วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2558

Journal of Health Science
Vol. 24 No. 2, March - April 2015

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การพัฒนาการตรวจเพาะเชื้อวัณโรคของห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น

นัตฏิยา ศรีสุราช วท.บ. (เทคนิคการแพทย์), วท.ม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์)
ศศิประภา วัฒนวิเศษ วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
ณัฏฐานิช สุวรรณศิริกุล วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)
กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น

บทคัดย่อ วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อประเมินการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Lowenstein-Jensen medium - LJ medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (*Mycobacterium* growth indicator tube - MGIT) มาใช้ในการเพาะเชื้อวัณโรคร่วมกับการทดสอบการดื้อต่อยาของเชื้อวัณโรค โดยใช้วิธี MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ในการเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อ (positive rate) และลดระยะเวลาในการรายงานผลเพาะเชื้อวัณโรค ระยะเวลาดำเนินการตั้งแต่เดือนมีนาคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2554 โดยเพาะเชื้อในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มารับการรักษา และส่งเพาะเชื้อวัณโรค จำนวน 2,572 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และทดสอบการดื้อต่อยาด้วยวิธี MTT เปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อ และระยะเวลาในการตรวจพบเชื้อ (detection time)ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด การทดสอบการดื้อต่อยาได้เปรียบเทียบผลการทดสอบต่อยาแนวที่ 1 (first line drug) โดยใช้วิธี MTT เทียบกับวิธี สัดส่วนเปรียบเทียบ หรือ proportion method ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ผลการดำเนินงานพบว่าการเพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว สามารถเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อ จากร้อยละ 4.3 เป็นร้อยละ 19.5 การศึกษาตัวอย่างตรวจที่พบเชื้อมัยโคแบคทีเรียจำนวน 151 ตัวอย่าง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวใช้เวลาในการตรวจพบเชื้อเฉลี่ย 16 วัน (พิสัย 3 - 38 วัน) อัตราการตรวจพบเชื้อคิดเป็นร้อยละ 98.7 (149/151) ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใช้เวลาเฉลี่ย 37 วัน (พิสัย 10 - 63 วัน) และอัตราการตรวจพบเชื้อเพียงร้อยละ 21.9 (33/151) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาแนวที่ 1 โดย วิธี MTT และวิธี สัดส่วนเปรียบเทียบ พบว่าการทดสอบความไวต่อ rifampicin, isoniazid, ethambutal และ streptomycin โดยวิธี MTT ให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างจากวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบคิดเป็นร้อยละ 96.9 (63/65), 95.4 (62/65), 93.8 (61/65) และ 98.5 (64/65) ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันของทั้งสองวิธีคิดเป็นร้อยละ 12.3 (8/65) โดยร้อยละ 66.7 (4/6) พบเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (Multidrug-resistant tuberculosis หรือ MDR-TB) ขณะที่วัณโรคไม่ดื้อยา (Non-MDR-TB) ให้ผลไม่สอดคล้องเพียงร้อยละ 6.8 (4/59) ดังนั้น การนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในการเพาะเชื้อวัณโรค จะช่วยเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรค และลดระยะเวลาการตรวจพบเชื้ออย่างชัดเจน และเมื่อนำวิธี MTT มาใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคร่วมด้วย ทำให้สามารถลดระยะเวลารายงานผลเพาะเชื้อจากเดิม 7 เดือน (121 - 301 วัน) เป็น 1.4 เดือน (20 - 79 วัน)

คำสำคัญ: **วัณโรค, การพัฒนาการตรวจเพาะเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อ**

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญเป็นสาเหตุการป่วย การเสียชีวิต และการแพร่ระบาดในประชากรทุกภูมิภาคทั่วโลก[1,2] สำหรับสถานการณ์วัณโรคในประเทศไทย องค์การอนามัยโลกจัดประเทศไทยอยู่ในกลุ่ม 22 ประเทศ ที่มีปัญหาวัณโรคสูงมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 และคาดประมาณว่าประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ประมาณ 86,000 รายต่อปี หรือคิดเป็นอัตราอุบัติการณ์ 124 ต่อประชากรแสนคน สูงกว่าประเทศตะวันตกบางประเทศถึง 30 เท่า[3] นอกจากนั้นการพบอุบัติการณ์ของผู้ป่วยเอดส์ที่สูง ทำให้จำนวนผู้ป่วยวัณโรคในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 10 ปี[4] จากรายงานอุบัติการณ์การเกิดวัณโรคดื้อยา (multi-drug-resistant tuberculosis หรือ MDR-TB) ที่เพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการเข้าถึงการตรวจวินิจฉัยการดื้อยาวัณโรคทางห้องปฏิบัติการของผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานยังต่ำ[3,5] ทำให้วัณโรคยังคงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทย การควบคุมวัณโรคให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องได้รับความร่วมมือจากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง มีความต่อเนื่องและสม่ำเสมอในด้านคุณภาพการรักษา ความสามารถของห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์ถือว่ามีความสำคัญ เพราะนอกจากจะเป็นการยืนยันการวินิจฉัยวัณโรค การวางแผนการรักษาอย่างเหมาะสมแล้ว ยังช่วยในการติดตามการรักษาผู้ป่วยวัณโรค ซึ่งจะป้องกันและลดการแพร่กระจายเชื้อ นอกจากนี้ ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านระบาดวิทยา ซึ่งเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์ของเชื้อวัณโรค

การตรวจเพาะเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการประกอบด้วย การเพาะเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อวัณโรคที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งมาทดสอบชนิดของเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค การตรวจเพาะเชื้อวัณโรคในโรงพยาบาลขอนแก่นในอดีตเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Lowenstein-Jensen medium - LJ medium) เพียงชนิดเดียว พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากต้องใช้เวลานานในการตรวจพบเชื้อ (1 - 2 เดือน) อัตราการตรวจพบเชื้อค่อนข้างต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 5.0) เสียงสะท้อนจากคณะกรรมการดูแลผู้ป่วยวัณโรค รวมถึงแพทย์ผู้ใช้บริการในโรงพยาบาลขอนแก่นประเมินว่า ผลการตรวจจากห้องปฏิบัติการยังไม่เป็นที่น่าพอใจเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการตรวจพบเชื้อกับอาการทางคลินิก สำหรับการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค เดิมโรงพยาบาลยังไม่ได้เปิดให้บริการ แต่ได้มีการส่งต่อภายนอก (ห้องปฏิบัติการอ้างอิงวัณโรคแห่งชาติ สำนักวัณโรค) ซึ่งกว่าจะได้ผลการทดสอบใช้เวลานานถึง 2 - 3 เดือน และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลย้อนหลังพบว่า ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลขอนแก่นใช้ระยะเวลาในการรายงานผลเพาะเชื้อวัณโรค (Turn-around time - TAT) นานกว่า 7 เดือน (พิสัย 121 - 301 วัน) ทำให้การวางแผนการรักษาของแพทย์ต้องอาศัยเฉพาะข้อมูลด้านคลินิก โดยยังไม่มีผลการตรวจยืนยันจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัยวัณโรค[6]

การเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว (Mycobacterium growth indicator tube - MGIT) ด้วยเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติ (MGIT 960 System) เป็นอีกทางเลือกที่องค์การอนามัยโลกแนะนำในการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการเพาะเชื้อวัณโรค มีหลายรายงานพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวนี้จะให้ผลการเพาะเชื้อที่เร็วขึ้น (9 - 16 วัน) และเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง[7-10] โดยอาศัยการตรวจวัดออกซิเจนที่ลดลงเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยในการที่จะได้รับการรักษาที่รวดเร็วและถูกต้อง

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรค ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการทดสอบที่ให้ผลรวดเร็ว เช่น การทดสอบโดยวิธี MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) และการทดสอบโดยเครื่องอัตโนมัติ ได้แก่ BACTEC 460 TB, MGIT 960[11-14] การทดสอบโดยวิธี MTT เป็นวิธี

ที่ใช้ในการทดสอบการดื้อต่อยาโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และเติมสารส่งเสริมการเจริญเติบโต จากนั้นตรวจวัดเชื้อวัณโรคที่มีชีวิตโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของสาร 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ด้วยตาเปล่า วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการทดสอบโดยเครื่องอัตโนมัติ เช่น BACTEC 460 TB, MGIT 960 นอกจากนั้นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี MTT ยังใช้เวลาในการทดสอบน้อย เฉลี่ยเพียง 1 สัปดาห์[12] เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานเดิมที่องค์การอนามัยโลกแนะนำคือ วิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ (proportion method) ซึ่งใช้การสังเกตดูโคโลนีที่ 4 สัปดาห์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่ไม่มียาและที่มียาความเข้มข้นต่าง ๆ[15,16]

จากการศึกษารายงานวิจัยและบทความทางวิชาการ คณะผู้วิจัยได้ปรับระบบการทำงานร่วมกับทีมดำเนินการรักษา และคณะกรรมการดูแลผู้ป่วยวัณโรค โรงพยาบาลขอนแก่น ในการพัฒนาการตรวจเพาะเชื้อวัณโรค โดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในการเพาะเชื้อวัณโรค และตรวจหาวัณโรคดื้อยาด้วยวิธี MTT โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาใช้ในการเพาะเชื้อวัณโรค ร่วมกับการทดสอบความไวต่อยาแนวที่ 1 (drug susceptibility testing for first line drug) โดยใช้วิธี MTT ในการเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรค (positive rate) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 5.0 และลดระยะเวลารายงานผลเพาะเชื้อวัณโรคไม่เกิน 2 เดือน

