดปกติของเยื่อหุ้มปอดเอง ในที่นี้ใช้มาตรฐานการแยกตามของ Light คือมีลักษณะเข้ากับข้อใดข้อหนึ่งดังนี้คือ

3.1 อัตราส่วนของโปรตีนในน้ำเจาะปอดกับในเลือดมีค่ามากกว่า 0.5

3.2 อัตราส่วนของ LDH ของน้ำเจาะปอดกับในเลือดมีค่ามากกว่า 0.6

3.3 ค่า LDH ในน้ำเจาะปอดมีค่ามากกว่า สองในสาม ของค่าปกติสูงสูดของ LDH ในเลือด

5. สารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น (Lymphocytic exudative pleural effusion)[36] หมายถึง Exudative pleural effusion ที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์มากกว่า 50% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

6.ปริมาณสารน้ำในโพรงปอดจากภาพรังสีปอด

ปริมาณน้อย (mild) คือ ปริมาณสารน้ำน้อยกว่าหนึ่งในสามของทรวงอกหนึ่งข้าง

ปริมาณปานกลาง (moderate) คือ ปริมาณสารน้ำอยู่ระหว่างหนึ่งในสามถึงสองในสามของทรวงอกหนึ่งข้าง

ปริมาณมาก (massive) คือ ปริมาณสารน้ำมากกว่าสองในสามของทรวงอกหนึ่งข้าง

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

1. ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดบางรายอาจมีเซลล์ PMN เด่น[4, 37] ซึ่งไม่สามารถใช้ผลจากการวิจัยนี้ช่วยในการวินิจฉัยหรือรักษาได้

2.ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ในการวินิจฉัยจากลักษณะทางคลินิกและการตอบสนองต่อการรักษาด้วยผลทางจุลชีววิทยา และ ทางพยาธิวิทยาที่จำเพาะอาจมีโอกาสวินิจฉัยผิดได้บ้าง ซึ่งถ้ามีผู้ป่วยตามนี้ในงานวิจัยจำนวนมากจะทำให้ความน่า เชื่อถือของงานวิจัยลดลงได้

3.ผู้ป่วยขาดการติดต่ออาจมีผลบ้างในกรณีที่รายนั้นใช้เกณฑ์วินิจฉัยจากการดูการตอบสนองต่อการรักษา

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (expected Benefits and Application)

1. สามารถทราบจำนวนที่เหมาะสมในการส่งน้ำเจาะปอดเพื่อตรวจด้วยเทคนิค PCR ที่ให้ประสิทธิผลที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการกำหนดจำนวนน้ำเจาะปอดในการส่งตรวจ PCR ในอนาคต ซึ่งจะสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้และเป็นการใช้เทคนิค PCR ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. หากการตรวจด้วย PCR น้ำเจาะปอดมีความไวมากกว่าการเพาะเชื้อ รวมทั้งข้อมูลเดิมก็ชี้ให้เห็นว่าเป็นการตรวจที่มีความจำเพาะสูงมากและให้ผลเร็ว การตรวจ PCR อาจสามารถนำมาใช้เป็นมาตรฐาน gold standard ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดในอนาคต

3. ทราบถึงประสิทธิภาพในการตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์โดยเทียบกับข้อมูลจากแหล่งอื่นๆ

4. ทราบความชุกของวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ในผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในช่วงเวลาดังกล่าว

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problems)

1. โรคร่วม เช่น โรคเอดส์ อาจมีผลให้มีเชื้อในน้ำเจาะปอดมากกว่าปกติ แก้ไขโดยการแยกกลุ่มวิเคราะห์

2. เทคนิค PCR อาจมีผลบวกลวงจากการปนเปื้อน แก้ไขโดยการตรวจสอบวิธีให้เป็นมาตรฐาน ซึ่งเป็นวิธีทางห้องปฏิบัติการอยู่แล้ว

3. เทคนิค PCR อาจมีผลลบลวงจากสารยับยั้ง (inhibitor) แก้ไขโดยการทำ positive and negative control ควบคู่กันไป

4. ขั้นตอนการเก็บ specimen อาจมีการปนเปื้อนหรือล่าช้า ซึ่งอาจแก้ไขโดยการทำความเข้าใจ และส่ง specimen ไปที่ห้องปฏิบัติการด้วยตนเองของผู้วิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับวัณโรค

แบคทีเรียวิทยา (Mycobacteriology)

เชื้อวัณโรค (*Mycobacterium tuberculosis*) อยู่ใน Family: *Mycobacteriaceae*, order: *Actinomycetaceae*, genus: *Mycobacterium* เป็นเชื้อแบคทีเรียทรงแท่ง (Bacillus) ขนาดยาว 2-4 ไมครอน (micron) และกว้าง 0.2-0.6 ไมครอน เชื้อวัณโรคไม่สามารถเคลื่อนไหวได้เพราะไม่มี cilia และ flagella ไม่สร้าง toxin ถ้าย้อมด้วยวิธีของแกรมจะติดสีจางๆหรือไม่ติดสี (weakly stained gram-positive or gram-neutral) ลักษณะของเชื้อวัณโรคหรือเชื้อในกลุ่มมัยโคแบคทีเรีย คือ ถ้าย้อมด้วยสีประเภท acrylmethane dye เช่น carbofuschin หรือ auramine-O จะไม่สามารถล้างสีออกได้ด้วยกรด เรียกคุณสมบัติทนกรด (acid-fastness) ซึ่งเกิดจากการมีชั้นของไขมันโดยเฉพาะ mycolic acid อยู่ชั้นนอกของเซลล์ทำให้เมื่อสีย้อมซึมผ่านไปใน cytoplasm แล้ว กรดที่ใช้ล้างจะไม่สามารถซึมเข้าไปล้างสีออกได้ ซึ่งในกรณีที่เชื้อวัณโรคตายแล้วแต่โครงสร้างดังกล่าวอาจจะยังคงอยู่ทำให้ยังย้อมติดสีทนกรดได้ เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน Family เดียวกับเชื้อวัณโรคจะพบว่ามีคุณสมบัติทนกรดได้เช่นเดียวกัน เช่น *Nocardia spp., Rhodococcus spp.* และเชื้อ Nontubersulous Mycobacterium อื่นๆ เป็นต้น แต่จะติดสีทนกรดแบบไม่สม่ำเสมอ เนื่องจาก mycolic acid มีขนาดเล็กกว่า เชื้อ *M.tuberculosis* เป็นเชื้อที่พบในรอยโรคของผู้ป่วยเท่านั้นไม่พบในสิ่งแวดล้อม

เชื้อวัณโรคและเชื้อในกลุ่มวัณโรค (Mycobacterium tuberculous complex) ประกอบด้วยเชื้อ 6 species คือ

1. *Mycobacterium tuberculosis*
2. *Mycobacterium africanum*
3. *Mycobacterium bovis*
4. *Mycobacterium bovis BCG*
5. *Mycobacterium microti*
6. *Mycobacterium canetti*

ซึ่งเชื้อวัณโรคและเชื้อในกลุ่มวัณโรค (Mycobacterium tuberculous complex) ทั้งหมดสามารถก่อโรคในมนุษย์ได้ และมีลักษณะทางคลินิคไม่แตกต่างกัน ดังนั้นต้องอาศัยการเพาะเชื้อและการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) โดยที่เชื้อวัณโรค (*M.tuberculosis*) มีลักษณะที่พิเศษ คือ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ให้ผลบวกในการทดสอบ niacin test (ร้อยละ 98) และดื้อต่อสารเคมี thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH)

ชีวโมเลกุลของเชื้อวัณโรค[28]

เชื้อวัณโรค เป็นเชื้อที่มี genome เท่ากับ 4,411,529 คู่เบส มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $3x10^6$ กิโลดาลตัน ประกอบด้วยเบส guanine, cytosine สูงถึง 65.6% ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียตัวอื่นๆ

ใน genome ของมัยโคแบคทีเรียแต่ละชนิด มีส่วน DNA insertion sequence ที่ไม่เหมือนกัน ดังแสดง

ลำดับเบส	เชื้อ	จำนวน COPIES
IS6110(IS986)	*M.tuberculosis complex*	0-20
IS1081	*M.tuberculosis complex*	5-6
IS1245	*M.avium*	2-27
IS901	*M.avium*(bird pathogen only)	2-8
IS900	*M.paratuberculosis*	15-20
IS100	*M.fortuitum,* single strain	4

Insertion sequence ที่พบใน *M.tuberculosis* เรียกว่า IS6160 ซึ่งพบใน *M.bovis* ด้วย แต่พบใน *M.tuberculosis* สูงกว่าที่พบใน *M.bovis* (5-17 copies ในเชื้อ *M.tuberculosis* และ1-5 copies ในเชื้อ *M.bovis*)

IS6110 เป็นส่วนของสารพันธุกรรม DNA ที่มีความยาว 1361 ค่เบส และมีส่วนปลาย 28 คู่เบส เนื่องจากความจำเพาะดังกล่าว และแม้ว่า *M.bovis* จะสามารถก่อโรคในคนได้ แต่พบน้อยมาก จึงได้มีการประยุกต์นำเอา IS6110 มาเป็น primer ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจ และใช้ในการทำ DNA fingerprint กล่าวคือ เมื่อสกัดเอา สายพันธุกรรม DNA จากเชื้อที่เพาะขึ้นแล้ว ใช้เอ็นซัยม์ endonuclease Pvu II เพื่อตัด DNA ที่อยู่ใน IS6110 นั้น แล้วนำมาแสดงผลโดย gel electrophoresis ลักษณะของแถบที่เหมือนกันจะบอกว่าเป็นเชื้อ *M.tuberculosis* สายพันธุ์เดียวกัน แถบที่ต่างกันบ่งถึงสายพันธุ์ที่ต่างกันจึงมีประโยชน์ในแง่การสืบสวนการระบาดของวัณโรคได้

ในเชื้อวัณโรคส่วนที่เป็น ribosome จะมี RNA ที่มีคุณลักษณะจำเพาะที่เรียกว่า 16S rRNA ซึ่งมีอยู่ประมาณ 2000 copies ต่อเซลล์ จึงสามารถใช้เป็น RNA เป้าหมายในการตรวจหาเชื้อวัณโรคได้เช่นเดียวกันกับ การตรวจ IS6110 ในกรณีของ DNA

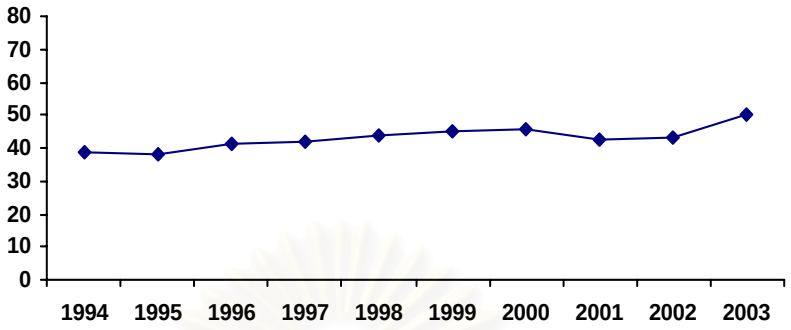
การศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาของวัณโรคในระดับยีน พบว่าการดื้อยาต่อยา Isoniacid มีความผิดปรกติของยีน 2 ชนิดที่เรียกว่า katG และ inhA โดยที่ยีน katG มีหน้าที่ควบคุมการสร้างเอ็นซัยม์ catalase-peroxidase ส่วนยีน inhA ควบคุมการสร้างกรดไขมันอิสระ เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา Isoniacid เกือบทั้งหมดจะมีการขาดหายหรือการเปลี่ยนแปลงของยีน katG มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการเปลี่ยนแปลงของยีน inhA ส่วนการดื้อยา Rifampicin นั้น 97% มีการเปลี่ยนแปลงของยีน rhoB ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ ควบคุมการสร้างส่วนย่อยหนึ่งของเอ็นซัยม์ RNA polymerase ชนิดที่ต้องอาศัย DNA ส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาตัวอื่นๆยังไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันชัดเจน

จากความรู้ทางชีวโมเลกุลดังกล่าว ทำให้เกิดความรู้ใหม่ ความเข้าใจลักษณะเฉพาะ กลไกการดื้อยา พัฒนาการวินิจฉัยโรค และพัฒนายาใหม่ในอนาคต

ระบาดวิทยาของวัณโรค[38-40]

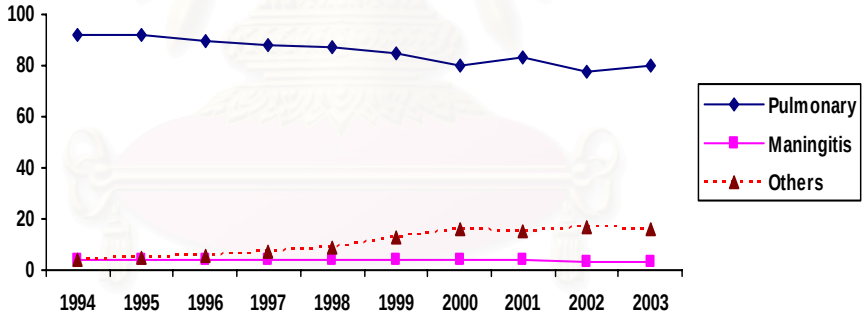
วัณโรค เป็นโรคติดต่อระบบทางเดินหายใจ ที่เป็นสาเหตุการตายมากกว่า 5,000 คน ต่อวันในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก หรือประมาณ 2 ล้านคนในแต่ละปี มีการคาดประมาณว่า ประชากรโลกจำนวนหนึ่งในสามติดเชื้อวัณโรคและร้อยละ 5 – 10 ของผู้ติดเชื้อวัณโรคดังกล่าว จะกลายเป็นผู้ป่วยในเวลาต่อมา องค์การอนามัยโลกคาดว่าระหว่าง ค.ศ. 2002 – 2020 จะมีผู้ติดเชื้อวัณโรครายใหม่ 1,000 ล้านคน ในจำนวนนี้ 150 ล้านคน จะล้มป่วย และ 36 ล้านคนจะเสียชีวิต หากไม่มีระบบป้องกันและควบคุมโรคอย่างดี และในทุกปี ประชากรจำนวน 8 ล้านคนต้องป่วยด้วยวัณโรค และร้อยละ 95 อยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนา

ข้อมูลจากระบบเฝ้าระวังโรคทั่วประเทศไทย พบว่าจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2545 มากกว่า 5,000 ราย โดยในปี พ.ศ. 2546 มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 34,643 ราย อัตราป่วย 55.04 ราย ต่อประชากรแสนคนและมีจำนวนผู้ป่วยเสียชีวิต 219 ราย อัตราตาย 0.35 รายต่อประชากรแสนคน ดังแผนภูมิที่ 1



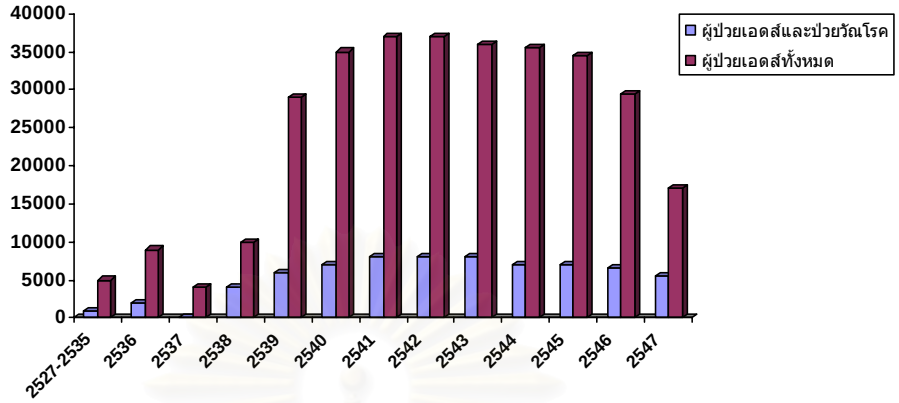
รูปที่ 1 อัตราป่วยด้วยวัณโรคทุกชนิด ต่อประชากรแสนคน พ.ศ.2537 – 2546

เมื่อจำแนกผู้ป่วยวัณโรคตามอวัยวะที่เกิดโรค ผู้ป่วยวัณโรคปอด ยังคงมีสัดส่วนสูงกว่าผู้ป่วยวัณโรคชนิดอื่น ๆ และมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ซึ่งในปี พ.ศ. 2546 มีผู้ป่วยวัณโรคปอด ร้อยละ 85.2 ดังรูป2



รูปที่ 2 สัดส่วนร้อยละของผู้ป่วยวัณโรค จำแนกตามอวัยวะที่เกิดโรค ประเทศไทย พ.ศ. 2537 – 2546

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยเอดส์ทั้งหมดและผู้ป่วยเอดส์ที่ป่วยด้วยวัณโรคปอด พบว่าจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับรายงานมีจำนวนลดลง โดยจำนวนผู้ป่วยที่ป่วยด้วยวัณโรค ตั้งแต่ พ.ศ.2541 ที่ได้รับรายงาน มีประมาณ 8,000 ราย จนถึง พ.ศ.2546 ดังรูป 3



รูปที่ 3 จำนวนผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยเอดส์ที่ป่วยด้วยวัณโรค ประเทศไทย พ.ศ. 2527 – 2547

ปัญหาวัณโรคยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ในอดีตปัญหาวัณโรคถูกละเลยในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา เพราะวัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรัง ที่ไม่อาจจะรู้ได้ว่าใครบ้างจะติดเชื้อ การให้ความสำคัญของวัณโรคได้ลดน้อยลง ในระยะ 2 – 3 ปี ที่ผ่านมา อัตราป่วยวัณโรคของประเทศไทย ดูเหมือนจะคงที่ และอัตราลดลง แต่ในปี พ.ศ. 2546 แนวโน้มของอัตราป่วยวัณโรคกลับเริ่มเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้ปัญหาสำคัญของวัณโรคในปัจจุบันที่กลับเพิ่มขึ้น มีสาเหตุจากหลายประการ คือ การแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวี การดื้อยา (Multiple drug resistant) ความครอบคลุมในการรักษาพยาบาล คุณภาพของแผนงานวัณโรคแห่งชาติ (Quality of National Tuberculosis program :NTP) และการเคลื่อนย้ายประชากร โดยเฉพาะแรงงานต่างชาติที่เข้ามาประกอบอาชีพในประเทศไทย จากสถานการณ์วัณโรคดังกล่าว พบว่า กลุ่มผู้ป่วยวัณโรค ยังกระจายอยู่ในกลุ่มประชากรที่มีเศรษฐานะต่ำ กลุ่มผู้สูงอายุ และประกอบอาชีพเกษตรกรรมและอาชีพรับจ้าง มีภูมิลำเนาอยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

สำหรับวัณโรคนอกปอด เช่น วัณโรคเยื่อหุ้มปอด วัณโรคต่อมน้ำเหลือง เนื่องจากเชื้อที่เป็นสาเหตุมีน้อย และการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อหาเชื้อทำได้ยากกว่า ปัญหาการรักษาจึงอยู่ที่การวินิจฉัยโรคให้ถูกต้องเพื่อป้องกันการเกิดตามมาของวัณโรคปอดและที่อวัยวะอื่นที่มีความรุนแรงและมีโอกาสแพร่เชื้อมากขึ้น

บทที่ 3
ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

วัณโรคเยื่อหุ้มปอด[19, 28]

พยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยา

การเกิดของวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเฉพาะส่วนของภูมิคุ้มกันแบบพึ่งพาเซลล์ (cell mediated immunity) โดยอาจเป็นผลจากการติดเชื้อเมื่อ 6-12 สัปดาห์ก่อน (postprimary) หรือเกิดจากการกำเริบของเชื้อวัณโรคที่เคยติดเชื้อมานาน (reactivation) ก็ได้ เริ่มแรก mycobacteria สามารถเข้าสู่โพรงเยื่อหุ้มปอดได้โดยผ่านการแตก (rupture) ของ subpleural caseous focus ในปอด โดยมีหลักฐานสนับสนุนจากการค้นพบของ Stead และคณะซึ่งได้รายงานการตรวจพบ caseous tuberculous focus ในปอด บริเวณที่ใกล้กับเยื่อหุ้มปอดที่มีความผิดปกติขณะทำการผ่าตัด ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 12 รายจากทั้งหมด 15 โดยผู้ป่วยอีก 3 รายที่เหลือในรายงานนั้นมีวัณโรคปอดร่วมด้วย แม้จะไม่พบ caseous foci บริเวณใกล้ๆกับเยื่อหุ้มปอดก็ตาม

กลไกในการเกิดสารน้ำในวัณโรคเยื่อหุ้มปอดขึ้นนั้น เชื่ว่าเกิดจากปฏิกริยาแบบ Delayed type hypersensitivity มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง[41-43] แสดงถึงปฏิกิริยาดังกล่าวโดยเมื่อฉีด Purified protein derivative (PPD) เข้าโพรงเยื่อหุ้มปอดของสัตว์ที่เคยถูก immunize ด้วย tuberculous protein มาก่อน 3-5 สัปดาห์แล้ว จะทำให้เกิดสารน้ำที่มีลักษณะเป็นเอกซูเดทขึ้นภายใน 12-48 ชั่วโมง และถ้าให้ antilymphocyte serum เข้าไปก่อนจะป้องกันการเกิดสารน้ำได้[43] ซึ่งมีรูปแบบการกระตุ้นและยับยั้งเหมือนกับที่พบใน Delayed type hypersensitivity ต่อ PPD ที่ผิวหนัง ในการศึกษาพบว่าใน 24 ชั่วโมงแรก[44] เซลล์ที่พบมาในน้ำเจาะปอดจะเป็นเซลล์ชนิด PMN ต่อมาจะพบเซลล์ที่มากที่สุดในน้ำเจาะปอด ซึ่งเซลล์ในช่วงหลังจะมีเซลล์ลิมโฟซัยท์มากขึ้นจนในที่สุดเป็นเซลล์ที่มากที่สุดในน้ำเจาะปอด ซึ่งเซลล์ในช่วงหลังจะมีบทบาทในการเกิด granuloma ต่อไป ซึ่งเกี่ยวข้องกับสารต่างๆมากมายเช่น interleukin 2, IFN เป็นต้น ถ้าทำให้สัตว์เกิดภาวะที่มีเซลล์ PMN ต่ำในเลือด (neutropenia) ก่อน พบว่าจะทำให้การเกิดสารน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอดและการอักเสบลดลง[44] ซึ่งจะกลับเป็นปกติได้โดยการฉีด PMN เข้าไปในโพรงเยื่อหุ้มปอดทำให้เกิดความคิดว่าเซลล์ PMN ในโพรงเยื่อหุ้มปอดเป็นเซลล์ที่มีความสำคัญในการเกิดสารน้ำในวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

เมื่อเกิดปฏิกิริยาแบบ Delayed type hypersensitivity ขึ้น จะทำให้เกิดการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านได้ (permeability) ของเยื่อหุ้มปอดต่อโปรตีนทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณโปรตีนและ oncotic pressure ซึ่งทำให้เกิดการดึงน้ำไว้ในโพรงเยื่อหุ้มปอดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่ามีการกีดขวางของการดูดกลับสารน้ำและโปรตีนจากรู (stromata) ที่เยื่อหุ้มปอดด้าน parietal ด้วย ทำให้เกิดการสะสมของสารน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอดในที่สุด[45]

อุบัติการณ์

อุบัติการณ์ของวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีความแตกต่างกันมากในแต่ละท้องถิ่น โดยพบประมาณ 20-35% ของผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมด ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่มีความแน่ชัดว่าการติดเชื้อ HIV ร่วมด้วยจะทำให้เกิดวัณโรคเยื่อหุ้มปอดร่วมด้วยหรือไม่ แม้ว่าในทางทฤษฎีอาจเชื่อได้ว่าขณะที่ภูมิคุ้มกันลดลงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV น่าจะทำให้มีการเกิดสารน้ำลดลงเนื่องจากพบว่าการเกิดปฏิกิริยาแบบ Delayed type hypersensitivity มีน้อยลงในผู้ป่วยเหล่านี้[46, 47]

อาการทางคลินิก

โดยทั่วไปผู้ป่วยมักมีอาการมาไม่นาน จากการศึกษาของ Levine และคณะ [37] พบว่า 30% มีอาการน้อยกว่า 1 สัปดาห์ และ 60% มีอาการน้อยกว่า 1 เดือน อาการที่พบส่วนมากคือไอแห้งๆ (70%), เจ็บหน้าอก (50-70%) ซึ่งมักเป็นแบบ pleuritic ผู้ป่วยมักมีไข้โดยที่บางรายอาจมาด้วยอาการแบบเรื้อรัง เช่น ไข้ต่ำๆ อ่อนเพลีย และมีอาการเหนื่อยจากสารน้ำ[12, 48, 49]

สารน้ำในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมักพบข้างเดียวโดยที่มักเป็นข้างขวามากกว่าข้างซ้าย น้อยมากที่จะพบทั้ง 2 ข้าง ปริมาณสารน้ำมักอยู่ในระดับน้อยถึงปานกลาง[12, 49] ในการศึกษาของ Maher และ Berger[50] พบว่าผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดปริมาณมากๆนั้นมีสาเหตุจากวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้ประมาณ 4% นอกจากนั้น 1 ใน 3 ของผู้ป่วยที่สารน้ำในโพรงปอดจากวัณโรค จะพบความผิดปกติของเนื้อปอดจากภาพรังสีปอดร่วมด้วย[12]

สารน้ำในโรคนี้จะเป็นแบบ exudates และมักมีสีเหลืองทอง (straw color) มีโปรตีนสูงเฉลี่ยประมาณ 5.0 กรัมต่อดล. เม็ดเลือดขาวที่พบเด่น 50% คือเซลล์ lymphocyte แม้ว่าในรายที่มีอาการน้อยกว่า 2 สัปดาห์อาจพบเซลล์ชนิด PMN เด่นกว่าได้[37]

ธรรมชาติของโรค

จากการศึกษาของ Roper และ Waring[51] ซึ่งได้ติดตามผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดและให้ผลบวกต่อการตรวจสอบที่ผิวหนังด้วย PPD จำนวน 141 คน พบว่าผู้ป่วยอาการและสารน้ำจะหายไปภายใน 2-4 เดือน แต่ผู้ป่วยจำนวน 92 ราย (65%) เกิดวัณโรคขึ้นที่ปอดหรืออวัยวะอื่นตามมาภายใน 5 ปี โดยไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารน้ำหรือการเกิดเยื่อหุ้มปอดหนาตัวหรือผลการเพาะเชื้อของสารน้ำเลย

การรักษาและวัณโรคเยื่อหุ้มปอดด้วยยาต้านวัณโรค สามารถลดการเกิดวัณโรคปอดหรือวัณโรคที่อวัยวะอื่นที่เกิดตามมาได้ การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดอย่างถูกต้องจึงมีความสำคัญ

การวินิจฉัย[19, 45]

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดอาศัยความรู้ทางพยาธิกำเนิดและพยาธิสรีระวิทยาดังกล่าวแล้วโดยสามารถแบ่งได้ดังนี้คือ

1. การตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุ เช่น

1.1 การย้อยสีทนกรดจากเสมหะ น้ำเจาะปอด หรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด โดยทั่วไปการตรวจจากเสมหะไม่ใช่การวินิจฉัยชี้ชัด การตรวจจากน้ำเจาะปอดนั้นไม่ได้ทำตามปกติ เนื่องจากมีโอกาสพบเชื้อน้อยมาก ส่วนการย้อมในชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดนั้นควรทำทุกรายที่สงสัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเพราะมีโอกาสพบเชื้อได้

1.2 การเพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะ น้ำเจาะปอด หรือ ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด การเพาะเชื้อจากเสมหะไม่สามารถบ่งถึงวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่ชี้ชัดได้แต่อาจรักษาและติดตามอาการได้ การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดและเยื่อหุ้มปอด มีความไวประมาณ 23-35% และ 50-80% ตามลำดับ[7-9] โดยที่หากชิ้นเนื้อไม่พบลักษณะเฉพาะทางพยาธิวิทยาพบว่ามีโอกาสพบเชื้อเพียง 10%[3] การใช้ระบบ BACTEC ในการเพาะเชื้อจะทำให้ทราบผลเร็วขึ้นจากเฉลี่ย 33 วันเหลือ 18 วัน (ค่ามัธยฐาน) แต่ความไวเพิ่มเพียงเล็กน้อย[9]

1.3 การใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอด จะได้กล่าวในบทต่อไป

2. การตรวจเพื่อหาหลักฐานของปฏิกิริยาแบบ Delayed type hypersensitivity เช่น การตรวจ Tuberculin test เป็นต้น มีความไวประมาณ 70% และความจำเพาะไม่ดีนัก ในรายที่ให้ผลลบเชื่อว่าเกิดจากการมีเซลล์ยับยั้ง (suppressor cell) ในกระแสเลือดซึ่งยับยั้งปฏิกิริยาของ T-lymphocyte หรือเกิดจากการที่ T-lymphocyte ชนิด CD4+ ไปรวมกันอยู่บริเวณที่เกิดการอักเสบในขณะนั้นมาก (compartmentalization) ก็ได้[12, 52, 53]

3. การตรวจเพื่อหาหลักฐานทางภูมิคุ้มกันอื่น เช่น การตรวจหาภูทิต้านทานชนิด antibody ต่อเชื้อวัณโรค มีการศึกษาของ Yew WW,et al.[54] และการศึกษาของ Banchuin N, et al.[55] พบว่ามีแอนติเจนบางอย่าง เช่น tubulostearic acid หรือพบ Anti PPD IgG มากในน้ำเจาะปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด แต่ค่าที่ได้ยังคาบเกี่ยวกันมากกว่าที่จะนำมาใช้ทางคลินิก

4. การตรวจหาสารที่เกิดจากการอักเสบ[1, 19, 45] เช่น การหาสาร ADA การหาสาร IFN-γ ในน้ำเจาะปอดเป็นต้น ซึ่งเป็นการตรวจโดยอ้อม มีรายละเอียดพอสังเขปดังนี้คือ

สาร ADA (Adenosine deaminase) เป็นเอ็นซัยม์ที่พบได้ในเซลล์ต่างๆของร่างกายพบมากใน lymphocyte ที่ได้รับการกระตุ้นทางปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันและสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ปัญหาของการใช้ระดับ ADA ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดคือ ระดับต่ำสุดที่ใช้ตัดนั้นมีค่าต่างกันไปในแต่ละกลุ่มประชากรและความชุกของวัณโรคในแต่ละท้องถิ่น นอกจากนั้นยังสามารถเกิดผลบวกลวงได้ในหลายโรค คือ ภาวะสารน้ำจากโรค SLE โรคมะเร็งต่อมน้ำเหลือง โรคมะเร็งปอด เป็นต้น การแก้ไขอาจต้องพิจารณาร่วมกับอาการทางคลินิก และหา ADA-2 ทำไม่ได้ทั่วไป

สาร IFN-γ สร้างขึ้นมาจาก T-lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นเช่นกัน กับสาร ADA มีหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นแมคโครฟาจ (macrophage) ให้กำจัดเชื้อก่อโรคชนิดอยู่ในเซลล์ การใช้วิธีนี้ต้องทำด้วยความละเอียดและค่าใช้จ่ายสูง มีปัญหาเรื่องเกณฑ์ที่ใช้ในแต่ละท้องถิ่น การเกิดผลบวกลวงเช่นกันและขึ้นกับการเกิดภูมิคุ้มกันว่ามากน้อยเพียงใด

5. การตรวจหาลักษณะทางพยาธิวิทยาที่เฉพาะต่อวัณโรคเยื่อหุ้มปอด เช่นการพบลักษณะ caseous granuloma เป็นต้น

สำหรับการพบ non-caseating granuloma นั้นอาจพบได้ในโรคอื่นด้วย เช่น การติดเชื้อรา ของเยื่อหุ้มปอด โรคเยื่อหุ้มปอดอักเสบรูมาตอยด์ โรค tularemia เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม สาเหตุส่วนใหญ่ของลักษณะพยาธิสภาพนี้ ประมาณ 95% มีสาเหตุมาจากวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

ดังจะเห็นได้ว่า การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นไปได้ไม่ง่ายนัก บางวิธีต้องอาศัยเวลานาน บางวิธีมีข้อจำกัด ต้องร่วมกับวิธีอื่นหรือ ร่วมกับกอการทางคลินิก ในบางครั้งอาจต้องใช้วิธีการวินิจฉัยโดยการรักษา (Therapeutic diagnosis) แล้วติดตามอาการเป็นระยะๆ

การรักษา[19, 45]

การรักษาวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีจุดมุ่งหมาย 3 ประการคือ เพื่อป้องกันการเกิดวัณโรคปอดหรือที่อวัยวะอื่นตามมา เพื่อบรรเทาอาการของผู้ป่วย และเพื่อป้องกันการเกิดภาวะพังผืดในช่องเยื่อหุ้มปอด (fibrothorax)

การรักษาด้วยยาต้านวัณโรค ตามคำแนะนำของสมาคมโรคทรวงอกแห่งสหรัฐอเมริกา (America Thoracic Society) ให้ใช้ระบบยารวม 6 เดือนแบ่งเป็น 2 ระยะคือ ระยะแรก 2 เดือนใช้ยาไอโซไนอะซิด ไรแฟมปิซิน พัยราซินามัยด์ และอีแธมบูทอลร่วมด้วยในประเทศที่มีการดื้อยาแรกเริ่มต่อไอโซไนอะซิด มากกว่า 4% หรือมาจากประเทศนั้นๆหรือเคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคมาก่อน หรือมีการสัมผัสต่อเชื้อวัณโรคดื้อยา เหล่านี้ข้อใดข้อหนึ่ง สำหรับในระยะที่ 2 ให้ใช้ยาไอโซไนอะซิด และไรแฟมปิซิน เป็นเวลา 4 เดือน

หลังการรักษาโดยทั่วไปผู้ป่วยจะไม่มีไข้ภายใน 2 สัปดาห์ บางรายอาจมีไข้ได้ถึง 2 เดือน ระยะเวลาเฉลี่ยในการหายของสารน้ำประมาณ 6-12 สัปดาห์ 50% ของผู้ป่วยจะเกิดเยื่อหุ้มปอดหนาตัว 6-12 เดือนหลังเริ่มรักษา[56] แต่มีน้อยรายที่จะทำให้เกิดอาการจนต้องทำการลอกเยื่อหุ้มปอด (decortication) ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีที่จะทำนายหรือวิธีการป้องหันการหนาตัวของเยื่อหุ้มปอดได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเทคนิค PCR

เทคนิค PCR [28, 57, 58]

