การศึกษาเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรค โดยการย้อมเสมหะด้วย วิธี Fluorescence และ Ziehl-Neelsen*

ชัยเวช นุชประยูร
บัญญัติ ปริชญานนท์

ผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีตรวจ smear ของเสมหะจากผู้ป่วย โดยการย้อมสีด้วยวิธีของ Ziehl-Neelsen และ fluorescence 1084 ราย ปรากฏว่าวิธี Ziehl-Neelsen ได้ผลบวกสูงกว่า เมื่อใช้ผลการเพาะเชื้อเป็นหลักตัดสิน แม้ว่าวิธี fluorescence จะมีประโยชน์ในด้านความสะดวกในการดูสไลด์ แต่วิธีการย้อมก็ไม่ได้ง่ายกว่า และยังต้องใช้กล้องจุลทัศน์ซึ่งมีราคาแพงด้วย จึงเห็นว่าการย้อม smear ของเสมหะด้วยวิธี Ziehl-Neelsen ยังคงเป็นวิธีซึ่งเหมาะสมที่สุดสำหรับประเทศไทยเพราะปฏิบัติได้สะดวก ได้ผลแม่นยำดี และประหยัด

ผู้ป่วยซึ่งมีอาการหรือพยาธิสภาพปรากฏในภาพรังสีทรวงอก ชวนให้สงสัยว่าเป็นวัณโรคปอดนั้น วิธีที่ง่ายทำได้ทันทีได้ผลรวดเร็ว และช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยโรคขั้นต้นได้ดีคือการย้อม smear ของเสมหะตรวจหาเชื้อวัณโรค วิธีตรวจนี้นอกจากช่วยสนับสนุนการวินิจฉัยวัณโรคขั้นต้นแล้ว ยังมีความสำคัญในด้านควบคุมโรคด้วย ทั้งนี้เพราะการพบเชื้อในเสมหะบ่งถึงภาวะของโรคที่อยู่ในระยะแพร่เชื้อ ควรจะให้การบำบัดแก่ผู้ป่วยทันทีและควบคุมการแพร่เชื้ออย่างใกล้ชิด ด้วยเหตุนี้วิธีตรวจเชื้อใน smear ของเสมหะ ซึ่งง่ายและแม่นยำจึงจำเป็นมากในการรักษาและควบคุมโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีอัตราการเป็นโรคนี้สูงและมีงบประมาณในการให้การรักษาและควบคุมจำกัด

การย้อมตรวจเชื้อวัณโรคด้วยวิธี Ziehl-Neelsen[4] นั้น เป็นที่รู้จักกันมานานว่าง่ายและได้ผลดี ส่วนการย้อมด้วยวิธี fluorescence รายงานครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1938[3] และยังไม่นิยมกันในระยะแรก เริ่มจะแพร่หลายขึ้นหลังจากที่ Truant และคณะ[13] ได้รายงานรายละเอียด ของวิธีการและเปรียบเทียบให้เห็นว่าวิธีนี้ง่ายและแม่นยำดีกว่าวิธี Ziehl-Neelsen นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นที่สนับสนุนอีกมาก[1, 6, 7, 10, 15] แต่ก็มีรายงานที่เสนอว่าผลจากวิธีทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกัน โดยเฉพาะเมื่อใช้ผลการเพาะเชื้อเป็นหลักเปรียบเทียบความแม่นยำ[14]

จุดประสงค์ของการศึกษานี้ คือเพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคจาก smear ของเสมหะซึ่งย้อมด้วยวิธี fluorescence และ Ziehl-

* รายงานนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนวิจัย "ประยงค์ วัชราภัย" เป็นผลงานร่วมกันระหว่างสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย และแผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย และได้เสนอในที่ประชุม Third Asia–Pacific Congress on Disease of the Chest