วิธีการศึกษา

1. ตัวอย่างตรวจ

ตัวอย่างตรวจได้จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาและส่งตรวจเพาะเชื้อวัณโรคที่ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่างเดือนมีนาคม 2552 ถึงธันวาคม 2554 จำนวน 2,572 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างตรวจจากระบบทางเดินหายใจ 1,331 ตัวอย่าง ชิ้นเนื้อ แผล ฝีหนอง 417 ตัวอย่าง น้ำจากส่วนต่าง ๆของร่างกาย 316 ตัวอย่าง น้ำไขสันหลัง 308 ตัวอย่าง ต่อมน้ำเหลือง 148 ตัวอย่าง ไขกระดูก 161 ตัวอย่าง และอื่น ๆ (เช่น ปัสสาวะ อุจจาระ กระดูก) 91 ตัวอย่าง

2. วิธีดำเนินงาน

2.1 การเพาะเชื้อวัณโรคในตัวอย่างตรวจผู้ป่วย[17] ตามวิธีมาตรฐาน[18] โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว[17] โดยตัวอย่างที่มีเชื้อปนเปื้อน (เสมหะ สารคัดหลั่งจากหลอดลม ปัสสาวะ อุจจาระ) ต้องกำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยการเติมสารละลายด่าง (NALC – NaOH) ปริมาณเท่ากับตัวอย่างตรวจ (3-5 มล.) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที (ส่วนตัวอย่างตรวจที่ไม่มีเชื้อปนเปื้อน เช่น น้ำไขสันหลัง น้ำจากช่องปอด น้ำจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกายไม่ต้องกำจัดเชื้อปนเปื้อน) เมื่อครบเวลา เติมสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ จนได้ปริมาตร 45 มล. ปั่นด้วย ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสในน้ำยาฆ่าเชื้อ เติมสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ 1 – 2 มล. ในหลอดพลาสติก แล้วเขย่าผสมกับตะกอนส่วนที่เหลือในก้นเบา ๆ ใช้ปิเปตต์ปราศจากเชื้อดูดตะกอนเพาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 2 ขวด (2 – 3 หยด) (เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 1 หลอด (เข้าเครื่องอัตโนมัติ) จากนั้นตรวจดูการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ถ้าพบว่ามีเชื้อขึ้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปวินิจฉัยชนิดของเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาแนวที่ 1 กรณีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้ผลบวก ใช้ปิเปตต์ดูดตะกอนส่วนล่าง เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 2 ขวด 2 – 3 หยด อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไป ได้แก่ Blood agar, MacConkey agar, Chocolate agar อย่างละจาน และเสมียร์บน slide 2 แผ่น สำหรับย้อมสีแกรม และ AFB จากนั้นวินิจฉัยชนิดของเชื้อวัณโรค และรายงานผลการตรวจพบเชื้อเบื้องต้น

2.2 การทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคด้วยวิธี

MTT[16] (ระหว่าง ตุลาคม 2553 – ธันวาคม พ.ศ. 2554) และสุ่มเชื้อวัณโรค 65 สายพันธุ์ ส่งทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงวัณโรค-แห่งชาติ สำนักวัณโรค โดยวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ

การทดสอบการดื้อยาของเชื้อวัณโรค โดยวิธี MTT โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากตัวอย่างผู้ป่วย อายุ 3 – 4 สัปดาห์ ลงใน M7H9 broth (Middlebrook 7H9) และปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่าหลอดสารละลายมาตรฐาน 1 Mcfarland (จำนวนเชื้อ 10^7 CFU/ml) เติมเชื้อลงในหลอดทดลองที่มียา (rifampicin, isoniazid, ethambutal และ streptomycin) และไม่มียา (หลอดควบคุม) หลอดละ 100 µl อบ ที่ 35–37 ^{0}C 7 – 10 วัน เติม MTT 10 µl ปิดฝา ผสมโดยคว่ำหลอดทดลอง กลับไปมา อบ ที่ 35–37 ^{0}C 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.1 N HCl in isopropanol 1 มล. ผสมโดยคว่ำหลอดทดลองกลับไปมา ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี ถ้าเป็นสีใสหรือสีเหลือง หมายถึงเชื้อไวต่อยาที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ แต่ถ้าเป็นสีม่วง เชื้อดื้อต่อยาที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ

3. การรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติเชิงพรรณนา (ร้อยละ)

3.1 เก็บข้อมูล และเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อมัยโคแบคทีเรีย และระยะเวลาในการรายงานผลเพาะเชื้อวัณโรค เปรียบเทียบก่อนและหลังการนำอาหาร-เลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาใช้ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในการเพาะเชื้อวัณโรค ร่วมกับการทดสอบความไวต่อยาแนวที่ 1 โดยใช้วิธี MTT (มกราคม 2551 – ธันวาคม 2554) จำนวน 2,572 ตัวอย่าง