เทคนิค PCR (PCR = Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคใหม่ทางด้านอณูชีววิทยา คิดค้นขึ้นโดย Kary B. Mullis ในปี ค.ศ. 1985 เป็นวิธีเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม DNA ส่วนที่มีความจำเพาะต่อจุลชีพที่ต้องการตรวจหา ทางทฤษฎีจะทำให้สามารถตรวจพบจุลชีพก่อโรคเพียง 1 เซลล์ในสิ่งส่งตรวจต่างๆได้ ขั้นตอนของการทำ PCR เป็นการเลียนแบบการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม DNA (DNA replication) ในหลอดทดลองโดยให้เกิดซ้ำ กันหลายรอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. จะใช้ความร้อนขนาด 90-95 ºC เพื่อทำให้ DNA สายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้เรียกว่า denaturation
2. ต่อไปเป็นขั้นตอนที่เรียกว่า primer annealing ทำได้โดยลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 40-60 ºC เพื่อให้สายนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ขนาดยาว 20-30 เบสที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความนำเพาะต่อเชื้อวัณโรคเข้าไปจับคู่สมกับ DNA สายเดี่ยวต้นแบบ (template)
3. ขั้นต่อไปคือ primer extension อาศัยเอ็นไซม์ Taq Polymerase ในการสร้างสาย DNA ต่อจากไพรเมอร์ทางด้าน 3-OH จนได้เป็นสาย DNA ขนาดยาวเท่าที่ต้องการ โดยเอ็นไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 ºC

เวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนจะประมาณ 30 วินาทีถึง 2 นาที รวม 3 ขั้นตอนเรียกว่าเป็น 1 รอบของ PCR เมื่อทำซ้ำๆจำนวนหลายๆรอบทำให้สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่จำเพาะจากเดิมได้อย่าง exponential ผลผลิตจะเท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของ PCR)

การพัฒนานำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจนั้น สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆตามเป้าหมายของสารพันธุกรรมที่ขยายคือ เป้าหมายที่เป็น RNA และเป้าหมายที่เป็น DNA สำหรับเชื้อวัณโรคนั้นเป็นเชื้อที่มีขนาดจีโนมเท่ากับ 4,411,529 คู่เบส และ

มี guanine, cytocine สูงถึง 65.6% ชิ้นส่วน DNA ของเชื้อวัณโรคที่มีกลุ่มผู้วิจัยเลือกมาเป็นเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR สามาถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. DNA ส่วนยีนที่ทำหน้าที่เฉพาะ และสร้างผลผลิตที่มีการศึกษารายละเอียดมาแล้วเช่น ยีน gro EL ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนฮีทช็อคที่มีขนาดโมเลกุล 65 kD

   ยีน MPB 64 ควบคุมการสร้างโปรตีน MPB 64
   ยีน PAB ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนบี ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 38 Kd
   ยีน MPB 70 ควบคุมการสร้างโปรตีนของมัยโคแบคที่เรียขนาด 32 kD
   และยีนสำหรับการสังเคราห์ 16S rRNA

2. DNA ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ แต่มีการทดลองแสดงผลว่าเป็น DNA ที่จำเพาะพบในเชื้อวัณโรค มีทั้งที่มีเพียง 1 ชุดใน 1 จีโนมเช่น mtp 40, pT7T3 18U, pPH 7311, ชิ้นส่วน DNA Mt 308 และที่มีหลายชุดต่อ 1 จีโนมเช่นชิ้นส่วน DNA p36T, pCM3, pMTbsk2 และ M13Ke39 ซึ่งชิ้น DNA ใน M13KE39 จากการศึกษาลำดับเบสต่อมาพบว่าจัดเป็น DNA กลุ่ม insertion sequence (IS) มีชื่อว่า IS6110 หรือ IS986

ความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่จะจำเพาะต่อ มัยโคแบคที่เรียกลุ่มก่อวัณโรค ส่วนความไวของไพรเมอร์ชุดต่างๆที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA โดยวิธี PCR ได้ปริมาณระหว่าง 50 พิโคกรัม (pg) ถึง 1 เฟมโตกรัม (fg) ไพรเมอร์ของ DNA ที่จำเพาะหลายชุดในจีโนม จะมีความไวสูงกว่าไพรเมอร์จากยีนที่มีเพียง 1 ชุดในจีโนมประมาณ 10-20 เท่า และ DNA เป้าหมายที่จะใช้เริ่มในหารทำ PCR เพื่ให้ได้ผลบวก เมื่อตรวจทางรังสีโดยวิธี autoradiography หลังการทำ DNA hybridization จะมีปริมาณต่ำสุดถึง 10-1 fg

<u>การใช้เทคนิค PCR ตรวจสิ่งส่งตรวจต่าง ๆเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค</u>

การพัฒนานำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรม ของเชื้อวัณโรค ในสิ่งส่งตรวจนั้นเริ่มโดย Brisson Noel A. และคณะ[59] เมื่อ ค.ศ. 1989 โดยตรวจเสมหะ น้ำล้างกระเพาะ ชิ้นเนื้อหนองจากแผล พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงมาก (100%) แต่ยังเป็นการศึกษาในผู้ป่วยจำนวนน้อย ต่อมาได้มีการศึกษาในสิ่งส่งตรวจอื่น เช่น น้ำล้างหลอดลม เซรุ่ม น้ำเจาะปอด ในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นซึ่งให้ผลแตกต่างกันไปดังแสดงในตาราง

ตารางแสดงงานวิจัยด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจต่างๆ [58]

ผู้วิจัย	primer	ชนิดของสิ่งส่งตรวจ	ความไว	ความจำเพาะ
Brisson-Noel et al 1989	gro EL	เสมหะ น้ำล้างกระเพาะ ชิ้นเนื้อ หนองจากแผล	100% (12/12)	100% (20/20)
Pao ml et al 1990	gro EL	เสมหะ น้ำในโพรงปอด	100% (49/49)	62.6% (166/236)
Pierre C. et al 1991	gro EL	เสมหะ น้ำล้างกระเพาะ	100% (24/24) เทียบกับผลเพาะเชื้อ 63% (35/59) เทียบกับผลเพาะเชื้อและอาการทางคลินิก	91% (21/23)
Seeling R et al 1991	gro EL	เสมหะ น้ำล้างกระเพาะ น้ำล้างปอด น้ำในโพรงปอด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง เลือด ชิ้นเนื้อ ไขกระดูก อุจจาระ	93.8%	-
Brisson-Noel et al 1991	Gro EL IS6110	เสมหะ น้ำล้างกระเพาะ น้ำล้างปอด น้ำในโพรงปอด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง เลือด ชิ้นเนื้อ หนองและอื่นๆ	98.2% (108/110)	78.8% (156/198)
Thierry D et al 1990	IS6110 gro EL	เซรุ่ม เสมหะ น้ำไขสันหลัง น้ำเจาะจากปอด	100% (30/30)	90.9% (50/55)

De Lassence A. et al 1992	IS6110 gro EL	น้ำเจาะจากปอด	60% (9/15) 20% (3/15)	-
Walker DA et al 1992	IS6110 gro EL	เสมหะ น้ำล้างปอด	80% (4/5) (active disease)	89.3% (50/56) 65.1% (28/43)
Saboor SA et al 1992	IS6110 gro EL	น้ำล้างหลอดลม น้ำล้างปอด	61.5% (8/13) (active diaease) 32.7% (16/49) (old TB)	90.9% (20/22)
Eisenach KD et al 1991	IS6110	เสมหะ	97.7% (43/44) เทียบกับการเพาะเชื้อ	91.5% (108/118)
Buck GE et al 1991	IS6110	ไม่บอกชนิด	92% (24/26) เทียบกับการเพาะเชื้อ	100% (17/17)
Shawar RM et al 1993	IS6110	ไม่บอกชนิด	66% (24/36) ย้อมด้วย ethidium bromide 77% (28/36) ตรวจแถบ DNA ด้วย DIG system 75% (26/34) (AP system)	100% (40/40) 95% (38/40) 100% (40/40)
Folgueira L et al 1993	IS6110	เสมหะ น้ำเจาะปอด ปัสสาวะ	100% (71/71)	81.8% (45/51)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Kolk AHJ et al 1992	IS986	น้ำไขสันหลัง เสมหะ เลือด น้ำเจาะปอด ปัสสาวะ ไขกระดูก ชิ้นเนื้อ หนอง	95.6% (43/45)	80.2% (142/177)
Shankar P et al 1991	MPB64	เสมหะ น้ำไขสันหลัง	8/8 เสมหะ 22/34 น้ำไขสันหลัง	88.2% (45/51)
Kaneko K et al 1990	MPB64	น้ำไขสันหลัง	83.3% (5/6)	-
Soini H et al 1992	Gene for 32kD Ag	เสมหะ	55.9 19/34)	93.5% (87/93)
Cousins DV et al 1992	MPB70	เสมหะ ปัสสาวะอุจจาระ น้ำล้างปอด เนื้อปอด	97% (64/67)	75.5% (83/110)
Portillo PD et al 1991	mtp40	เสมหะ น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ	100% (14/14) เทียบกับการย้อมสีทนกรดและการเพาะเชื้อ	71.4% (10/14)
De Wit D et al 1990	p36	น้ำไขสันหลัง น้ำเจาะปอด น้ำจากโพรงเยื่อหุ้มหัวใจ ชิ้นปอด	100% (14/14) เทียบกับการเพาะเชื้อ	-
Sritharan V, Barker Jr.R.H 1991	pMTb4	สิ่งส่งตรวจจากระบบทางเดินหายใจ	100% (74/74) เทียบกับการเพาะเชื้อ	36.4% (14/22)

Altamirano M et al 1992	pT7T3 18U	เสมหะ	98% (43/44) เทียบกับการเพาะเชื้อ	100% (156/156)
Thierry D et ak 1992	Mt 308	เสมหะ น้ำเจาะปอด น้ำล้างกระเพาะ ปัสสาวะ น้ำล้างปอด ชิ้นเนื้อ	92.9% (13/14) เทียบกับการพาะเชื้อและหรือการย้อมสีทนกรด	93.8% (15/16)
Chareonrata nakul 1996	16S rRNA	น้ำล้างหลอดลม	77% (10/13) เทียบกับการเพาะเชื้อและหรือการย้อมสีทนกรด	83% (5/6)
Chaiprasert A et al 1996	16S rRNA	เสมหะ	1.9% (57/62) เทียบกับการเพาะเชื้อ	95.4% (42/44)

ดังจะเห็นได้ว่าผลการวิจัยต่างๆจะมีค่าความไวและความจำเพาะแตกต่างกันไปได้ ซึ่งปัจจัยหลักขึ้นกับจำนวนเชื้อที่นำมาตรวจ หากในสิ่งส่งตรวจมีเชื้ออยู่ปริมาณมาก เช่น จากเสมหะในผู้ป่วยวัณโรคปอดมักจะมีความไวสูงหรือหากทำการศึกษาเฉพาะกลุ่มที่ย้อมติดสีทนกรดและผลการเพาะเชื้อให้ผลบวกด้วยก็จะให้ผลบวกด้วยก็จะให้ผลบวกได้มากกว่าในกลุ่มที่ผลการเพาะเชื้อให้ผลบวกอย่างเดียว เนื่องจากมีเชื้อมากกว่า แต่ในทางปฏิบัติกลุ่มที่ย้อมติดสีทนกรดอยู่แล้วย่อมไม่เป็นปัญหาในการวินิจฉัย

<u>การใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอดเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด</u> [19, 23-27, 45]

สำหรับการศึกษาการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจน้ำเจาะปอดเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นมีมากมายหลายการศึกษาแต่ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีจำนวนน้อย และส่วนหนึ่งเป็นการศึกษาในสิ่งส่งตรวจหลายๆชนิดในการศึกษาเดียว[27] ทำให้ไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในประเทศไทยซึ่งมีความชุกของวัณโรคสูงได้

การศึกษาของ de Lassence A และคณะ[25] ในปี ค.ศ. 1992 นั้น เปรียบเทียบการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจหาสายพันธุกรรม IS6110 กับ ยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนของวัณโรคขนาด 65kD ซึ่งเป็น primer 2 ชนิดที่ต่างกันในสิ่งส่งตรวจ 15 ตัวอย่าง พบว่า การตรวจหา IS6110 มีความไวกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (60% เทียบกับ 20%) ซึ่งอาจช่วยอธิบายได้ว่า การที่ความไวในแต่ละการศึกษาต่างกันนั้นส่วนหนึ่งมีผลจากการใช้ primer ที่ต่างกัน

ในการศึกษาของ Querol และคณะ[24] เมื่อ ค.ศ. 1995 ศึกษาการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจหา IS6110 ในน้ำเจาะปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 21 ราย ในการศึกษานี้ ผลการเพาะเชื้อในน้ำเจาะปอดให้ผลบวกใน 52% และจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวกใน 67% พบพยาธิสภาพแบบ caseous granuloma มากถึง 72% ซึ่งบ่งว่าศึกษาในกลุ่มที่มีเชื้อวัณโรคอยู่มากกว่าที่พบทั่วไป จึงไม่เป็นที่น่าแปลกใจว่า ความไวกลุ่มย่อยที่ผลเพาะเชื้อให้ผลลบนั้นมีค่าเท่ากับ 60% ในการศึกษานี้ เมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นๆพบว่าอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่านี้คือประมาณ 20-60%

สำหรับการตรวจด้วยวิธี PCR จากเยื่อหุ้มปอดนั้นมีรายงานอยู่เพียงการศึกษาเดียว โดย N. Takagi และคณะ[60] ได้ใช้เทคนิค PCR ตรวจเยื่อหุ้มปอดพบว่ามีความไว 89% และมีความจำเพาะสูงถึง 100% อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยเพียง 28 ราย และเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 11 ราย เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้กับ ประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูงเช่นในประเทศไทยได้ นอกจากนั้น ประชากรในการศึกษานี้ยังมีเพียง 2 กลุ่มคือ วัณโรคเยื่อหุ้มปอด และ ที่เกิดจากมะเร็งเท่านั้น และขาดการเปรียบเทียบกับ PCR ของน้ำเจาะปอดในผู้ป่วยแต่ละราย ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่างกันมากในแต่ละการศึกษาดังกล่าว

ดังนั้นสรุปได้ว่า การศึกษาการใช้เทคนิค PCR ตรวจเยื่อหุ้มปอดมีข้อมูลน้อยมากและยังไม่เคยทำการศึกษาในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูงเช่นประเทศไทยมาก่อน นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคนี้ในการตรวจน้ำเจาะปอดนั้น มักจะไม่ได้ออกแบบให้ทดสอบในกลุ่มประชากรที่เหมาะสม ซึ่งในทางคลินิกเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่จะนำมาใช้ได้จริง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นทุกราย

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population)

ประชากรเป้าหมายทุกคนที่ยินดีเข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับการอธิบายรายละเอียดของโครงการแล้ว (Consecutive sampling) โดยผู้ป่วยทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทั้งแบบผู้ป่วยใน และผู้ป่วยนอกที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนธันวาคม 2547 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2548

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion Criteria)

1. ผู้ป่วยที่อายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไปทั้งหญิงและชาย
2. ผู้ป่วยที่ตรวจพบสารน้ำในโพรงปอดที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น (Lymphocytic exudative pleural effusion)
3. ผู้ป่วยที่รู้สาเหตุของสารน้ำในโพรงปอดแล้ว

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

1. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าการศึกษาแม้ได้อธิบายแล้ว
2. ผู้ป่วยที่มีโรคอันเป็นข้อห้ามในการเจาะปอดและตัดชิ้นเนื้อปอด
3. ผู้ป่วยที่ไม่สามารถติดตามการรักษาอย่างต่อเนื่องได้
4. ผู้ป่วยที่ไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดตามเกณฑ์ดังกล่าวข้างต้น

<u>การคำนวณขนาดตัวอย่าง</u>

จากสูตร $n = Z^2_{\alpha} P(1-P)/ d2$

n = จำนวนตัวอย่างในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

Z_{α} = $Z_{0.05}$ = 1.96 (two tail) ที่ความเชื่อมั่น 95%

d = acceptable error = 15%

P = ค่าความคาดหวังความไวของการตรวจ PCR ในที่นี้เท่ากับ 75%

$n = 1.962 (0.75)(0.25)/ (0.15)^2 = 33$ ราย

เนื่องจากความชุกของวัณโรคเยื่อหุ้มปอด เท่ากับ 60% ของผู้ป่วยที่มาด้วยมีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น ดังนั้นจะต้องใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 33 x (100/60) = 55 ราย

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. ซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจสอบยาที่รับประทานอยู่ และบันทึกข้อมูล
2. เจาะเลือดตรวจหาระดับโปรตีน, LDH
3. Anti HIV (ในรายที่มีข้อบ่งชี้หรือได้รับ การวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคปอดหรือนอกปอด)
4. เจาะน้ำในโพรงปอดและตัดเยื่อหุ้มปอด ส่งตรวจ

<u>น้ำเยื่อหุ้มปอด</u>

- ส่งตรวจโปรตีน, LDH ที่ห้องปฏิบัติการตึกเวชศาสตร์ชันสูตร (5 ml)
- ส่งตรวจเม็ดเลือดขาวและนับแยกชนิดที่ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคปอดตึกจิรประวัติ (5 ml)
- ส่งตรวจเซลล์วิทยาที่หน่วยพยาธิวิทยา (10 ml)
- ปั่น (centrifuge) ที่ 5,000 รอบต่อนาที, 30 นาที นำ Pellet ไปย้อมสีทนกรดโดย Ziehl-Nielsen method และเพาะเชื้อวัณโรค (10 ml, 50 ml)

- ส่งตรวจทาง PCR ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา (1 ml, 10 ml, 50 ml, และ 150 ml) โดยเติมสาร EDTA 1 mg/ pleural fluid 50 ml เพื่อป้องกันการแข็งตัวของน้ำเยื่อหุ้มปอด

ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด

- ส่งตรวจทางพยาธิวิทยาที่ตึกพยาธิวิทยา อย่างน้อย 2 ชิ้นใส่สารละลายฟอร์มาลิน
- ส่งเพาะเชื้อวัณโรค 2 ชิ้นโดยใส่ใน 0.9% Sodium Chloride 5 ml

5. ให้การรักษาตามอาการ และถ้ามีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จะได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค โดยทันที (สูตรมาตรฐาน 2HRZE/4HR) และประเมินผลที่ 8 สัปดาห์หลังการรักษา

6. ในรายที่ลักษณะอาการทางคลินิกไม่จำเพาะ และไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคที่ 8 สัปดาห์หลังการรักษา จะได้รับการประเมินอีกครั้งด้วยการซักประวัติตรวจร่างกาย, เจาะปอด และตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจซ้ำ

7. รายที่ผลการตรวจเข้าได้กับโรคอื่นๆจะเข้ารับการรักษาตามโรคนั้นๆ

การเพาะเชื้อวัณโรคจากน้ำเจาะปอดและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด

การเพาะเชื้อทำที่ภาควิชาจุลชีววิทยาโดยผู้ตรวจไม่ทราบผลการตรวจอื่นและไม่ทราบลักษณะทางคลินิกของผู้ป่วยแต่ละราย

1. น้ำเจาะปอดจำนวน 10 ml และ 50 ml จะถูกนำไปปั่นที่ 5000 รอบต่อนาทีนาน 30 นาที แล้วแยกเฉพาะส่วนตะกอนมาทำ decontamination ด้วย 4% sodium hydroxide แล้วแยก inoculate ลงบน Ogawa media จำนวน 2 หลอดและ MGIT liquid media tube จำนวน 1 หลอด แล้วเก็บใน incubator อุณหภูมิ 37 ° C อ่านผลทุกสัปดาห์นาน 8 สัปดาห์ เมื่อพบ colony ต้องนำไป smear และย้อมสีตามวิธี Ziehl-Nielsen method

Tube liquid media MGIT เป็น tube ที่อาศัยหลักการการใช้ออกซิเจนของแบคทีเรีย โดยออกซิเจนที่ลดลงจะทำให้ fluorescent ที่ก้นหลอดเปลี่ยนสีวัดโดย calorimetric method หลังจากนั้นจะทำการ subculture ต่อไปรวมทั้ง identification เพื่อตรวจหาคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อวัณโรค โดยเฉลี่ยใช้เวลา ประมาณ 14 วันซึ่งน้อยกว่าการเพาะเชื้อวัณโรคทั่วไป

2. สำหรับชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ต้องนำมาบดด้วยครกบดใน 0.9% sodium chloride แล้ว decontaminate ด้วย 4% sodium hydroxide แล้วแยก inoculation เช่นเดียวกับน้ำเจาะปอด

3. การตรวจ Niacin test ตรวจโดยดูดสารน้ำในอาหารเพาะเชื้อประมาณ 0.5-1 ml ใส่ในหลอดทดลองแล้วใช้ TB niacin test reagent strip โดยสาร niacin ที่เกิดขึ้น จะทำปฏิกิริยากับสาร

potassium thiocyanate และ chloramine T ทำให้เกิดสีเหลืองขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อวัณโรค

การตรวจโดยวิธี Polymerase Chain Reaction เพื่อ detect target sequence IS6110 ใช้ primer 2 คู่

Primer 1	Pt 18 (5´-GAACCGTGAGGGCATCGAGG-3')
	INS 2 (5´-CGTAGGCGTCGGTGACAAA-3')
Primer 2	Pt 3 (5´-AACGGCTGATGACCAAACT-3')
	Pt 6 (5´-CGTAGGCGAACCCTGCCCA-3')

วิธีการทำ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ มีขั้นตอนย่อยดังนี้คือ

1.1 ทำการปั่น (centrifuge) ตัวอย่างจำนวนต่างๆตามที่กำหนด 1 ml 10 ml 50 ml และ 150 ml ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใส (supernatant) ทิ้ง

1.2 ปั่นล้างด้วยสาร Tris pH 8.3, 0.02 M 1.5 ml ถ้ามีเม็ดเลือดแดงปนให้ล้างด้วย TTE buffer 1-2 ครั้ง

1.3 เก็บตะกอน 200 µl ผ่าน QIA DNA minikit เหลือ sample 100 µl

1.4 Incubate ไว้ข้ามคืนที่ 60 º C

1.5 Inactivation ด้วยความร้อนที่ 100 º C นาน 15 นาที

1.6 เตรียม PCR mix ในอัตราส่วนดังนี้

	จำนวน (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10 x buffer	5	10 mM Tris pH 8.3
2. 25 mM MgCl2	6	3 mM MgCl2
3. 10 mM dNTP (A,C,G,U)	4	0.2 mM each NTPs
4. primer 1 (Pt 18, INS2)	2	
5. UNG (1U/µl)	0.16	
6. DDW	10.44	
7. Taq Polymerase (5 U/µl)	0.4	

8. Sample 5

9. water 5

10. mineral oil 50

2. เข้าสู่ PCR cycling ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนย่อยดังนี้คือ

2.1 File # 33 ที่ 37 º C นาน 10 นาที 1 รอบ

2.2 File # 7 ที่ 94 º C นาน 10 นาที 1 รอบ

2.3 File # 8 ผ่านขบวนการ

Denaturing ที่ 94 º C นาน 2 นาที

Annealing ที่ 65 º C นาน 2 นาที 50 รอบ

Extension ที่ 72 º C นาน 3 นาที

2.4 File # 9 ที่ 72 º C นาน 10 นาที 1 รอบ

2.5 File # 14 ที่ 72 º C ข้ามคืนแล้วให้ความร้อนที่ 95 º C นาน 10 นาที

ในแต่ละสิ่งส่งตรวจ (ผู้ป่วยแต่ละรายจะส่ง 4 อย่างคือ น้ำเจาะปอดในปริมาณต่างๆกัน 4 ขนาด)

ในการ amplification ครั้งแรกเริ่มที่ File # 33 สำหรับการตรวจซ้ำ nested PCR ใช้สารที่ได้จากการ amplification ครั้งที่ 1 จำนวน 5 µl เป็น sample ใหม่ โดยใช้ primer 2 (pt 3, pt 6) แทน และไม่ใช้ UNG โดยเริ่มที่ File # 7 งานวิจัยนี้ทำ nested PCR ทุกสิ่งส่งตรวจ

3. Gel Electrophoresis โดย load sample ดังนี้

1. Reaction control: amplified product จาก PCR mix + DNA 100 fg (5 µl)

2. Negative control: amplified product จาก PCR mix + DDW (5 µl)

3. Test sample 1: amplified product จาก PCR mix + PK treated sample (5 µl)

4. Test sample 2: amplified product จาก PCR mix + PK treated sample (5 µl)

5. Inhibitor Detection: amplified product จาก PCR mix + PK treated sample (5 µl) + DNA 100 fg (5 µl)

<u>การแปลผลการตรวจ</u> ดังแสดงในตารางคือ

หลอดที่

		1	2	3	4	5	การแปลผล
1st amp	1.1	--	--	--	--	--	Reaction mix failed Do new mix and repeat
	1.2	+	--	+/-	+/-	+	No inhibitor, do 2nd amp
	1.3	+	--	--	--	--	Inhibitor, clean and repeat
	1.4	+	+	+	+	+	False positive
2nd amp	2.1	+	--	+	+	+	Positive PCR
	2.2	+	--	--	--	+	Negative PCR
	2.3	+	--	--	+	+	Repeat tube 3,4 again
	2.4	+	--	--	--	--	Inconclusive

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลทั้งหมด ประวัติ การตรวจร่างกาย ผลเลือดต่างๆ ผลน้ำเจาะปอด ผลชิ้น เนื้อเยื่อหุ้มปอด จะได้รับการบันทึกลงในแบบเก็บข้อมูลดังภาคผนวกโดยผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวม

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)[61]

1. ผู้ป่วย 2 กลุ่ม คือ - กลุ่มที่เข้ากับเกณฑ์การวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด
- กลุ่มอื่นๆ

2. ใช้ตาราง 2 x 2 โดยใช้ gold standard ดังกล่าวข้างต้นเปรียบเทียบกับผล PCR จากตัวอย่างสารน้ำเจาะปอดขนาดต่างๆกัน

3. โดยใช้ค่าสถิติดังนี้คือ ความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), Positive predictive value, Negative predictive value, Accuracy

4. ค่าความเชื่อมั่น 95% ของ sensitivity และ specificity

คำนวณได้จาก Sensitivity (or Specificity) ±1.96xSEM

SEM = Standard error of the mean

= p (1-p)/n, p = sensitivity หรือ specificity

n = ขนาดตัวอย่าง

5. นำค่าที่คำนวณได้ของแต่ละจำนวนของน้ำเจาะปอดมาคำนวณว่าความแตกต่างของแต่ละคู่ เช่น 1 ml กับ 10 ml, 50 ml กับ150 ml เป็นต้น มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยใช้ Cochran'Q test

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

การวิจัยนี้ชอบด้วย จริยธรรม มนุษยธรรม และไม่เป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย เพราะเป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องเจาะปอดและตัดเยื่อหุ้มปอดตรวจอยู่แล้วเพื่อการวินิจฉัยและการรักษาที่ถูกต้องต่อไป

การเจาะปอดและตัดเยื่อหุ้มปอดนั้นแม้ว่าจะเป็นการตรวจที่มีโอกาสทำให้เกิดอันตรายได้ก็ตาม แต่โดยทั่วไปถือว่ามีความเสี่ยงต่ำและกระทำโดยแพทย์ที่มีความชำนาญ และการเจาะเลือดตรวจนั้นก็ใช้เลือดปริมาณไม่มาก ไม่มีอันตราย กระทำโดยพยาบาลผู้มีความชำนาญ

อย่างไรก็ตามผู้ป่วยจะได้รับคำอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการเจาะ วิธีการ ประโยชน์ที่จะได้รับ และอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นอยู่แล้ว โดยที่แพทย์จะทำการเจาะปอดและตัดชิ้นเนื้อต่อเมื่อได้รับความยินยอมจากผู้ป่วยแล้วเท่านั้น โดยมีการได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (Informed consent) นอกจากนี้จะมีการให้คำแนะนำการปฏิบัติตัว การติดตามผลโดยใกล้ชิด รวมถึงวิธีที่ผู้ป่วยสามารถติดต่อแพทย์ได้หากมีปัญหาหรือข้อสงสัยใดๆเกิดขึ้นหลังการเจาะปอดด้วย อนึ่งโครงการนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมแล้ว

กรณีที่การกรวดน้ำเจาะปอดและเยื่อหุ้มปอดในครั้งแรกไม่สามารถให้การวินิจฉัยได้นั้น เมื่อติดตามผู้ป่วยมารับการรักษาเพิ่มเติม ผู้ป่วยจะได้รับคำอธิบายถึงสาเหตุที่การเจาะครั้งแรกไม่ได้ผลในรายที่มีความจำเป็นต้องได้รับการเจาะปอดซ้ำนั้น ผู้ป่วยจะเป็นผู้ตัดสินใจว่าจะรับการเจาะซ้ำหรือไม่ โดยที่แพทย์จะบอกถึงข้อดีหรือข้อเสียของแต่ละวิธีที่ผู้ป่วยเลือก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
ผลการศึกษา

การคัดเลือกผู้ป่วยเข้ารับการรักษาและข้อมูลพื้นฐาน

ในช่วงเวลาที่ศึกษา ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2547 ถึงพฤศจิกายน 2548 นั้น มีผู้ป่วยที่เข้าตามวิธีดำเนินการวิจัย 58 ราย ไม่สามารถติดตามการรักษาได้ต่อเนื่อง 3 ราย เหลือผู้ป่วยเข้ารับการศึกษา 55 ราย แบ่งเป็นกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 29 ราย และ กลุ่มที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด 26 ราย

ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทั้งหมด 29 ราย คิดเป็น 52.73% ของผู้ป่วยทั้งหมด เข้าตามเกณฑ์วินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 25 ราย คิดเป็น 86.21% และเข้าเกณฑ์น่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 4 ราย คิดเป็น 3.79% โดยที่มีข้อมูลพื้นฐานดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

จำนวนผู้ป่วย	29 ราย
เป็นผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด	25 ราย (86.21%)
น่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด	4 ราย (13.79%)
เพศชาย: เพศหญิง	22 : 7 ราย (75.86: 24.14%)
อายุเฉลี่ย	40.62 ± 17.70 ปี
พิสัยของอายุ	15 – 80 ปี
โรคที่พบร่วมทางอายุรกรรม	6 (20.69%)
การติดเชื้อไวรัสเอชไอวี	1
โรค SLE	1
ฝีอะมีบิคในตับ	1
ตับแข็งจากไวรัสตับอักเสบบี	1
วัณโรคปอดรักษาครบ	1
ถุงน้ำในไต (ADPKD)	1

ผู้ป่วยกลุ่มสารน้ำที่มีสาเหตุมาจากโรคอื่นที่ไม่ใช่วัณโรค พบทั้งสิ้น 26 ราย คิดเป็น 47.27% ของผู้ป่วยทั้งหมด ในจำนวนนี้ประกอบด้วยสาเหตุจาก มะเร็งแพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด 15 ราย คิดเป็น 27.27% ของผู้ป่วยทั้งหมด และคิดเป็น 57.69% ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังแสดงข้อมูลพื้นฐานในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด

จำนวนผู้ป่วย	26 ราย
เพศชาย: เพศหญิง	10 : 16 ราย (38.46 : 61.54%)
อายุเฉลี่ย	61.58 ± 14.64 ปี
พิสัยของอายุ	36 – 101 ปี
เป็นสารน้ำที่มีสาเหตุมาจากมะเร็ง	15 (57.69%)
มะเร็งปอด	9 ราย
มะเร็งเต้านม	2 ราย
มะเร็งลำไส้ใหญ่	1 ราย
มะเร็งไม่ทราบต้นกำเนิด	3 ราย
สารน้ำที่มีสาเหตุอื่นๆ	11 ราย (40.31%)
ปอดอักเสบติดเชื้อ	4 ราย
โรคไตวายเรื้อรัง	5 ราย
ฝีอะมีบิคในตับ	1 ราย
ท่อน้ำดีอักเสบ	1 ราย

และดังแสดงในตารางที่ 2 จะพบว่า มีผู้ป่วยที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอดและมะเร็งกระจายมาที่เยื่อหุ้มปอด 11 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

ผู้ป่วย 4 ราย ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น ปอดอักเสบติดเชื้อ โดยทั้งหมดมีอาการก่อนมาโรงพยาบาล 3-4 วัน อาการไม่ชัดเจนจึงได้รับการเจาะน้ำและตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด โดยมีเซลล์ลิมโฟซัยม์เด่นในน้ำเจาะปอดแต่ไม่มาก (55-60%) ผู้ป่วยทั้งหมดกลับมาที่โรงพยาบาลหลังจากนั้น 1-2 วัน และได้รับการเจาะปอดซ้ำพบมีเซลล์ PMN เด่น และได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น parapneumonic

effusion ทุกรายได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ มี 2 รายได้รับการใส่ท่อระบาย (intercostal drainage tube) และทุกรายตอบสนองต่อการรักษาดี

ผู้ป่วย 5 ราย เป็นผู้ป่วยไตวายเรื้อรังอยู่เดิม แต่ยังไม่ได้รับการฟอกเลือด มีน้ำในโพรงปอดขึ้นมาใหม่ ได้รับการเจาะปอดเพื่อแยกโรคติดเชื้อโดยเฉพาะวัณโรค แต่จากผลทั้งหมดไม่เหมือนการติดเชื้อหรือมะเร็ง ผู้ป่วยได้รับการฟอกเลือด หลังจากนั้นน้ำในโพรงปอดลดลง

ผู้ป่วย 1 ราย เป็นผู้ป่วยฝีอะมีบิคในตับมาด้วยอาการปวดท้องและมีไข้ เอกซเรย์ปอดมีน้ำในโพรงปอดด้านขวา โดยที่มีอาการเจ็บหน้าอกเวลาหายใจเข้าเล็กน้อย หลังจากได้รับการรักษาด้วยยาอาการดีขึ้นน้ำในโพรงปอดลดลงจนหมดใน 2 สัปดาห์

ผู้ป่วย 1 ราย เป็นผู้ป่วยท่อน้ำดีอักเสบมาด้วยอาการปวดท้องและมีไข้ เอกซเรย์ปอดมีน้ำในโพรงปอดด้านขวา ไม่มีอาการทางระบบหายใจ หลังจากได้รับการรักษาด้วยยาไม่ได้ผ่าตัดอาการดีขึ้นน้ำในโพรงปอดลดลง

การเปรียบเทียบลักษณะข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เช่น เพศ อายุ ระยะเวลาที่ป่วย น้ำหนักที่ลดลง และคุณสมบัติของสารน้ำ ระหว่างกลุ่มที่เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดและไม่เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น แสดงด้วยตารางที่ 3 และแผนภูมิที่ 1-3 โดยมีรายละเอียดเกี่ยวกับ ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยที่ในกรณีที่เป็นข้อมูลต่อเนื่อง เช่นอายุ ระดับโปรตีนในเลือดและน้ำเจาะปอด รวมทั้งระดับ LDH และจำนวนเซลล์ เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