Neelsen โดยอาศัยผลการเพาะเชื้อเป็นหลักพิจารณาตัดสิน ปฏิบัติงานโดยความร่วมมือระหว่างห้องปฏิบัติการของสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ซึ่งย้อม smear ของเสมหะให้ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคระบบการหายใจ แผนกอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัยเป็นผู้ตรวจดูเชื้อใน smear ของเสมหะที่ย้อมแล้ว

วัสดุและวิธีการ

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการตรวจเสมหะประจำวันของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา สมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ระหว่างวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2515 ถึงวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2515 จำนวนทั้งสิ้น 1084 ราย

Smear ของเสมหะผู้ป่วยแต่ละราย เตรียมโดยพนักงานวิทยาศาสตร์ผู้เดียว โดยละเลงเสมหะซึ่งไม่ได้ทำให้ข้นลงบนแผ่นสไลด์ fix ด้วยความร้อน สไลด์ 1 แผ่นย้อมด้วย 5% carbol-fuchsin 5 นาที โดยใช้ความร้อนช่วย ล้างด้วย acid alcohol แล้วย้อมทับด้วย methylene blue ตามวิธีของ Ziehl-Neelsen[4] และสไลด์อีก 1 แผ่นย้อมด้วย 0.3% aramine-O ใน glycerine — phenol mixture 15 นาที ล้างด้วย acid alcohol 2 นาที และย้อมทับด้วย 0.5% potassium permanganate solution 3 นาทีทิ้งไว้ให้แห้ง วิธีนี้คือวิธีย้อม fluorescence[9]

เสมหะที่เหลือนำไปเพาะเชื้อใน Ogawa media โดยวิธี swab-culture[16] เชื้อที่ขึ้นตรวจสอบยืนยันว่าเชื้อวัณโรค โดยอาศัยการดูลักษณะโคโลนี อัตราการเจริญของโคโลนี และปฏิกิริยาทางชีวเคมีต่าง ๆ[11] การตรวจเสมหะซึ่งย้อมแล้วปฏิบัติโดยพนักงานคนเดียว

ผล

เสมหะที่ตรวจทั้งหมด 1084 ราย มีเพียง 982 ราย ที่สามารถนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบได้อีก 102 ราย การเพาะเชื้อมีเชื้อโรคชนิดอื่นปนมาด้วย จึงตัดออกไม่นำมารวมในการพิจารณา จากจำนวน 982 รายนี้ มี 182 ราย ซึ่งการตรวจเสมหะพบเชื้อวัณโรคโดยวิธีย้อมสีทั้ง 2 วิธี ด้วยวิธี Ziehl-Neelsen ตรวจพบ 161 ราย (ร้อยละ 16) และด้วยวิธี Fluoresence พบ 147 ราย (ร้อยละ 15)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจเสมหะโดยวิธีย้อมสี 982 ราย

		รวม
ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค	800 ราย	800 ราย
ตรวจพบเชื้อวัณโรค ก. ทั้งสองวิธี	126 ราย	
ข. เฉพาะวิธี Ziehl-Neelsen	35 ราย	
ค. เฉพาะวิธี Fluorescence	21 ราย	182 ราย
รวม		982 ราย

ผลเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อใน smear ระหว่างวิธีย้อมทั้ง 2 วิธี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ $(p > 0.05)$

เสมหะ 982 รายนี้ เพาะเชื้อวัณโรคขึ้น 239 ราย เมื่อพิจารณาผลจากการย้อมสีเฉพาะในรายที่เพาะเชื้อขึ้น ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตรวจด้วยวิธีย้อมสีเสมหะซึ่งเพาะเชื้อวัณโรคขึ้น 239 ราย

		รวม
ตรวจไม่พบเชื้อวัณโรค	87 ราย	87 ราย
ตรวจพบเชื้อวัณโรค ก. ทั้งสองวิธี	126 ราย	
ข. เฉพาะวิธี Ziehl-Neelsen	19 ราย	
ค. เฉพาะวิธี Fluorescence	7 ราย	152 ราย
รวม		239 ราย

ผลเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคระหว่าง วิธีย้อมทั้ง 2 วิธี มีนัยแตกต่างที่สำคัญทางสถิติ $(p < 0.03)$ เมื่อใช้ผลการเพาะเชื้อเป็นหลัก

การเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อวัณโรคใน smear ทั้งหมด ทั้งวิธีย้อมสี 2 วิธี และการเพาะเชื้อ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อวัณโรคโดยวิธีย้อมสี 2 วิธีและการเพาะเชื้อ

การเพาะเชื้อ	วิธี Fluorescence		วิธี Ziehl-Neelsen	
	ผลบวก	ผลลบ	ผลบวก	ผลลบ
เชื้อขึ้น 239 ราย	133 ราย (55.6)	106 ราย (44.4)	145 ราย (60.8)	94 ราย (39.2)
เชื้อไม่ขึ้น 743 ราย	14 ราย (1.8)	729 ราย (98.2)	16 ราย (2.2)	727 ราย (97.8)

( ) = ร้อยละ

วิจารณ์

จากรายงานต่าง ๆ เกี่ยวกับวิธีการย้อมสี fluorescence พบว่า วิธีการย้อมยังไม่มีกำหนดเป็นมาตรฐานที่แน่นอน มีรายงานเป็นจำนวนมาก[6,7,10,14,15] ที่เสนอการดัดแปลงวิธีย้อมและส่วนประกอบของน้ำยาใช้ย้อมต่างไปจากวิธีเดิม

ของ Hageman[3] เพื่อจุดประสงค์ที่จะเพิ่มความไวในการตรวจพบเชื้อ ประสบการณ์จากการศึกษาครั้งนี้ พอจะสรุปได้ว่า วิธีย้อมเพื่อดูด้วย fluorescence นั้นง่ายพอ ๆ กับวิธีของ Ziehl-Neelsen แต่การตรวจดูสไลด์ใช้เวลาน้อยกว่า เพราะใช้หัวกล้องจุลทัศน์กำลังขยายต่ำก็สามารถเห็นเชื้อวัณโรคได้ชัดเจน และ contrast ดีกว่า จึงช่วยลดความเครียดของสายตาลงได้มาก ข้อสังเกตนี้ตรงกันกับที่มีรายงานไว้แล้ว[1,3,6,7,12,14,15]

ผลเปรียบเทียบการพบเชื้อวัณโรคระหว่างวิธี fluorescence และวิธี Ziehl-Neelsen โดยอาศัยผลการเพาะเชื้อนั้น ไม่พบความแตกต่างกัน กล่าวคือ จากการตรวจ smear ทั้งหมด 982 ราย พบเชื้อวัณโรคโดยวิธี flourescence ร้อยละ 15 และพบโดยวิธี Ziehl-Neelsen ร้อยละ 16 ซึ่งตรงกับผลสรุปของ Weiser[14] แต่เมื่อใช้ผลการเพาะเชื้อเป็นหลักตัดสินความแม่นยำกลับพบว่าวิธี Ziehl-Neelsen ดีกว่าวิธี fluorescence และสามารถพิสูจน์ยืนยันได้ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ ($P<0.03$) (ตารางที่ 2 และ 3) มีรายงานหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าวิธี fluorescence สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคได้ดีกว่าวิธี Ziehl-Neelsen แต่บางรายงานไม่ได้ใช้การเพาะเชื้อเป็นหลักในการตัดสิน คงอาศัยแต่เฉพาะผลเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อใน smear ระหว่างวิธีย้อมสีทั้ง 2 วิธีเท่านั้นและบางรายงาน[13] ก็เสนออัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคโดยวิธี fluorescence สูงมาก (ร้อยละ 16) ในกลุ่มที่เพาะเชื้อจากเสมหะไม่ขึ้น