3.2 เก็บข้อมูล และเปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อและระยะเวลาการตรวจพบเชื้อ ระหว่างอาหาร-เลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด โดยศึกษาจากตัวอย่างตรวจที่พบเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ระยะเวลาระหว่างเดือนมีนาคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2552) จำนวน 151 ตัวอย่าง

3.3 เก็บข้อมูลและเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี MTT และวิธีสัดส่วน-เปรียบเทียบ ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2554 จำนวน 65 สายพันธุ์

ผลการศึกษา

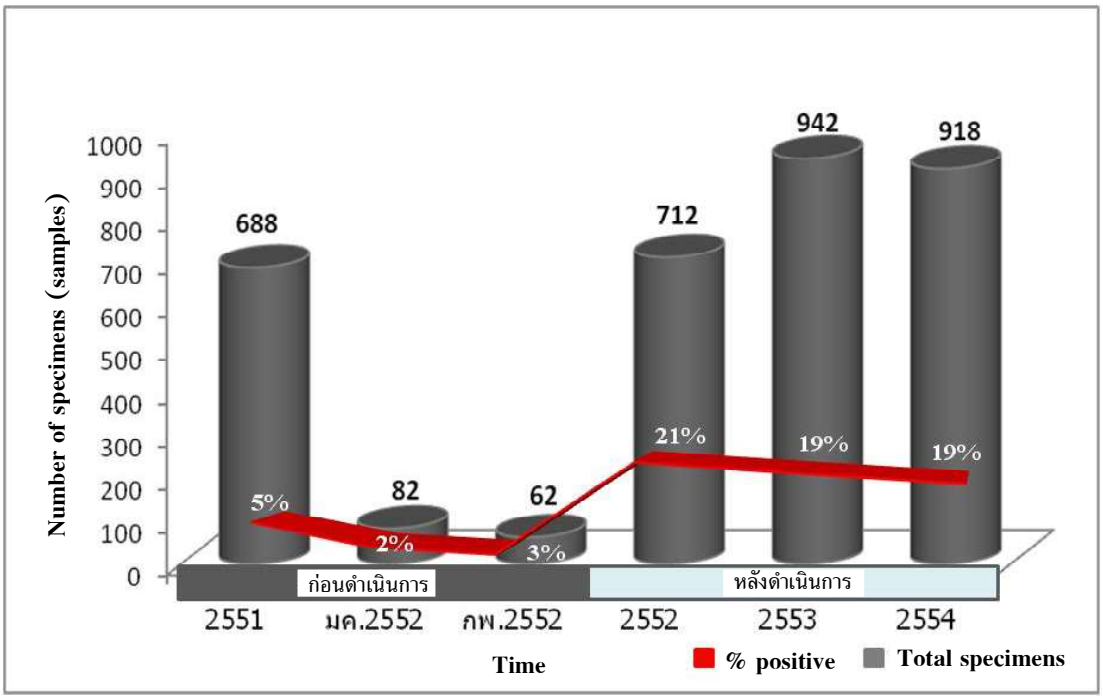
การเพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในตัวอย่างตรวจผู้ป่วยที่สงสัยวัณโรค และส่งเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่างเดือนมีนาคม 2552 ถึงเดือนธันวาคม 2554 จำนวน 2,572 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อ จากเดิมซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพียงชนิดเดียว คิดเป็นร้อยละ 4.3 เป็นร้อยละ 19.5 (ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในการเพาะเชื้อวัณโรค) (ภาพที่ 1)

การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการรายงานผลเพาะเชื้อวัณโรค (turnaround time) ในตัวอย่างตรวจชนิดต่าง ๆ โดยปรับกระบวนการทางห้องปฏิบัติการด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาใช้ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งในการทดสอบหาเชื้อวัณโรคร่วมกับการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคแนวที่ 1 โดยใช้วิธี MTT พบว่า สามารถลดระยะเวลารายงานผลเพาะเชื้อจากเดิม 7 เดือน (213 วัน; พิสัย 121 – 307 วัน) (เพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเพียงชนิดเดียว และส่งทดสอบการดื้อยาที่สำนักวัณโรค) เป็น 4.8 เดือน (145 วัน; พิสัย 80 – 212 วัน) (เพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และส่งทดสอบการดื้อยาที่สำนักวัณโรค) และ 1.4 เดือน (41 วัน; พิสัย 20 – 79 วัน) (เพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และทดสอบการดื้อยาโดยวิธี MTT) ในช่วงเดือนมกราคม 2551 – กุมภาพันธ์ 2552, มีนาคม 2552 – กันยายน 2553 และตุลาคม 2553 – ธันวาคม 2554 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

เมื่อศึกษาตัวอย่างตรวจ ที่พบเชื้อมัยโคแบคทีเรีย ระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนธันวาคม 2552 จำนวน 151 ตัวอย่าง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวใช้เวลา