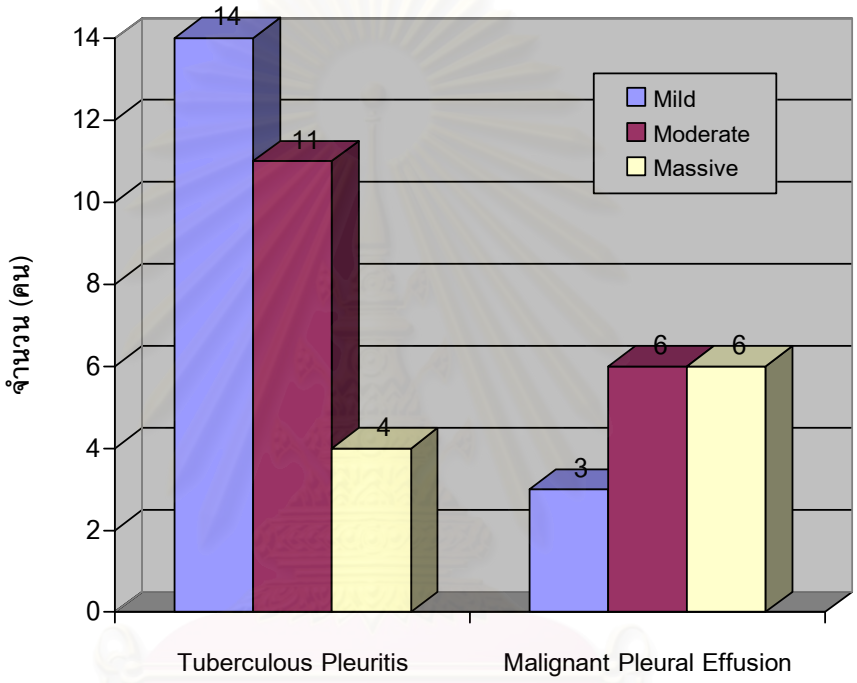
ตารางที่ 3 ลักษณะทางคลินิกและคุณสมบัติเบื้องต้นของสารน้ำเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด

ลักษณะ	ค่าเฉลี่ย (mean)	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)	พิสัย (range)	P-value*
อายุ (ปี)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	40.62	17.70	15-80	< 0.001
ไม่ใช่วัณโรค	61.58	14.64	36-101	
ระยะเวลาก่อนมารักษา (วัน)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	24.52	22.42	7-120	0.006
ไม่ใช่วัณโรค	47.27	34.15	5-120	
น้ำหนักลด (กก.)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	2.69	1.81	0-10	0.774
ไม่ใช่วัณโรค	2.88	2.98	0-10	
โปรตีนในน้ำเจาะปอด (g/dL)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	5.72	0.98	4.30-8.60	0.046
ไม่ใช่วัณโรค	5.07	1.33	3.50-7.80	
โปรตีนในเลือด (g/dL)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	7.78	0.81	6-9	0.172
ไม่ใช่วัณโรค	7.45	0.91	5.60-9	
LDH **ในน้ำเจาะปอด** (IU/L)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	869.48	416.20	260-1928	0.794
ไม่ใช่วัณโรค	833.78	588.83	167-2347	
LDH **ในเลือด** (IU/L)				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	384.14	118.01	252-718	0.196
ไม่ใช่วัณโรค	435.31	169.81	234-812	
จำนวนเม็ดเลือดขาว/μL				
วัณโรคเยื่อหุ้มปอด	1767.24	1415.37	200-7300	0.671
ไม่ใช่วัณโรค	1963.08	1907.81	300-7300	

* เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Independent samples T-Test

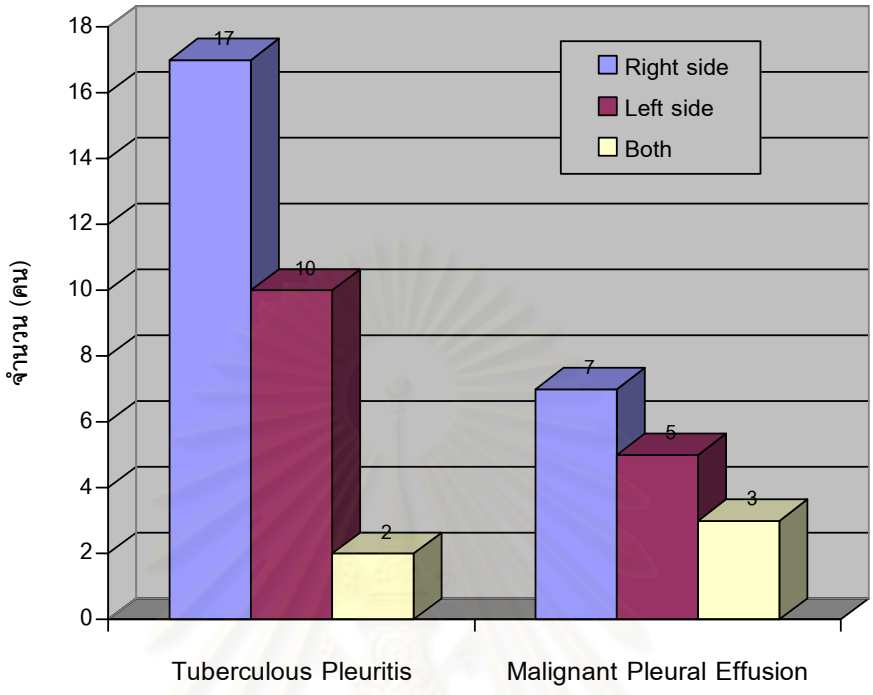
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นพบปริมาณสารน้ำในโพรงปอด ปริมาณน้อย 14 ราย (48.28%), ปริมาณปานกลาง 11 ราย (37.93%), และ ปริมาณมาก 4 ราย (13.79%) ส่วนในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งพบปริมาณสารน้ำในโพรงปอด ปริมาณน้อย 3 ราย (20%), ปริมาณปานกลาง 6 ราย(40%), และปริมาณมาก 6 ราย (40%) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 แสดงปริมาณสารน้ำในโรคต่างๆ

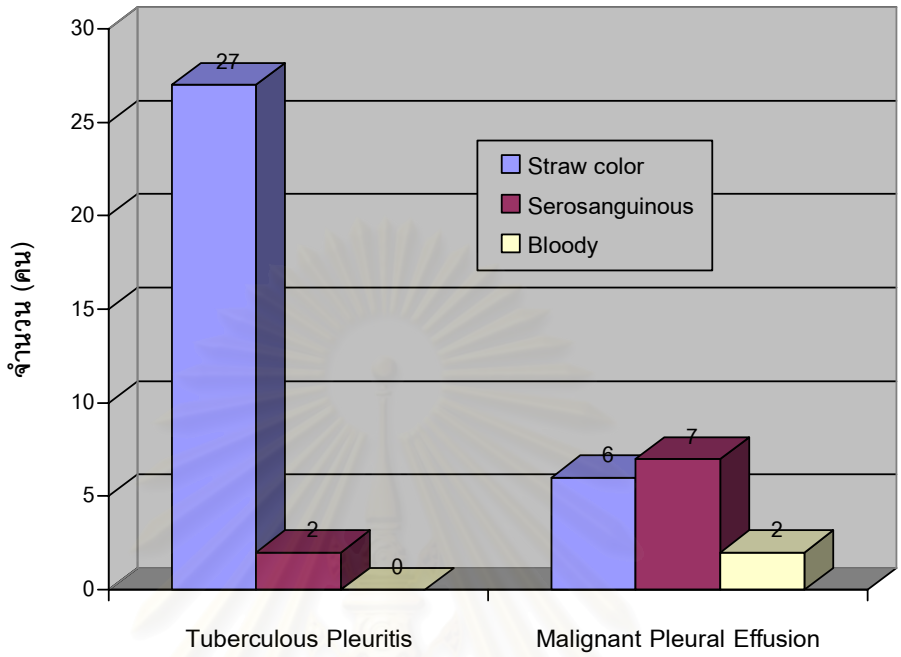
การวิเคราะห์การเกิดสารน้ำในโพรงปอด โดยพิจารณาว่าเป็นข้างเดียวหรือสองข้าง ซ้ายหรือขวานั้นพบว่า ในกลุ่มที่เป็นวัณโรคพบสารน้ำด้านขวา 17 ราย (58.62%), ด้านซ้าย 10 ราย (34.48%), และทั้งสองด้าน 2 ราย (6.90%) ส่วนในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งพบสารน้ำด้านขวา 7 ราย (46.67%), ด้านซ้าย 5 ราย (33.33%), และทั้งสองด้าน 3 ราย (20%) และที่น่าสังเกตว่า ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดก็สามารถพบน้ำ 2 ข้างได้ 6.9% แต่น้อยกว่าในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็ง ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2



แผนภูมิที่ 2 แสดงลักษณะข้างของปอดที่เกิดสารน้ำ

การวิเคราะห์สีของสารน้ำในโพรงปอดพบว่า ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดพบสารน้ำสีเหลือง (straw color) 27 ราย (93.10%), มีเพียง 2 ราย (6.9%) ที่มีสีน้ำล้างเนื้อ (serosanguinous) ส่วนในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งพบสารน้ำสีเหลือง 6 ราย (40%), สีน้ำล้างเนื้อ 7 ราย (46.67%) และสีเลือด (bloody) 2 ราย (13.33%) ดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 3 แสดงลักษณะสีของสารน้ำในโรคต่างๆ

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีมาตรฐานและการศึกษาการตรวจโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

มีค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) โอกาสที่จะเป็นโรคเมื่อการทดสอบให้ผลบวก (positive predictive value) โอกาสที่จะไม่เป็นโรคเมื่อการทดสอบให้ผลลบ (negative predictive value) ของแต่ละวิธีตรวจดังแสดงในตารางที่ 4 และ เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ความสามารถในการวินิจฉัย (diagnostic yield) วัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีต่างๆ

วิธีการตรวจวินิจฉัย % (95% CI)	ความไว (sensitivity)	ความจำเพาะ (specificity)	Positive predictive value	Negative predictive value
1. การย้อมสีทนกรดจาก น้ำเจาะปอด	0%	100%	N/A	47.27% (47.14-47.40)
2. การย้อมสีทนกรดจาก ชิ้นเนื้อ	20.69% (20.58-20.80)	100%	100%	53.06% (52.93-53.19)
3. การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอด				
น้ำเจาะปอด 10 ml	27.59%* (27.47-27.70)	100%	100%	55.31% (55.19-55.45)
น้ำเจาะปอด 50 ml	34.48%* (34.35-34.61)	100%	100%	57.78% (57.65-57.91)
4. การเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อ	41.38% (41.25-41.51)	100%	100%	60.47% (60.34-60.59)
5. การตรวจพบ granuloma	72.41% (72.30-72.53)	100%	100%	76.47% (76.36-76.58)
Caseous granuloma	31.03% (30.91-31.16)	100%	100%	56.52% (56.39-56.65)
Non-caseous granuloma	41.38% (41.25-41.51)	100%	100%	60.47% (60.34-60.59)
6. PCR จากน้ำเจาะปอด				
น้ำเจาะปอด 1 ml	20.69%** (20.58-20.80)	100%	100%	51.06% (52.93-53.19)
น้ำเจาะปอด 10 ml	27.59%** (27.47-27.70)	100%	100%	55.32% (55.19-55.45)
น้ำเจาะปอด 50 ml	41.38%** (41.25-41.51)	100%	100%	60.47% (60.34-60.59)
น้ำเจาะปอด 150 ml	20.69%** (20.58-20.80)	100%	100%	51.06% (52.93-53.19)
7. รวมวิธีที่ 4 และ 5	75.86% (75.75-75.98)	100%	100%	78.79% (78.68-78.90)
8 .รวมทุกวิธี	79.31% (79.20-79.42)	100%	100%	81.25% (81.15-81.35)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

* เปรียบเทียบ diagnostic yield ที่ได้จากการตรวจวิธีเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดจำนวนต่างๆกันว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.625) โดยวิธี Cochran's Q

** เปรียบเทียบ diagnostic yield ที่ได้จากการตรวจวิธี PCR จากน้ำเจาะปอดจำนวนต่างๆกันว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (p = 0.002) โดยวิธี Cochran's Q

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลของการวิจัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีต่างๆในการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น

วิธีการตรวจวินิจฉัย	ผลจากการศึกษานี้	ผลจากการศึกษาอื่น
1.การย้อมสีทนกรดจากน้ำเจาะปอด	0%	0 – 14.29% [3, 8-10, 13]
2. การย้อมสีทนกรดจากชิ้นเนื้อ	20.69%	0 – 22.22% [3, 7, 26, 28]
3. การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอด		
น้ำเจาะปอด 10 ml	27.59 %	11.11 – 52.4% [3, 7-11, 23-26, 28]
น้ำเจาะปอด 50 ml	31.48%	-
4. การเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อ	41.38%	31 – 76.2% [3, 7-11, 23-26, 28]
5. การตรวจพบ granuloma	72.41%	62.5 – 84% [7-11, 28]
Caseous granuloma	31.03%	19.23 – 78.8% [7-11, 28]
Non-caseous granuloma	41.38%	37.9 – 80.77% [6, 28]
6. PCR จากน้ำเจาะปอด		
น้ำเจาะปอด 1 ml	20.69%	19.44% [28]
น้ำเจาะปอด 10 ml	27.59%	20 – 81% [24-26, 28]
น้ำเจาะปอด 50 ml	41.38%	-
น้ำเจาะปอด 150 ml	20.69%	-
7. รวมวิธีที่ 4 และ 5	75.86%	77.78 – 95.2% [6-8, 28]
8. รวมทุกวิธี	79.31%	80 – 86% [3, 6-8, 28]

การตรวจโดยเทคนิค PCR จากน้ำเจาะปอด เปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยพิจารณาที่จำนวนน้ำเจาะปอดที่ใช้ ที่มีผลต่อความไวในการตรวจ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลตรวจด้วย PCR จากน้ำเจาะปอดในการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น

รายละเอียด	Lassence	Vallene V.	Querol JM.	กมลและคณะ	การศึกษานี้
ประชากรที่ศึกษา	TP and CP	All patients	All patients	Lymphocytic exudate	Lymphocytic exudate
Target sequence	65XD:IS6110	IS6110	IS6110	IS6110	IS6110
ปริมาณสารน้ำที่ส่งตรวจ PCR	10-20 ml	10 ml	10 ml	1 ml	1 ml, 10 ml, 50 ml, 150 ml
ขนาดตัวอย่าง*	14/24	33/131	21/107	36/59	29/55
ผลบวกจากการเพาะเชื้อ**	33.33%	48.48%	80.95%	44.44%	55.17%
ความไว	20%	42%	81%	19.44%	41.38%
ความจำเพาะ	100%	94%	100%	100%	100%

* รายงานเป็นผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดต่อจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด

** ผลบวกจากการเพาะเชื้อรวมทั้งจากน้ำเจาะปอดและชิ้นเนื้อ

การวิเคราะห์กลุ่มย่อย (Subgroup Analysis)

การวิเคราะห์ในกลุ่มย่อยเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ผลการตรวจโดยวิธี PCR กับผลการเพาะเชื้อ การวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดหรือน่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด สถานะการติดเชื้อ HIV และลักษณะทางพยาธิวิทยา ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจำแนกตามกลุ่มย่อย

กลุ่มผู้ป่วย (จำนวน)	ผลบวกจากการตรวจ PCR น้ำเจาะปอดแต่ละจำนวน			
	1 ml**	10 ml**	50 ml**	150 ml**
แบ่งตามเกณฑ์วินิจฉัย				
● วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (25)	6/25 (24%)	8/25 (32%)	12/25 (48%)	6/25 (24%)
● น่าจะเป็นวัณโรค (4)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)
*P-value**	0.553	0.552	0.121	0.553
แบ่งตามผลการเพาะเชื้อ				
● ผลบวกในน้ำเจาะปอดหรือเยื่อหุ้มปอด(16)	6/16 (37.5%)	7/16 (43.6%)	10/16 (62.5%)	6/16 (37.5%)
● ผลลบในน้ำเจาะปอดหรือเยื่อหุ้มปอด(13)	0/13 (0%)	1/13 (7.7%)	2/13 (15.4%)	0/13 (0%)
*P-value**	0.020	0.044	0.022	0.020
แบ่งตามการติดเชื้อเอชไอวี				
● Anti HIV positive (1)	1/1(100%)	1/1(100%)	1/1(100%)	1/1(100%)
● Anti HIV negative (28)	5/28(17.9%)	7/28(25%)	11/28(39.3%)	5/28(17.9%)
*P-value**	0.207	0.276	0.414	0.207
แบ่งตามผลทางพยาธิวิทยา				
● Granuloma (21)	5/21(23.8%)	7/21(33.3%)	11/21(52.4%)	5/21(23.8%)
● non-specific change (8)	1/8(12.5%)	1/8(12.5%)	1/8(12.5%)	1/8(12.5%)
*P-value**	0.647	0.381	0.093	0.647

* เทียบในกลุ่มน้ำเจาะปอดแต่ละจำนวนโดยวิธี Fisher's exact test

** เทียบในแต่ละกลุ่มที่แยกวิเคราะห์ ด้วยวิธี Cochran'Q (p = 0.002)

บทที่ 7
การอภิปรายผลการศึกษา

การคัดเลือกผู้ป่วยเข้ารับการศึกษาและข้อมูลพื้นฐาน

ประชากรที่ศึกษาคือ ผู้ป่วยผู้ใหญ่รายใหม่ที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น ซึ่งมักจะได้รับการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดอยู่แล้ว อย่างไรก็ตามการศึกษาเฉพาะกลุ่มที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่นนั้นย่อมทำให้พลาดการศึกษาผู้ป่วยวัณโรคในระยะแรกๆซึ่งอาจจะยังมีสารน้ำที่เซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นชนิด PMN เด่น ได้ และการศึกษานี้ไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้โดยตรงกับผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดดังกล่าวได้