แม้ว่าการตรวจพบเชื้อวัณโรคใน smear ของเสมหะ ที่เพาะเชื้อไม่ขึ้นจะเป็นปรากฏการณ์ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยซึ่งกำลังได้รับการรักษาอยู่ แต่ก็พบในอัตราต่ำคือประมาณร้อยละ 5 เท่านั้น[13] การตรวจพบเชื้อด้วยวิธี fluorescence ในอัตราที่สูงมากดังกล่าวมาแล้ว จึงชวนให้สงสัยว่าวิธีนี้จะมีความไวในการตรวจเชื้อวัณโรคที่สูงเกินกว่าความเป็นจริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันยังยอมรับกันว่าการเพาะเชื้อเป็นวิธีตรวจสอบความแม่นยำของการตรวจ smear ของเสมหะซึ่งดีที่สุด

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการย้อม smear ของเสมหะด้วยวิธี Ziehl-Neelsen ยังคงเป็นวิธีซึ่งเหมาะสมที่สุดสำหรับประเทศไทย เพราะเป็นวิธีที่ง่าย แม่นยำ และไม่ต้องการเครื่องมือราคาแพงอย่างวิธี fluorescence ความชำนาญของผู้ตรวจนั้นเป็นกุญแจสำคัญที่จะช่วยเพิ่มความแม่นยำของการตรวจให้ดีขึ้น

ผู้รายงานขอขอบคุณ นายวัฒนา หงสประภัสร์ ที่ช่วยตรวจเสมหะทางห้องปฏิบัติการ

1. Freiman DG, Mokotoff GF: Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. A comparative evaluation of the fluorescence and Ziehl-Neelsen methods in the routine examination of smear for acid-fast bacilli. As Rev Tuberc 48:435-42, 43

2. Gilkerson SW, Kanner O : Improved technique for the detection of acid-fast bacilli by fluorescence. J Bacteriol 86:890-1, 63

3. Hagemann PKH : Floureszenzfarbung von tuberkelbakterien mit auramine. Munch Med Wochenschr 85:1066-8, 38

4. Handbook of tuberculosis laboratory methods. Veteran administration, Department of medicine & surgery. Washington 1962

5. Hiller C : Fluorostaining of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 95:1068-9, 67

6. Joseph SW, Houk VN : Evaluation and application of the fluorochrome stain for microsocpic detection of mycobacteria in clinical specimens. Am Rev Respir Dis 98:1044-7, 68

7. Koch ML, Cote RA : Comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections. Am Rev Respir Dis 91:283-4, 65

8. Larios Moreno LA, Resano Perez F : Fluorescent methods in the routine detection of acid fast bacilli. Rev Lat Am Microbiol 11:21-4, 69

9. Mycobacteriolory Laboratory Methods, report No. 318, U.S. Army Medical Research & Nutrition Laboratory. Fitzsimons General Hospital, 1968

10. Samlo AM, Black T : The value of fluorescence microscopy in the detection ot AFB Trans. 27th Pulmonary Disease Research Conference, 1968, p. 85

11. Sommers HM, Russel JP : The clinically significant mycobacteria : Recognition and identification 2nd edition. American Society of Clinical Pathologist, 1967

12. Truant JP, Brett WA, Thomas W Jr : Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. Henry Ford Hosp Med Bull 10:287-96, 62

13. Warring FC Jr, Sutramongkole U : Nonculturable acid-fast forms in the sputum of patients with tuberculosis and chronic pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 102:714-24, 70

14. Weiser OL, Sproat EF, Hakes JD, et al : Fluorochrome staining of mycobacteria. Am J Clin Pathol 46:587-8, 66

15. Wilson MM : Fluorescence microscopy in examination of smears for mycobacterium tuberculosis. Am Rev Tuberc 65:709-17, 25

16. ประยูร ไชยกาล : การเปรียบเทียบผลของการเพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะโดยวิธี concentration และวิธี swab. จุลชีววิทยาสาร 5:13, 61