ในการตรวจพบเชื้อ เฉลี่ย 16 วัน (พิสัย 3 – 38 วัน) และสามารถตรวจพบเชื้อมากที่สุด ในสัปดาห์ 2 (8 – 14 วัน) หลังการทดสอบ ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใช้เวลาเฉลี่ย 37 วัน (พิสัย 10 – 63 วัน) และตรวจพบเชื้อมากที่สุดในสัปดาห์ที่ 4 (32 – 38 วัน) (ภาพที่ 2) อัตราการตรวจพบเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง คิดเป็นร้อยละ 98.7 (149/151) และร้อยละ 21.9 (33/151) ตามลำดับ เมื่อแยก

ภาพที่ 1 อัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรค ก่อนและหลังการนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาเพาะเชื้อวัณโรคในตัวอย่างตรวจผู้ป่วย โรงพยาบาลขอนแก่น ระหว่าง พ.ศ. 2551-2554



ตารางที่ 1 เปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการรายงานผลเพาะเชื้อวัณโรค (TAT) ระหว่างก่อนดำเนินการพัฒนา และหลังดำเนินการพัฒนา (พ.ศ. 2551-2554)

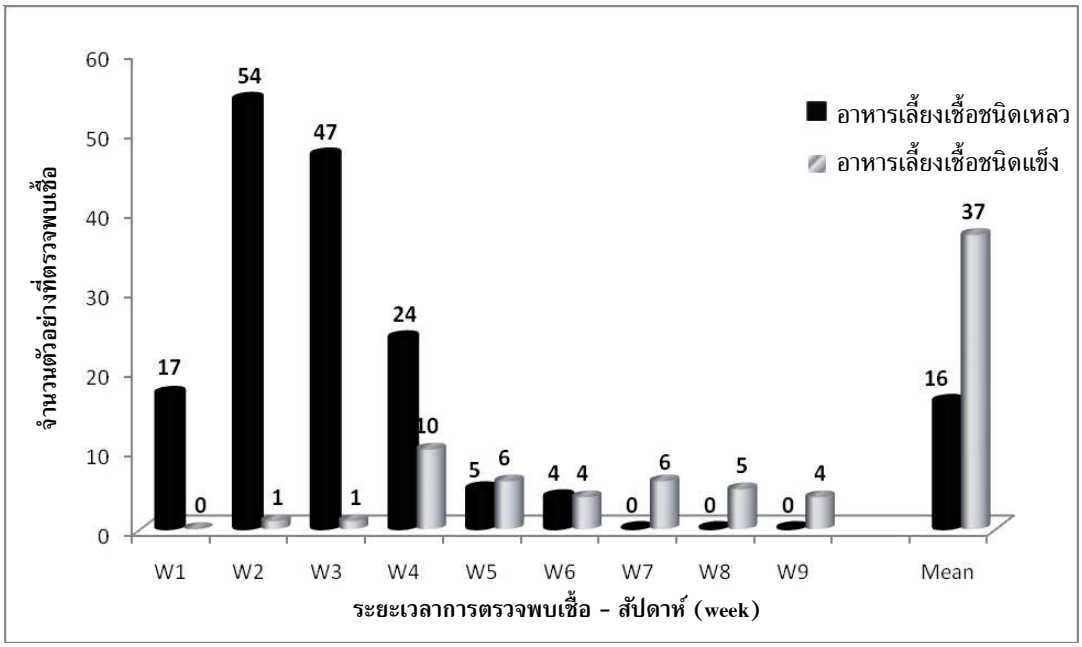
ช่วงเวลา (เดือน/ปี)	ม.ค. 2551– ก.พ.2552	มี.ค.2552-ก.ย.2553	ต.ค.2553-ธ.ค.2554
กระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	1. เพาะเชื้อ: อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง 2. DST: วิธีสัดส่วน-เปรียบเทียบ (ส่งต่อภายนอก)	1. เพาะเชื้อ: อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2. DST: วิธีสัดส่วน-เปรียบเทียบ (ส่งต่อภายนอก)	1. เพาะเชื้อ: อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 2. DST: วิธี MTT
ระยะเวลารายงานผล (TAT)	213 วัน (7 เดือน) พิสัย 121 – 307 วัน	145 วัน (4.8 เดือน) พิสัย 80 – 212 วัน	41 วัน (1.4 เดือน) พิสัย 20 – 79 วัน
อัตราการตรวจพบเชื้อ	4.3%	21%	19%

DST: Drug susceptibility test, TAT: Turnaround time (ระยะเวลาตั้งแต่รับตัวอย่างตรวจ ถึงเวลารายงานผลตรวจวิเคราะห์ที่สมบูรณ์)