ผู้ป่วยที่เข้ารับการศึกษาทั้งหมด 55 ราย เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทั้งสิ้น 29 ราย คิดเป็น 52.73% ของผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ได้ประมาณไว้ในการคำนวณขนาดตัวอย่าง และข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้านี้[1, 28]

ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด มีอายุเฉลี่ย 40.62 ± 17.70 ปี โดยที่อยู่ในช่วง 15 - 80 ปี โดยที่เป็นชายมากกว่าหญิง (75.86%: 24.14%) โดยมีแนวโน้มมากขึ้นกว่าการศึกษาที่ผ่านมา[1, 28] โดยที่อายุเฉลี่ยในกลุ่มที่เป็นวัณโรคน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ใช่วัณโรคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (40.62 ± 17.70 ปี และ 61.58 ± 14.64 ปี ตามลำดับ)

ผู้ป่วยที่สารน้ำมีสาเหตุจากมะเร็ง ทั้งหมด 15 ราย คิดเป็น 57.69% ของผู้ป่วยที่ไม่ใช่วัณโรค และคิดเป็น 27.27% ของผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอดแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น ซึ่งเกือบทั้งหมด (12 ราย) เป็นผู้ป่วยที่ทราบชนิดของมะเร็งที่แพร่กระจายมาที่เยื่อห้มปอด คือ มะเร็งปอด 9 ราย (60%), มะเร็งเต้านม 2 ราย (13.33%), มะเร็งลำไส้ใหญ่ 1 ราย (6.67%), และ เป็นผู้ป่วยที่ไม่ทราบชนิดของมะเร็งที่แพร่กระจายมาที่เยื่อหุ้มปอดอีก 3 ราย (20%) ซึ่งต่างจากรายงานจากต่างประเทศที่พบผู้ป่วยมะเร็งเต้านมในอัตรามากกว่านี้[19] การเจาะสารน้ำตรวจให้ผลบวกในครั้งแรก 10 ราย (66.67%) และเจาะซ้ำครั้งที่สองเพิ่มเป็น 12 ราย (80%) ซึ่งมากกว่าการตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด โดยที่การตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวก 6 ราย (40%) และเพิ่มการวินิจฉัยจากการตรวจสารน้ำอีก 3 ราย คิดเป็น 20% ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าความไวจากการตรวจสารน้ำจะมากกว่าการตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดจากการกระจายของเซลล์มะเร็งที่พบที่เยื่อหุ้มปอดด้านใน (visceral pleura) และกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ

ผู้ป่วยที่สารน้ำมีสาเหตุจากมะเร็ง มีอายุเฉลี่ย 57.1 ปี โดยที่อยู่ในช่วง 36 - 75 ปี โดยที่พบว่าเป็นเพศหญิงมากกว่าชาย 11:4 ราย คิดเป็น 73.33% : 26.67% ซึ่งคล้ายกับข้อมูลที่ผ่านมา [62]

ระยะเวลาที่มีอาการก่อนที่จะมาพบแพทย์นั้น ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีจำนวนวันเฉลี่ย 24.52±22.42 วัน ในจำนวนนี้มีผู้ป่วย 20 ราย (68.97%) มาพบแพทย์ภายใน 2 สัปดาห์ และ 3 ราย (10.34%) มาพบแพทย์ภายใน 1 สัปดาห์ ส่วนในกลุ่มที่สารน้ำไม่ได้มีสาเหตุจากวัณโรค โดยเฉพาะกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งมักมาช้ากว่า คือเฉลี่ย 51.87 ± 32.17 ปี ซึ่งต่างกับกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.006) แต่ในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งซึ่งมีอาการค่อยเป็นค่อยไป มักไม่สามารถบอกจุดเริ่มต้นของอาการได้แน่ชัด โดยที่มี 3 ราย (20%) ที่ไม่มีอาการอะไรแต่พบสารน้ำจากการติดตามภาพรังสีปอดขณะกำลังรักษาโรคมะเร็งอยู่ก่อน ดังนั้นการนำข้อมูลในข้อนี้ไปใช้ต้องพึงระวังอย่างยิ่ง

สำหรับน้ำหนักผู้ป่วยที่ลดลง พบว่าลดลงเฉลี่ย 2.69 ± 1.81 กิโลกรัม ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอด และ 2.88 ± 2.98 กิโลกรัม ในกลุ่มที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด โดยที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.774)

โรคที่พบร่วมในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น พบการติดเชื้อ HIV 1 ราย (3.45%), SLE 1 ราย (3.45%), ฝีอะมีบิคในตับ 1 ราย (3.45%), ตับแข็งจากไวรัสตับอักเสบบี 1 ราย (3.45%), วัณโรคปอดที่รักษาครบแล้ว 1 ราย (3.45%), ถุงน้ำในไต (ADPKD) 1 ราย (3.45%) และจากการที่พบผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV ร่วมด้วยน้อย ซึ่งจากที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าจะพบเชื้อในน้ำโพรงปอดมาก อาจจะมีผลต่อการตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่ต้องอาศัยจำนวนเชื้อที่มาก เช่น การย้อมสี ZN, การเพาะเชื้อ , PCR เป็นต้น

อาการเจ็บหน้าอกแปลบๆเวลาหายใจเข้า (pleuritic chest pain) ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นพบ 20 รายใน 29 ราย (68.97%) แต่ถ้าเฉพาะกลุ่มที่มาพบแพทย์ภายใน 2 สัปดาห์ พบถึง 17 รายใน 20 ราย (85%) และพบ 3 รายใน 3 ราย (100%) ของผู้ป่วยที่มาพบแพทย์ภาย 1 สัปดาห์ แต่ผู้ป่วยที่มีอาการมากกว่า 2 สัปดาห์ ไม่มีผู้ใดเลยที่มีอาการเจ็บหน้าอกแบบดังกล่าว เช่นเดียวกับผู้ป่วยกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็ง

สำหรับในกลุ่มที่ไม่ใช่วัณโรคเยื่อหุ้มปอด พบผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บหน้าอกแปลบๆเวลาหายใจเข้า (pleuritic chest pain) ทั้งหมด 5 ราย โดยเป็นผู้ป่วยที่เกิดจากปอดอักเสบติดเชื้อ 4 ราย, โรคไตวายเรื้อรัง 1 ราย สำหรับผู้ป่วยที่เกิดจากปอดอักเสบติดเชื้อนั้นปกติจะไม่ได้รับการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด แต่ผู้ป่วยทั้งหมดในการศึกษานี้มีอาการไม่ชัดเจน อาการค่อนข้างนาน (7 วัน 3 ราย, 4 วัน 1 ราย) น้ำโพรงเยื่อหุ้มปอดมีเซลล์ลิมโฟซัยเด่น อยู่ในช่วง 55 - 60% จึงได้รับการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด

ด้วย แต่ผู้ป่วยกลับมาด้วยมีหนองในปอดในอีก 2 - 3 วัน ซึ่งตอบสนองต่อการใสท่อระบาย (Intercostal drainage tube) และยาปฏิชีวนะทุกราย

การวิเคราะห์ปริมาณสารน้ำในโพรงปอด จากภาพรังสี พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นพบปริมาณสารน้ำในโพรงปอดปริมาณน้อยได้บ่อยที่สุด (ปริมาณน้อย 48.28%, ปริมาณปานกลาง 37.93%, ปริมาณมาก 13.79%) ในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งพบปริมาณปานกลางและปริมาณมากบ่อยที่สุด (ปริมาณน้อย 20%, ปริมาณปานกลาง 40%, ปริมาณมาก 40%) จะเห็นได้ว่ากลุ่มวัณโรคมีปริมาณน้ำค่อนข้างน้อย คือ มีผู้ป่วยที่มีปริมาณน้อยถึงปานกลางทั้งหมด 86.28% ส่วนกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งมีปริมาณน้ำปานกลางถึงมากรวมกันทั้งหมด 80% และเป็นที่น่าสนใจว่าหากพบปริมาณน้ำมากยังมีโอกาสเกิดจากวัณโรคได้ถึง 40% ของผู้ป่วยที่มีสารน้ำปริมาณมากซึ่งต่างจากรายงานจากต่างประเทศที่พบเพียง 4%[49] แต่ใกล้เคียงกับผลของการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทย [28]

การวิเคราะห์การเกิดสารน้ำในโพรงปอด โดยพิจารณาว่าเป็นข้างเดียวหรือสองข้าง ซ้ายหรือขวานั้นพบว่า ทั้งกลุ่มที่เป็นวัณโรคและกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็ง มีโอกาสพบสารน้ำทางด้านขวามากกว่าด้านซ้าย คือ ในกลุ่มที่เป็นวัณโรคพบสารน้ำด้านขวา 58.62%, ด้านซ้าย 34.48%, ทั้งสองด้าน 6.90% ส่วนในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งพบสารน้ำด้านขวา 46.67%, ด้านซ้าย 33.33%, ทั้งสองด้าน 20% และที่น่าสังเกตว่า ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดก็สามารถพบน้ำ 2 ข้างได้ 6.9% แต่น้อยกว่าในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็ง

การวิเคราะห์สีของสารน้ำในโพรงปอดพบว่า ในกลุ่มวัณโรคเยื่อหุ้มปอดพบสารน้ำสีเหลือง (straw color) เกือบทั้งหมด คือ 27 ราย (93.10%), มีเพียง 2 ราย (6.9%) ที่มีสีน้ำล้างเนื้อ (serosanguinous) ส่วนในกลุ่มที่มีสาเหตุจากมะเร็งก็ยังพบสารน้ำสีเหลืองค่อนข้างมากคือ 6 ราย (40%), สีน้ำล้างเนื้อ 7 ราย (46.67%) และสีเลือด (bloody) 2 ราย (13.33%) การที่พบสารน้ำจึงไม่สามารถโน้มเอียงว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้ แต่สารน้ำที่มีสีน้ำล้างเนื้อและสีเลือดมีโอกาสเป็นมะเร็งสูงซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบระดับโปรตีนในน้ำเจาะปอดในทั้ง 2 กลุ่มพบว่าในกลุ่มที่เป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมีระดับสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาและความรู้ที่ผ่านมาที่ทราบกันดีว่าสารน้ำของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดมักมีปริมาณโปรตีนสูง สำหรับระดับโปรตีนในเลือดนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่ป่วยหรือโรคร่วมอื่นๆที่พบในผู้ป่วยสูงอายุ กล่าวคือมีแนวโน้มว่าผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากมะเร็งจะมีระดับโปรตีนในเลือดน้อยกว่ากลุ่มที่มีสาเหตุจากวัณโรค แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับ LDH ในเลือดและน้ำเจาะปอดในทั้งสองกลุ่มไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีมาตรฐาน

การย้อมสีทนกรดด้วยวิธี Ziehl-Neelsen ของน้ำเจาะปอด ไม่มีตัวอย่างใดให้ผลบวกเลยซึ่งตรงกับข้อมูลเดิมและการศึกษาที่ผ่านมา[19, 28] แต่เนื่องจากในการศึกษานี้มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV เพียง 1 ราย ซึ่งไม่อาจสรุปได้ว่าไม่มีประโยชน์ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ที่ทราบกันดีว่ามีปริมาณเชื้อมากกว่า

การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดให้ผลบวก 8 ราย (27.59%) ในกรณีที่ใช้น้ำเจาะปอด 10 ml ในการส่งตรวจ, 10 ราย (34.48%) ในกรณีที่ใช้น้ำเจาะปอด 50 ml ในการส่งตรวจ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมา และมีแนวโน้มที่ผลบวกจะมากขึ้นถ้าใช้ปริมาณน้ำเจาะปอดมากขึ้นในการส่งตรวจ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวก 12 ราย (41.38%) ซึ่งมากกว่าการเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าดูจากผลบวกของการเพาะเชื้อของสารน้ำหรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด อย่างใดอย่างหนึ่ง พบว่ามีผลบวก 16 ราย คิดเป็น 55.17% แต่วิธีทั้งสองใช้เวลานานซึ่งมีผลต่อการตัดสินใจในการรักษาน้อย

ในการศึกษานี้การเพาะเชื้อทั้งจากน้ำเจาะปอดและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดพบผลบวกค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมาในต่างประเทศบางการศึกษา แต่ใกล้เคียงกับการศึกษาที่ศึกษาในประเทศไทย ซึ่งสาเหตุมาจากประชากรที่นำมาวิจัยนี้มีจำนวนเชื้อน้อยกว่า ซึ่งอาจมีผลต่อโอกาสในการตรวจโดยวิธีอื่นๆรวมทั้งวิธีที่นำมาวิจัยในครั้งนี้ คือ วิธี PCR

การตรวจทางพยาธิวิทยา พบลักษณะที่ค่อนข้างจำเพาะจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวก 21 รายใน 29 ราย คิดเป็น 72.41% โดยทุกรายได้รับการวินิจฉัยจากการเจาะปอดครั้งแรก ซึ่งมากกว่ารายงานก่อนหน้านี้เล็กน้อย คือ 69.44%[28] เมื่อรวมกับการเพาะเชื้อพบว่าได้ผลรวมเป็น 23 ราย คิดเป็น 79.31% ซึ่งน้อยกว่ารายงานก่อนหน้านี้ คือ 90% [7, 8, 19]

โดยที่ตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดที่ตรวจพบ granuloma 21 รายนั้นแบ่งเป็น caseous granuloma 9 ราย และ non-caseous granuloma 12 ราย โดยในผู้ป่วยที่พบ granuloma จะพบผลบวกของการย้อมสีทนกรดของชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด 6 ราย โดยคิดเป็น 20.69% ของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทั้งหมดและคิดเป็น 28.57% ของผู้ป่วยที่พบ granuloma โดยที่ผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่ไม่พบ granuloma ไม่มีผู้ใดเลยที่ย้อมสีทนกรดได้ผลบวก

การตรวจพบลักษณะทางพยาธิวิทยาแบบ granuloma นั้น แม้ว่าอาจพบได้ในความผิดปติอื่น เช่น การติดเชื้อราของเยื่อหุ้มปอด โรคเยื่อหุ้มปอดอักเสบรูมาตอยด์ โรค Sarcoidosis เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่า 95% ของ granuloma มีสาเหตุมาจากวัณโรค ซึ่งเมื่อร่วมกับลักษณะอื่นๆ เช่น การตอบสนองกับยาที่ใช้รักษาวัณโรค ลักษณะทางคลินิก และอุบัติการณ์ของโรคอื่นๆนั้นพบน้อยมาก

ในประเทศไทย จึงน่าเชื่อได้ว่าผู้ป่วยทุกรายที่ตรวจพบ granuloma มีสาเหตุจากวัณโรคจริง ซึ่งตรงกับผลในการศึกษานี้คือพบความจำเพาะของการตรวจพบ granuloma กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด เป็น 100%

สำหรับผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV ร่วมด้วยนั้น ในการศึกษานี้พบเพียง 1 ราย ซึ่งน้อยกว่าข้อมูลที่ผ่านมา โดยที่ผู้ป่วยดังกล่าว ตรวจพบเชื้อวัณโรค ทั้งจากการย้อมสีทนกรดของชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด, เสมหะ การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดทั้งสองจำนวนและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี PCR ของสารน้ำเจาะปอดทุกจำนวน และตรวจพบ non-caseous granuloma รวมทั้งการตอบสนองต่อยาต้านเชื้อวัณโรคเป็นอย่างดี ซึ่งข้อมูลคล้ายกับความรู้เดิม คือ ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะมีจำนวนเชื้อในน้ำเจาะปอดมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ HIV แต่เนื่องจากมีผู้ป่วยเพียงรายเดียวจึงยังไม่สามารถแทนผู้ป่วยทั้งกลุ่มได้ ต้องอาศัยการศึกษาต่อไป

การตรวจโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

การใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอด พบว่าได้ผลบวก 6 ราย (20.69%), 8 ราย (27.59%), 12 ราย (41.38%), และ 6 ราย (20.69%) สำหรับตัวอย่างสารน้ำเจาะปอดจำนวน 1 ml, 10 ml, 50 ml, และ 150 ml ตามลำดับ ซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.002) โดยจะพบว่าจำนวนสารน้ำ 50 ml ที่ใช้ในการส่งตรวจด้วยวิธี PCR จะให้ความไวมากที่สุด (41.38%) ขณะเดียวกันในกรณีที่ใช้น้ำส่งตรวจจำนวนมาก คือ 150 ml พบว่าเมื่อนำสารน้ำไปปั่นเพื่อเตรียมการตรวจด้วยวิธี PCR จะพบว่าส่วนตะกอนมีจำนวนมาก เหนียว มีก้อนเลือดตกตะกอน ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้ผลตรวจด้วยวิธี PCR ของสารน้ำจำนวนดังกล่าวให้ความไวน้อยกว่า (20.69%)

ในกลุ่มที่วินิจฉัยว่า “น่าจะเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด” ทั้งหมด 4 ราย ไม่พบว่ามีรายใดที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี PCR ของน้ำเจาะปอดทั้งสี่จำนวน แต่ต่างจากกลุ่มที่เป็น “วัณโรคเยื่อหุ้มปอด” อย่างไม่มีมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อแยกผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเป็นกลุ่มตามผลการเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดอย่างใดอย่างหนึ่ง ในกลุ่มที่ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกมีทั้งหมด 16 ราย พบว่าได้ผลบวกด้วยวิธี PCR ของน้ำเจาะปอด คิดเป็น 37.5%, 43.6%, 62.5%, และ 37.5% สำหรับตัวอย่างสารน้ำส่งตรวจ 1 ml, 10 ml, 50 ml, และ 150 ml ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่มที่การเพาะเชื้อเป็นลบ (0%, 7.7%, 15.4%, 0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่พบความแตกต่างของความไวของวิธี PCR ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.002) ตามจำนวนน้ำเจาะปอดที่เพิ่มขึ้น โดยที่จำนวนน้ำ 150 ml ก็พบว่าความไวลดลงดังกล่าวข้างต้น

สำหรับการแบ่งผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดตามการติดเชื้อ HIV หรือ การตรวจพบ granuloma ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของผลการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ในน้ำทั้งสี่จำนวน ในผู้ป่วยที่มีหรือไม่มีการติดเชื้อ HIV และ granuloma ตามลำดับ

การตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR สามารถเพิ่มผลบวกได้อีก 1 ราย ในผู้ป่วยที่พบ granuloma ทำให้เพิ่มความไวจาก 72.41% เป็น 75.86% เทียบเท่ากับผลตรวจรวมระหว่างการตรวจพบ granuloma และการเพาะเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด

ในการตรวจ PCR น้ำเจาะปอดในการศึกษานี้นั้น พบว่ามีความจำเพาะสูงมากคือ 100% แม้ว่าในทางทฤษฎีการตรวจหา IS6110 นั้นสามารถพบในเชื้อตัวอื่นด้วย เช่น *M.bovis* เป็นต้น แต่โอกาสที่จะเกิดโรคในมนุษย์และโรคของเยื่อหุ้มปอดมีน้อยมาก

สำหรับความไวจากการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ที่ดีที่สุดในการศึกษานี้ คือ 41.38% จากการส่งน้ำจำนวน 50 ml ดังกล่าวแล้ว ซึ่งพบว่ามากกว่าการศึกษาที่ผ่านมา คือ 10-20%[23, 25-28] ที่ใช้น้ำเจาะปอดจำนวน 1-10 ml ในการตรวจ PCR แต่มีการศึกษาของ Querol JM และคณะ[24] พบว่ามีความไวถึง 81% แม้จะใช้น้ำส่งตรวจเพียง 10 ml แต่เป็นที่น่าสังเกตุว่าผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดในการศึกษาดังกล่าวมีการตรวจพบผลบวกจากการเพาะเชื้อน้ำเจาะปอดหรือชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดถึง 80.95% มากกว่าที่พบในการศึกษานี้ คือ 55.17% ซึ่งอาจจะบ่งบอกถึงว่าประชากรที่นำมาศึกษาของการศึกษาดังกล่าวมีจำนวนเชื้อในน้ำเจาะปอดมากกว่า และอาจนำมาซึ่งผลการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ที่พบผลบวกมากกว่า

ปัญหาที่พบในการส่งน้ำเจาะปอดจำนวนมาก เช่น 150 ml จำเป็นต้องปั่นเก็บทันที หรือเติมสารกันแข็งตัว (ในการศึกษานี้ใช้สาร EDTA) มิเช่นนั้นจะเกิดการจับตัวเป็นก้อนของน้ำเจาะปอด ซึ่งอาจจะมีผลต่อผลการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ได้

เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อ พบว่า ความไวจากการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR มีแนวโน้มจะมากกว่าการเพาะเชื้อของน้ำเจาะปอดและเท่ากับการเพาะเชื้อของชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีข้อดีกว่าคือ การตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ใช้เวลาประมาณ 2-3 วันในการทราบผล ซึ่งน้อยกว่าการเพาะเชื้อมาก ทั้งยังมีความจำเพาะสูงเทียบเท่ากับการเพาะเชื้ออีกด้วย

การนำไปใช้ในทางปฏิบัติ

เมื่อพิจารณาการตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธีต่างๆที่กล่าวมา จะพบว่าการเพิ่มจำนวนน้ำเจาะปอดสามารถเพิ่มความไวในการส่งตรวจด้วยวิธี PCR ได้ จำนวนน้ำเจาะปอดที่

เหมาะสมที่สุด คือ 50 ml ซึ่งมีความไวในการตรวจ 41.38% และมีความจำเพาะสูง 100% อาจนำมาใช้แทนการเพาะเชื้อได้ดังกล่าวมาก่อนหน้านี้ เพราะผลการตรวจได้เร็วกว่า จึงช่วยในการตัดสินใจในการรักษาได้มากกว่าการเพาะเชื้อ

อย่างไรก็ตาม ความไวในการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ก็ยังน้อยกว่าการตรวจทางพยาธิวิทยาที่ได้ความไวในการตรวจ คือ 72.41% ซึ่งก็มีความจำเพาะสูง (100%) เช่นกัน ข้อเสียของการตรวจวิธีนี้คือจำเป็นต้องตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญในการตัดชิ้นเนื้อ แม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่พบผลข้างเคียงจากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดก็ตาม ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากผู้ที่ทำหัตถการเป็นผู้มีความชำนาญ ผลข้างเคียงจากการตัดชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดในเวชปฏิบัติทั่วไปอาจจะมากกว่าที่พบในการศึกษานี้ การตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นการตรวจมาตรฐาน มีแนวโน้มว่าถ้าร่วมกับการตรวจน้ำเจาะปอดด้วยวิธี PCR ความไวก็สามารถเพิ่มขึ้นได้ เป็น 75.86%

สำหรับปัญหาทางด้านราคา การตรวจ PCR ที่ให้บริการอยู่ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์นั้น เสียค่าใช้จ่ายประมาณ 1000 บาท การตรวจทางพยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ 350 บาท การเพาะเชื้อ 100 บาท

การพิจารณาเลือกผู้ป่วยตรวจ ควรทำในรายที่ไม่สามารถให้วินิจฉัยได้โดยวิธีตามปกติน่าจะเหมาะสมในภาวะเศรษฐกิจปัจจุบัน โดยทำการเก็บน้ำเจาะปอดจำนวน 50 ml ไว้ที่ -80 ºC หากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่ได้คำตอบจึงนำมาตรวจทาง PCR เพิ่มเติม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 8
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การตรวจวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยวิธี PCR ของน้ำเจาะปอดนั้น จำนวนน้ำที่เหมาะสมที่สุด คือ 50 ml โดยมี

ความไว (sensitivity) เท่ากับ 41.38% (95% CI = 41.25 – 41.51%)

ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 100%

โอกาสที่จะเป็นโรคเมื่อการทดสอบให้ผลบวก (positive predictive value) เท่ากับ 100%

โอกาสที่จะไม่เป็นโรคเมื่อการทดสอบให้ผลลบ (negative predictive value) เท่ากับ 60.47%

และค่าความถูกต้อง (Accuracy) เท่ากับ 69.10%

2. การใช้เทคนิค PCR ตรวจน้ำเจาะปอดจำนวน 50 ml สามารถให้การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้ดีกว่าการเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และให้การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดได้เท่ากับการเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด แต่ใช้เวลาน้อยกว่ามาก

3. การตรวจด้วยวิธีทางพยาธิวิทยายังคงเป็นวิธีที่ดี มีความไวและความจำเพาะสูง และการตรวจด้วยวิธี PCR ของน้ำเจาะปอดสามารถเพิ่มความไวในผู้ป่วยที่การตรวจทางพยาธิวิทยาที่ยังไม่ได้คำตอบได้บ้างเล็กน้อย

4. การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีมาตรฐานเพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดในปัจจุบัน ซึ่งใช้ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สามารถทำได้ไม่ต่างจากที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

ข้อบกพร่องของงานวิจัยนี้

1. การศึกษานี้บางส่วนได้เก็บสิ่งส่งตรวจไว้ก่อนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ - 80 ºC และทำการตรวจในภายหลัง แม้ว่าการเก็บที่อุณหภูมิดังกล่าวจะสามารถรักษาสภาพต่างๆได้ดี แต่บางข้อมูลเกี่ยวกับการตรวจด้วยวิธี PCR พบว่าการตรวจในทันทีได้ผลดีกว่า

2. ในการศึกษานี้ไม่ได้รวมผู้ป่วยที่มีประวัติเคยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอดในอดีตด้วย เนื่องจากมักมีการกล่าวเสมอว่าการตรวจพบ PCR ให้ผลบวก หมายถึงพบเชื้อวัณโรค แต่อาจเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ซึ่งอาจมีผลให้เกิดผลบวกลวง (false positive) ได้ โดยเฉพาะประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูง

3. การเก็บตัวอย่างน้ำเจาะปอดจำนวนมาก มีโอกาสเกิดการแข็งตัวของสารน้ำเจาะปอดมากขึ้น ทำให้จำเป็นต้องปั่นแยกโดยเร็ว หรือโดยการใช้สารกันการแข็งตัวในสารน้ำเจาะปอด

ข้อเสนอแนะ

1. ในผู้ป่วยที่มีสารน้ำแบบเอกซูเดทที่มีเซลล์ลิมโฟซัยท์เด่น และวิธีการมาตรฐานไม่ได้ผลการวินิจฉัย การตรวจน้ำเจาะปอดจำนวน 50 ml ด้วยวิธี PCR เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้ได้

2. ความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยนี้ ทำให้สามารถดูแลรักษาผู้ป่วยได้ดีขึ้น เช่น ไม่ส่งตรวจย้อมสีทนกรดในน้ำเจาะปอดและชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด เพราะความไวต่ำมาก และตระหนักถึงลักษณะของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่ต่างกับความรู้เดิม เช่น การพบสารน้ำปริมาณมากไม่สามารถตัดวัณโรคเยื่อหุ้มปอดทิ้งไปได้จากการวินิจฉัยแยกโรค ดังนั้นข้อมูลทางระบาดวิทยาจึงมีความสำคัญ

3. ในการวินิจฉัยต่อไป เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศกำลังพัฒนา การใช้วิธีตรวจที่ราคาถูกและมีผลตรวจค่อนข้างดีควรถูกนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาให้ดีขึ้น หรือศึกษาถึงความคุ้มทุนของการตรวจที่ใหม่ๆที่มีการนำมาใช้มากขึ้น

4. ในขณะที่วัณโรคเยื่อหุ้มปอดสามารถหายได้เอง หรือวินิจฉัยจากการตอบสนองต่อการรักษาได้ ทำให้ความสำคัญในการวินิจฉัยด้วยวิธีต่างๆลดลง ในขณะที่โรคมะเร็งก็บ่งบอกถึงระยะท้ายของโรค การวินิจฉัยได้เร็วอาจจะไม่ได้ช่วยมากนัก แต่การวินิจฉัยที่ถูกต้องก็สามารถลดการรักษาที่ผิด ลดความเสี่ยงของผู้ป่วยต่อการรักษาที่ไม่ถูกต้องได้ ลดโอกาสการกลับเป็นซ้ำของวัณโรคที่ปอดได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. รังสรรค์ ปุษปาคม, นันทา มาระเนตร์. การใช้เข็มตัดเยื่อหุ้มปอดและการทำ pleuroscopy ด้วย Flexible fiberoptic bronchoscope ในการวินิจฉัย pleural effusion. วารสารวัณโรคและโรคทรวงอก 1980; 1: 87-94.
2. Wongtim S, Silachamroon U, Ruxrungtham K, Udompanich V, Limthongkul S, Charoenlap P, et al. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. Thorax 1999; 54: 921-4.
3. Bueno CE, Clemente G, Castro BC, Martin LM, Ramos SR, Panizo AG, et al. Cytologic and bacteriologic analysis of fluid and pleural biopsy specimens with Cope's needle. Arch Intern Med 1990; 150: 1190-4.
4. Valdes L, Alvarez D, San Jose E, Penela P, Valle JM, Garcia-Pazos JM, et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. Arch Intern Med 1998; 158: 2017-21.
5. Heyderman RS, Makunike R, Muza T, Odwee M, Kadzirange G, Manyemba J, et al. Pleural tuberculosis in Harare, Zimbavwe: the relationship between human immunodeficiency virus, CD4 lymphocyte count, granuloma formation and disseminated disease. Trop Med Int Health 1998; 3: 14-20.
6. Berger HW, Mejia E. Tuberculous pleurisy. Chest 1973; 63: 88-92.
7. Scharer L, McClement JH. Isolation of tubercle bacilli from needle biopsy specimens of parietal pleural. Am Rev Respir Dis 1968; 97: 466-8
8. Levine H, Metzper W, Lacera D, Kay L. Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. Arch Intern Med 1970; 126: 269-71.
9. Marrtens G, Bateman E. Tuberculous pleural effusions: increased culture yield with bedside inoculation of pleural fluid and poor diagnosis value of adenosine deaminase. Thorax 1991; 46: 96-9.
10. Cheng AF, Li MSK, Chan CY, Chan CHS, Lyon D, Wise R, et al. Evaluation of three culture media and their combinations for isolation of Mycobacterium tuberculosis from pleural aspirates of patients with tuberculous pleurisy. J Trop Med Hyg 1994; 97: 249-53.

11. Morehead RS. Tuberculosis of the pleura. Southern Medical Journal 1998; 91: 630-6.

12. Roth BJ. Searching for Tuberculosis in the Pleural Space. Chest 1999; 116: 3-5.

13. Valdes L, San Jose E, Alvarez D, Sarandeses A, Pose A, Chomon B, et al. Diagnosis of of tubeculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon gamma. Chest 1993; 103: 458-65.

14. Goulart De Oliverira H, Rossatto E, Prollaj. Pleural fluid adenosine deaminase and lymphocyte proportion: clinical in the diagnosis of tuberculosis. *Cytopathology* 1994; 5: 27-32.

15. Villena V, Navaus-Gonzales JA, Garcia-Benayas C, Manzanos A, Echave J, Lopez-Encuentra A, et al. Rapid automated determination of adenosine deaminase and lysozyme for differentiating tuberculous and nontuberculous effusions. Clin Chem 1996; 42: 218-21.

16. Valdes L, Alvarez D, San Jose E, Juanatey JRG, Pose A, Valle JM, et al. Value of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pleural effusion in young patients in a region of high prevalence of tuberculosis. Thorax 1995; 50: 600-3.

17. Burgess LJ, Maritz FJ, Le Rouz I, Taljaard JJF. Use of adenosine deaminase as a diagnostic parameter in tuberculous pleurisy. Thorax 1995; 50: 672-4.

18. Aoki Y, Katoh O, Nakanishi Y, Kuroki S, Yamada H. IFN-gamma, ADA, and CA125 as the diagnostic parameter in tuberculous pleuritis. Resp Med 1994; 88: 139-43.

19. Light RW. Pleural disease. 4th edition. Baltimore: Willium & Wilkins 2001.

20. Valdes L, San Jose E, Alvarez D, Valle JM. Adenosine deaminase isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. Eur Respir J 1996; 9: 747-51.

21. Villena V, Lopez-Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martin-Escribano P, Ortuno-de-Solo B, Eztenos-Alfaro J. Interferon-gamma in 338 immunocompromised and immunocompetent patients for diagnosing pleural tuberculosis. Eur Respir J 1996; 9; 2635-9.

22. Soderblom T, Nyberg p, Teppo AM, Klockars M, Riska S, Pettersson T. Pleural fluid interferon gamma and tumor necrotic factor alpha in tuberculosis and rheumatoid pleurisy. Eur Respir J 1996; 9: 1652-5.

23. de Wit D, Maartens G, Steyn L. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. Tuber Lung Dis 1992; 73: 262-7.

24. Querol JM, Minguez J, Garcia-Sanchez E, Farga MA, Gimeno C, Garcia-de-Lomas J. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by polymerase chain reaction. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 1977-81.

25. Lassence A, Lecossier D, Pierre C, Cadranel J, Stern M, Hance AJ. Detection of mycobacterial DNA in pleural fluid form patients with tuberculous pleurisy by means of the polymerase chain reaction. Comparison of the two protocols. Thorax 1992; 47: 265-9.

26. Villena V, Rebollo MJ, aguado JM, Galan A, Lopez-Encuentra A, Palenque E. Polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis in immunocompromised and immunocompetent patients. Clin Infect Dis 1998; 26: 212-4.

27. Kolk AHJ, Schuitema ARJ, Kuijper S, van Leeuwen J, Hermans PWM, van Embden JDA, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. J Clin Microbiol 1992; 30: 2567-75.

28. กมล แก้วกิติณรงค์. การใช้เทคนิคพีซีอาร์ตรวจเยื่อหุ้มปอดเพื่อวินิจฉัยภาวะสานน้ำในโพรงปอดที่มีสาเหตุจากวัณโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.

29. Christine k, Timothy S. Sensitive and rapid detection of viable Giardia cyst and Cryptosporidium parvum oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. Appl and Environ Microb 1998; 64: 1743-9.

30. Nicole T. Vu, Arvind K. Chaturvedi, Dennis V. Canfield. Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PRC-base amplification: Effect of sample volume, storage temperature, preservatives, and aging on DNA extraction and typing. Forensic Sci Int 1999; 102: 23-34.

31. Goessens WHF, Kluytmans JAJW, den Toom N, van Rijsoort-vos TH, Niesters BGM, Stolz E, et al. Influence of volume of sample processed on detection of Chlamydia trachomatis in urogenital samples by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 251-3.