เป็นเชื้อวัณโรค (*M. tuberculosis*) และมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ (NTM) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคและมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ คิดเป็นร้อยละ 99.3 (147/148) และร้อยละ 66.7 (2/3) ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งพบเพียงร้อยละ 21.6 (32/148) และ 33.3 (1/3) ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรค ระหว่างวิธี MTT และวิธีสัดส่วน-เปรียบเทียบในเชื้อวัณโรค จำนวน 65 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างตรวจผู้ป่วย ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงมิถุนายน 2554 พบว่าการทดสอบความไวต่อ rifampicin, isoniazid, ethambutal และ streptomycin โดยวิธี MTT ให้ผลการทดสอบไม่ต่างกับ วิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ คิดเป็นร้อยละ 96.9 (63/65), 95.4 (62/65), 93.8 (61/65) และ 98.5 (64/65) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลการทดสอบของสองวิธีให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน คิดเป็นร้อยละ 12.3 (8/65) โดยร้อยละ 66.7 (4/6) พบเป็นเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน (MDR-TB) ขณะที่วัณโรคไม่ดื้อยา (non-MDR-TB) ให้ผลไม่สอดคล้องกันเพียงร้อยละ 6.8 (4/59) (ตารางที่ 4)

ภาพที่ 2 เปรียบเทียบอัตราการตรวจพบเชื้อ และระยะเวลาการตรวจพบเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและอาหาร-เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง



ตารางที่ 2 ความสามารถในการตรวจพบเชื้อมัยโคแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

ชนิดของเชื้อ	จำนวนเชื้อ (Isolates)	ร้อยละของการตรวจพบเชื้อ	
		อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง
เชื้อวัณโรค	148	99.3 (147)	21.6 (32)
เชื้อมัยโคแบคทีเรีย อื่นๆ	3	66.7 (2)	33.3 (1)
รวม	151	98.7 (149)	21.9 (33)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี MTT และวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ ในเชื้อวัณโรคจำนวน 65 สายพันธุ์

ยาต้านวัณโรค	วิธี MTT (n = 65)		วิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ (n = 65)		ความสอดคล้อง
	Susceptible	Resistant	Susceptible	Resistant	
ยา rifampicin	89.2% (58/65)	10.8% (7/65)	89.2% (58/65)	10.8% (7/65)	96.9% (63/65)
ยา isoniazid	86.2% (56/65)	13.8% (9/65)	89.2% (58/65)	10.8% (7/65)	95.4% (62/65)
ยา ethambutol	93.8% (61/65)	6.2% (4/65)	98.5% (64/65)	1.5% (1/65)	93.8% (61/65)
ยา streptomycin	92.3% (60/65)	7.6% (5/65)	90.8% (59/65)	9.2% (6/65)	98.5% (64/65)

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี MTT และสัดส่วนเปรียบเทียบ ในเชื้อวัณโรคจำนวน 65 สายพันธุ์ แยกเป็นวัณโรคดื้อยา (MDR-TB) และวัณโรคไม่ดื้อยา (Non-MDR-TB)

เชื้อวัณโรค	มีความสอดคล้อง	ไม่สอดคล้อง
เชื้อวัณโรคดื้อยา (6 สายพันธุ์)	33.3% (2/6)	66.7% (4/6)
เชื้อวัณโรคไม่ดื้อยา (59 สายพันธุ์)	93.2% (55/59)	6.8% (4/59)
รวม (65 สายพันธุ์)	87.69 (57/65)	12.3% (8/65)

วิจารณ์

การนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาใช้ในการตรวจเพาะเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ จะช่วยเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรคและลดระยะเวลาการตรวจพบเชื้อ สอดคล้องกับหลายการศึกษา[7-10] ในการศึกษานี้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการตรวจพบเชื้อ 16 วัน น้อยกว่าระยะเวลาที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (ใช้เวลาเฉลี่ย 37 วัน) สอดคล้องกับการศึกษาของ Nichole Hines และคณะ ที่พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวใช้ระยะเวลาในการพบเชื้อเฉลี่ย 15.8 วัน[9] ต่างจากการศึกษาของ Luqman Satti และคณะ และ C Rodrigues และคณะ ที่ใช้ระยะเวลาเฉลี่ยในการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างตรวจเสมหะที่ให้ผลเสมียร์เป็นบวกเพียง 11.2 และ 9 วัน ตามลำดับ[8,19] เนื่องจากการศึกษานี้ได้ศึกษาในตัวอย่างชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเสมหะที่ให้ผลเสมียร์ทั้งบวกและลบ ตัวอย่างตรวจที่มีเชื้อมัยโคแบคทีเรียจำนวนน้อย มีผลให้ตรวจไม่พบเชื้อโดยกล้องจุลทรรศน์ (เสมียร์ลบ) แต่อาจตรวจพบเชื้อโดยเทคนิคอื่น ๆ ที่มีความไวในการตรวจพบเชื้อมากกว่า เช่น การเพาะเชื้อหรือวิธีทางอณูชีววิทยา[3] ในการทดสอบตัวอย่างตรวจที่ให้ผลเสมียร์เป็นลบจึงอาจต้องใช้เวลานานขึ้นในการตรวจพบเชื้อ