32. Sibley JC. A study of 200 cases of tuberculous pleurisy with effusion. Am Rev Tuberc 1950; 62: 314-23.

33. Fenton KN, Richardson JD. Diagnosis and management of malignant pleural effusion. Am J Surg 1995; 171: 69-74.

34. Richter C, Porenboom R, Swai AB, Kitinya J, Mtoni I, Chande H, et al. Diagnosis of tuberculosis in patients with pleural effusion in an era of HIV infection and limited diagnostic facilities. Trop Geogr Med 1994; 46: 293-7.

35. Light RW, MacGregor MI, Luchsinger PC, Ball WC. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. Ann Intern Med 1972; 77: 507-13.

36. Yam LT. Diagnostic significance of lymphocytes in pleural effusions. Ann Intern Med 1967; 66: 972-82.

37. Levine H, Szanto PB, Cugell DW. Tuberculous pleurisy: an acute illness. Arch Intern Med 1968; 122: 329-32.

38. Corbett. The Growing Burden of Tuberculosis Global Trends and Interaction With the HIV Eipidemic. Arch Intern 2003; 163: 1009 - 21.

39. World Health Organization. TB : Tuberculosis. Fact Sheet No 104 Revised August 2002.

40. Narain JP, Raviglionc MC, Kochi A. HIV-associated Tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. Tuber Lung Dis 1992; 73 (5): 311-21.

41. Allen JC, Apicella MA. Experimental pleural effusion as a manifestation of delayed hypersensitivity to tuberculin PPD. J Immunol 1968; 101: 481-7.

42. Apicella MA, Allen JC. A physiologic differentiation between delayed and immediate hypersensitivity. J Clin Invest 1969; 48: 250-9.

43. Leibowitz S, Kennedy L, Lessof MH. The tuberculin reaction in the pleural cavity and its suppression by antilymphocyte serum. Br J Exp Pathol 1973; 54: 152-62.

44. Antony VB, Sahn SA, Antony AC, Repine JE. Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural space in vitro. J Clin Invest 1985; 76: 1514-21.

45. Ferrer J. Pleural tuberculosis. Eur Respir J 1997; 10: 942-7.

46. Mehta JB, Dutt A, Harvill L, Mathews KM. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis. Chest 1991; 99: 1134-8.

47. Saks AM, Posner R. Tuberculosis in HIV positive patients in South Africa: A comparative radiological study with HIV negative patients. Clin Radiol 1992;

46: 387-90.48. Moudgil H, Sridhar G, Leitch AG. Reactivetion disease: the commonest form of tuberculous pleural effusion in Edinburgh, 1980-1991. Respir Med 1994; 88: 301-4.

49. Chan CH, Arnold M.tuberculosis, Chan CY, Mak TW, Hoheisel GB. Clinical and pathological features of tuberculous pleural effusion and its long term consequences. Respiration 1991; 58: 171-5.

50. Maher GG, Berger HW. Massive pleural effusion: malignant and non-malignant causes in 46 patients. Am Rev Respir Dis 1972; 105: 458-60.

51. Roper WH, Waring JJ. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. Am Rev Respir Dis 1955; 71: 616-34.

52. Ellner JJ. Pleural fluid and peripheral blood lymphocyte function in tuberculosis. Ann Inntern Med 1978; 89: 932-3.

53. Rossi GA, Balbi B, Manca F. Tuberculous pleural effusions: Evidence for selective presence of PPD-specific T-lymphocytes at site of inflammation in the early phase of the infection. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 575-9.

54. Yew WW, Chan CK, Kwan SY, Cheung SW, French GL. Diagnosis of tuberculous pleural effusion by detection of tuberculostearicin pleural aspirates. Chest 1991; 100: 1261-3.

55.Banchuin N, Pumprueg U, Pimolpan V. Anti PPD IgG responses in tuberculous pleurisy. J Med Assoc Thai 1987; 70: 321-5.

56. Barbas CSV, Cukier A, de Varvalho CRR, Barbas-Fiho JV, Light RW. The relationship between pleural fluid findings and the development of pleural thickening in patient with pleural tuberculosis. Chest 1991; 100: 1264-7.

57. Saiki RK, Gelfan DH, Stoffel S. Primer directed enzymatic amplification of DNA with the thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.

58. อังคณา ฉายประเสริฐ. วิธีการใหม่ในการวินิจฉัยวัณโรค. ใน บัญญัติ ปริชญานนท์ ชัยเวช นุช ประยูร สงคราม ทรัพย์เจริญ บรรณาธิการ. วัณโรค. พิมพ์ครั้งที่ 4 (ฉบับปรับปรุง). 195-221: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2542.

59. Brisson-Noel A, Gicquel B, Lecossier D, Levy-Frebault V, Nassif X, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; 334: 1069-71.

60. Tagaki N, Hasegawa Y, Ichiyama S, Shibagaki T, Shimokata K. Polymerase chain reaction of pleural biopsy specimens for rapid diagnosis of tuberculous pleuritis. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2: 338-41.

61. Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett D. Users' guides to the medical literature. III. How to use and article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients?. JAMA 1994; 271: 703-7.

62. Limthopngkul S, Chareonlap P, Nuchprayoon C, Na Songkhla Y. Pleural fluid pH, pCO2 and character in tuberculous and malignant effusions: a report of 250 cases. J Med Assoc Thai 1983; 66: 220-6.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูลผู้ป่วยที่มีสารน้ำในโพรงปอด

Pleural Effusion Form

Number_____ Date_____

1. Identification Information

   Name _____

   Sex _____ Age _____ HN. _____

   Address _____

   Tel. _____

2. Underlying Disease

   a. contact TB _____ for _____

   b. past history of TB or treatment _____

   c. smoking _____

   d. known cancer _____

   e. others _____

3. Presenting symptoms

   a. fever _____

   b. cough _____

   c. dyspnea _____

   d. chest pain _____ pleuritic/non-pleuritic

   e. weight loss _____ kgs. In _____ month

4. Physical Examination and Chest Radiographs

   a. correlation _____

   b. effected side _____ right _____ left _____ bilateral

   c. amount of fluid

      - minimal - nonmassive - more than 50%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

d. pattern

- typical - subpulmonic - loculated

e. pulmonary infiltration _____

f. others : lymphadenopathy _____ digital clubbing _____

5. Presumptive diagnosis _____

by _____

6. Indication for thoracentesis

- diagnosis number _____

- therapeutic number _____ interval _____ days

7. Pleural Fluid

a. appearance

- color _____

- foul-smelled _____

- specific gravity _____

b. cell count and differential count _____

8. Specific test

a. gram stain _____

b. culture/sensitivity _____

c. cytology _____

d. pleural biopsy _____

e. others (specify) _____

9. Conclusion

diagnosis _____

10. Plan of treatment _____

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม

ใบยินยอมรับการรักษาและเข้าร่วมโครงการวิจัย

หน่วยโรคปอด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ **วันที่** _____

ชื่อโครงการ การศึกษาความแตกต่างของจำนวนน้ำจากช่องโพรงปอดที่มีผลต่อการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

คำชี้แจงเกี่ยวกับโรคที่ศึกษาในการวิจัย

วัณโรคเป็นโรคที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญโดยเฉพาะในประเทศกำลังพัฒนา วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (Tuberculous Pleuritis) เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคนอกปอด และพบบ่อยในประเทศไทย โดยพบประมาณ 53-60% ของผู้ป่วยที่มาด้วยน้ำในโพรงปอดโดยไม่ทราบสาเหตุ

ปัญหาที่สำคัญในการวินิจฉัย เนื่องจากไม่มีอาการเฉพาะเจาะจง และเชื้อที่อยู่ในน้ำในโพรงปอดมีจำนวนน้อย ทำให้ความไวในการตรวจด้วยวิธีทางโรคติดเชื้อมีค่าต่ำ เช่น การย้อมสีทนกรดให้ผลบวกเพียง 0-5 % ยกเว้นในผู้ป่วยเอดส์จะมีโอกาสพบมากขึ้นเป็น 20 % การเพาะเชื้อจากน้ำเจาะปอดให้ผลบวก 25-50% การเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ผลบวก 32-76% เป็นต้น ดังนั้นปัจจุบันจึงอาศัยการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยดูการอักเสบเฉพาะแบบแกรนูโลมา (granulomatous inflammation) ซึ่งได้ผลบวกประมาณ 50-60% ในการตรวจครั้งแรก, 80% ในการตรวจซ้ำและได้ผลถึง 85-90%[7] เมื่อใช้ร่วมกับการเพาะเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเชื้อใช้เวลานาน ในผู้ป่วยบางรายจึงจำเป็นต้องให้การรักษาด้วยยาต้านวัณโรคไปก่อน แล้วติดตามผลการรักษา (therapeutic diagnosis) ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดผลข้างเคียงจากยาต้านวัณโรค และทำให้การวินิจฉัยโรคล่าช้าออกไปได้ จากปัญหาดังกล่าว ได้มีความพยายามพัฒนาการตรวจวินิจฉัยให้มีความไวมากขึ้น เช่น การเพาะเชื้อในขวดแบบพิเศษ (Bactec) หรือการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด การปั่นน้ำเจาะปอดปริมาณมากก่อนเพาะเชื้อ เป็นต้น ซึ่งมีความไวเพิ่มขึ้นไม่มากนัก

สำหรับวิธีการตรวจใหม่ที่นำมาใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้น จากการศึกษาที่ผ่านมา การวินิจฉัยโดยการใช้เทคนิค PCR ของน้ำเจาะปอดก็มีความไวแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา คือ 20-81% และจากการศึกษาของกมลและคณะ โดยใช้เทคนิค PCR ของเยื่อหุ้มปอด

ซึ่งมีความไวเพิ่มขึ้นเป็น 75% แต่มีข้อเสียคือต้องทำการตัดเยื่อหุ้มปอดซึ่งมีความเสี่ยงมากกว่าและผู้ทำจำเป็นต้องได้รับการฝึกฝน ดังที่กล่าวมาแล้วว่าความไวของเทคนิค PCR ในน้ำเจาะปอดมีความแตกต่างกันมาก ในแต่ละการศึกษาซึ่งสาเหตุหนึ่ง อาจเนื่องมาจากการใช้สารน้ำส่งตรวจในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ปริมาณน้ำที่มากขึ้นน่าจะมีความไวมากขึ้น แต่อาจจะยิ่งมีตัวกวน (confounding factors) มากขึ้นด้วยทำให้ความจำเพาะลดลงก็ได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อศึกษาปริมาณสารน้ำเจาะปอดที่เหมาะสมที่ใช้ในการส่งตรวจ PCR เพื่อวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

<u>คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน วิธีการ และผลข้างเคียงของการศึกษา</u>

<u>วิธีการศึกษา</u>

1. ซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจสอบยาที่รับประทานอยู่ และบันทึกข้อมูล
2. เจาะเลือดตรวจหาระดับโปรตีน, LDH
3. Anti HIV (ในรายที่มีข้อบ่งชี้หรือได้รับ การวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคปอดหรือนอกปอด)
4. เจาะน้ำในโพรงปอดและตัดเยื่อหุ้มปอด การเจาะสารน้ำในโพรงปอดออกนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อ นำสารน้ำในโพรงปอด เพื่อตรวจให้ได้การวินิจฉัยและการรักษาโรคที่ถูกต้อง โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ หลังจากจัดผู้ป่วยให้อยู่ในท่านั่งที่สบาย แล้วทายาฆ่าเชื้อแล้ว แพทย์ผู้เชี่ยวชาญจะฉีด ยาชาเข้าไปยังบริเวณที่จะทำการเจาะปอด หลังจากนั้น จะใช้เข็มดูดสารน้ำในโพรงปอดส่งตรวจประมาณ 400 mlเพื่อตรวจ

<u>น้ำเยื่อหุ้มปอด</u>

- ส่งตรวจโปรตีน, LDH ที่ห้องปฏิบัติการตึกเวชศาสตร์ชันสูตร (5 ml)
- ส่งตรวจเม็ดเลือดขาวและนับแยกชนิดที่ห้องปฏิบัติการหน่วยโรคปอดตึกจิรประวัติ (5 ml)
- ส่งตรวจเซลล์วิทยาที่หน่วยพยาธิวิทยา (10 ml)
- ปั่น (centrifuge) ที่ 5,000 รอบต่อนาที, 30 นาที นำ Pellet ไปย้อมสีทนกรดโดย Ziehl-Nielsen method และเพาะเชื้อวัณโรค (10 ml, 50 ml)
- ส่งตรวจทาง PCR ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา (1 ml, 10 ml, 50 ml, และ 150 ml) โดยเติมสาร EDTA 1 mg/ pleural fluid 50 ml เพื่อป้องกันการแข็งตัวของน้ำเยื่อหุ้มปอด

<u>ชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด</u>

- ส่งตรวจทางพยาธิวิทยาที่ตึกพยาธิวิทยา อย่างน้อย 2 ชิ้นใส่สารสะสายฟอร์มาลิน
- ส่งเพาะเชื้อวัณโรค 2 ชิ้นโดยใส่ใน 0.9% Sodium Chloride 5 ml

5. ให้การรักษาตามอาการ และถ้ามีลักษณะทางคลินิกเข้าได้กับวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จะได้รับการรักษาด้วยยาต้านวัณโรค โดยทันที (สูตรมาตรฐาน 2HRZE/4HR) และประเมินผลที่ 8 สัปดาห์หลังการรักษา

6. ในรายที่ลักษณะอาการทางคลินิกไม่จำเพาะ และไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านวัณโรคที่ 8 สัปดาห์หลังการรักษา จะได้รับการประเมินอีกครั้งด้วยการซักประวัติตรวจร่างกาย, เจาะปอด และตัดชิ้นเนื้อส่งตรวจซ้ำ

7. รายที่ผลการตรวจเข้าได้กับโรคอื่นๆจะเข้ารับการรักษาตามโรคนั้นๆ

<u>อาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น</u>

1. การเจาะสารน้ำในโพรงปอดออกนั้น เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการยอมรับทั่วไป ว่าสามารถใช้ในการวินิจฉัยภาวะสารน้ำในโพรงปอดที่ไม่ทราบสาเหตุได้ดี และมีผลข้างเคียงน้อยมาก เช่น เลือดออกในช่องปอด, ลมรั่วในช่องปอด เป็นต้น ซึ่งเกิดน้อยมาก และมักไม่รุนแรง

2.หลังจากการทำหัตถการดังกล่าว อาจมีอาการปวดบริเวณแผล, มีเลือดออกบริเวณแผลเล็กน้อยได้ และผู้ป่วยจะได้รับยาแก้ปวดและคำแนะนำในการดูแลแผล

<u>ประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับ</u>

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมจะได้รับการเจาะปอดโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคปอดและไม่เสียค่าใช้จ่ายในการตรวจพิเศษ ซึ่งผู้ป่วยทุกรายที่เข้ารับการเจาะปอดจะเป็นผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการเจาะปอดเพื่อการวินิจฉัยโรคอยู่แล้ว และผู้ป่วยจะได้รับการรักษาเฉพาะตามผลของการตรวจสารน้ำและอาการของผู้ป่วย โดยมีการติดตามการรักษาสม่ำเสมอ โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคปอดโดยเฉพาะตลอดช่วงการศึกษา

<u>คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร</u>

การเข้าร่วมการศึกษานี้เป็นไปโดยสมัครใจ โดยผู้ป่วยอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการศึกษาได้ทุกเมื่อ ข้อมูลทั้งหลายที่ได้รับจากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับ หากผู้ป่วยมีปัญหาหรือข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัย นพ.ณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-2564252 ต่อ 3 หรือ 01-8534825 ได้ทุกเมื่อ

ขออนุญาตทำการเจาะสารน้ำในโพรงปอดตรวจ

โดยมีข้อบ่งชี้คือ มีสารน้ำในโพรงปอดที่ยังไม่ทราบการวินิจฉัย

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ลงชื่อ_____(อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย)

(_____)

ชื่อผู้อนุญาต _____เกี่ยวข้องเป็น _____

(_____)

_____ พยาน

(_____)

_____(ผู้วิจัย)

(_____)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณัฐพงษ์ เจียมจริยธรรม เกิดเมื่อวันที่ 12 ตุลาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี แพทยศาสตร์บัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2540 จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อจากนั้นได้ปฏิบัติงานในฐานะแพทย์ใช้ทุนแผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลศูนย์สระบุรี จังหวัดสระบุรี เป็นเวลา 3 ปี ต่อมาได้เข้ารับการศึกษาต่อในตำแหน่งแพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2547 และสอบได้วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญทางวิชาชีพเวชกรรมสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป เมื่อปี พ.ศ. 2547 ปัจจุบันอยู่ระหว่างการฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาโรคระบบการหายใจและภาวะวิกฤติโรคระบบหายใจ ฝ่ายอายุรกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ประสบการณ์ด้านงานวิจัยทางคลินิก

1. **Jaimchariyatam N**, Pupaibool J, Krajiw S, Arunyingmongkol K, Kulwichit W. Diagnosis of Dengue Infection by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction and ELISA on Whole Blood Stored on Filter Papers. Oral Presentation at the 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 2005.
2. Pupaibool J, **Jaimchariyatam N** ,Krajiw S, Arunyingmongkol K, Prommalikit O, Sittichai R , Suandork P, Pancharoen C, Nisalak A, Thisyakorn U. Kulwichit W. Diagnosis of Dengue Infection by enzyme linked immunosorbent assay and from dried urine spots on Filter Papers . Poster Presentation at the 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 2005.
3. **Jaimchariyatam N**, Kawkitinarong K, Naweewitphadung K, Udomsantisuk N, Tumwasorn S, Kulwichit W. Diagnosis of Tuberculous Pleuritis by Nested Polymerase Chain Reaction: a comparison of four different volumes of pleural fluid . Poster Presentation at the 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. April 2006.