ในการศึกษานี้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดการตรวจพบเชื้อ 3 วัน สูงสุด 38 วัน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใช้เวลา 10 วัน และ 63 วัน ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Jacob Out และคณะ ที่ใช้เวลาในการตรวจพบเชื้อน้อยที่สุด 2 วัน มากที่สุด 34 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ส่วนอาหารเลี้ยง-เชื้อชนิดแข็งใช้เวลา 14 วัน และ 56 วัน ตามลำดับ[10] สำหรับการศึกษาอัตราการปนเปื้อนจากการเพาะเชื้อพบว่าไม่มีความแตกต่างในอาหารทั้งสองชนิด อัตราการปนเปื้อน คิดเป็นร้อยละ 4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และร้อยละ 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง เชื้อที่พบส่วนใหญ่เป็น gram positive cocci, gram negative bacilli,

Diphteroid และ *Bacillus spp.*

ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกแนะนำให้มีการใช้อาหาร-เลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในการเพาะเชื้อวัณโรคเพื่อช่วยเพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อวัณโรค และลดระยะเวลาการตรวจพบเชื้อในหลาย ๆประเทศที่พัฒนาแล้ว[20] อย่างไรก็ตาม ในการทดสอบการเพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งยังคงเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากมีข้อจำกัดเรื่องราคาของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งยังคงมีความจำเป็น เนื่องจากการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อและการทดสอบการดื้อต่อยาต้านวัณโรค ยังจำเป็นต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง[18] การศึกษานี้ได้เปรียบเทียบเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เจริญทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งและเหลว ระหว่างเดือนมีนาคมถึงธันวาคม 2552 จำนวน 151 สายพันธุ์ (จากตัวอย่างตรวจ 712 ตัวอย่าง) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสามารถตรวจพบเชื้อมัยโคแบคทีเรียร้อยละ 98.7 (149/151) สูงกว่าการตรวจพบเชื้อในอาหาร-เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่ตรวจพบเชื้อเพียง 21.9 (33/151) (ตารางที่ 2) นั่นคือตัวอย่างตรวจผู้ป่วยที่มีเชื้อมัยโค-แบคทีเรีย 100 ตัวอย่าง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งตรวจพบเชื้อเพียง 22 ตัวอย่าง ส่วน 78 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อ ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแม้จะมีราคาแพง แต่สามารถตรวจพบเชื้อมากถึง 99 ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ พบว่าเป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ๆ โดยพบในปริมาณที่น้อย (2 colonies) ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บตัวอย่างตรวจ หรือระหว่างกระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเชื้อนี้สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป[15,18] ผู้ป่วยวัณโรคที่ตรวจไม่พบเชื้อ จะสูญเสียโอกาสในการรับการรักษาที่เหมาะสม การขาดประสิทธิภาพในการค้นหาผู้ป่วยจะมีผลต่อมาตรการในการเข้าไปควบคุมและป้องกันวัณโรคของเจ้าหน้าที่ นอกจากนี้ ผู้ป่วยเองซึ่งไม่รู้ว่าเป็นวัณโรคและไม่ได้ป้องกันตัวเอง ทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อไปยังครอบครัว คนใกล้ชิดเพื่อนร่วมงานและสิ่งแวดล้อม มีผลให้จำนวนผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้น เกิดปัญหาในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของวัณโรคในที่สุด อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแม้จะมีราคาแพง แต่อาหารชนิดนี้จะช่วยให้ห้องปฏิบัติ-การสามารถค้นหาผู้ป่วยได้เพิ่ม และรวดเร็วขึ้น มากกว่าการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเพียงอย่างเดียว ทำให้ทีมรักษา ทีมควบคุมและป้องกันโรค มีข้อมูลที่ถูกต้อง ในการร่วมกันดูแลผู้ป่วยวัณโรคได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

วิธีมาตรฐานในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคที่องค์การอนามัยโลกแนะนำคือ วิธีสัดส่วนเปรียบเทียบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่เติมยาและไม่เติมยา วิธีนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากใช้ระยะเวลานานในการรายงานผล[20,21] ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการทดสอบต่าง ๆ ที่ให้ได้ผลการทดสอบที่เร็วขึ้น[12,22-24] การทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวของ BecTec ให้ผลการทดสอบเร็วกว่าวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ แต่มีข้อจำกัดเรื่องของราคาและมีสารกัมมันตภาพรังสี[25] เช่นเดียวกับการทดสอบอื่น ๆ และวิธีทางอณูชีวโมเลกุล (PCR) แม้จะให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดเรื่องราคา การศึกษานี้ได้นำวิธี MTT ซึ่งเป็นวิธีทดสอบที่รวดเร็วและราคาไม่แพง[11,26] มาใช้ทดสอบความไวต่อยารักษาวัณโรคที่ใช้ในปัจจุบันเพื่อลดระยะเวลาการทดสอบการดื้อต่อยารักษาวัณโรค และรายงานผลได้เร็วขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยวัณโรค และควบคุมการแพร่กระจายเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น[27] เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการรายงานผลการทดสอบ ผู้วิจัยได้ดำเนินการเปรียบเทียบผลการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคโดยวิธี MTT และวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ พบว่า ผลการทดสอบความไวต่อ rifampicin และ isoniazid ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้ในการรักษาวัณโรค ให้ผลทดสอบที่สัมพันธ์กับวิธีสัดส่วนเปรียบเทียบ วิธี MTT สามารถนำมาใช้ในการทดสอบเบื้องต้นในการทดสอบความไวต่อเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ (screening test)

และอาจนำมาใช้สำหรับการสืบสวนการระบาดของเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตามควรระมัดระวังในการแปลผลการทดสอบต่อเชื้อวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ซึ่งส่วนใหญ่จะเจริญช้า ทำให้บางครั้งอาจแปลผลการทดสอบเป็นไว นอกจากนี้ความไม่คงตัวของ ethambutal ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องระมัดระวังในการอ่านและการแปลผลการทดสอบ

ผลการปรับระบบการทำงานโดยการเพาะเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดแข็งร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ทำให้เพิ่มอัตราการตรวจพบเชื้อและลดระยะเวลาในการตรวจพบเชื้อ และเมื่อนำวิธี MTT มาใช้ในการทดสอบความไวต่อยาต้านวัณโรคร่วมด้วย ทำให้ระยะเวลารายงานผลการเพาะเชื้อวัณโรคลดลงจากเดิม 7 เดือน (213 วัน; พิสัย 121 – 307 วัน) เป็น 1.4 เดือน (41 วัน; พิสัย 20 – 79 วัน)

เอกสารอ้างอิง

1. Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995;273:220-6.
2. Dye C, Scheele A, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement: global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country: WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282:677-86.
3. ศรีประพา เนตรนิยม. แนวทางการดำเนินงานควบคุมวัณโรคแห่งชาติ พ.ศ. 2556. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2556.
4. ชัญญาภรณ์ น้ำค้าง. วัณโรค: โรคเก่าที่ยังคงเป็นปัญหา [อินเทอร์เนต]. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ; 2552 [สืบค้นเมื่อ 20 ต.ค. 2555]. แหล่งข้อมูล: http://www. nesdb.go.th/temp_social/ts/temp_social_1-2552.pdf
5. สุขสันต์ จิตติมณี, จิรวัฒน์ วรสิงห์, นิภาพร คงเพ็ชรขาว, สุดารัตน์ กกแก้ว, ธนกร กระต่ายทอง, นภัสร ตันติกุล, และคณะ. รายงานสถานการณ์และผลการดำเนินงานวัณโรคของไทยประจำไตรมาสที่ 1 ปีงบประมาณ 2554. [อินเทอร์เนต]. กรุงเทพมหานคร: สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2554. [สืบค้นเมื่อ 20 ต.ค. 2555]. แหล่งข้อมูล: http://www.tbthailand.org/images/present/pre-20110608123507-1.pdf
6. บัญญัติ ปริชญานนท์, ยงยุทธ โพธารามิก, สงคราม ทรัพย์เจริญ, นัดดา ศรียาภัย, ชัยเวช นุชประยูร, สุชัย เจริญรัตนกุล, และคณะ. แนวทางการวินิจฉัยและรักษาวัณโรคในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. ม.ป.ท. ; 2543.
7. Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of *mycobacteria*. Int J Tuberc Lung Dis 2003;7:569-74.
8. Luqman S, Aamer I, Shahid A, Tariq B, Nasarullah M, Irfan AM. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for recovery of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Pakistan. MJM 2010;6:203-8.
9. Nichole H, Janet BP, Lorraine JH. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. J Vet Diagn Invest 2006;18:243-50.
10. Out J, Antonio M, Cheung YB, Donkor S, De Jong BC, Corrah T, et al. Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of *mycobacteria* in The Gambia. J Infect Developing Countries 2008;2:200-5.
11. Abate G, Aseffa A, Selassie A, Goshu S, Fekade B, WoldeMeskal D, et al. Direct Colorimetric Assay for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004;42:871-3.
12. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjrattanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6:1118-22.
13. Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate

method of proportion. J Clin Microbiol 2002;40:607-10.

14. Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G. Evaluation of BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT 960) Automated System for Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 2001;39:4440-4.
15. วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอุรุเลิศ, สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ. การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทาการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2553.
16. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ ศิริราชพยาบาล. หนังสือคู่มือชุดทดสอบเชื้อก่อวัณโรคด้วยวิธีรวดเร็วจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เพาะได้จากสิ่งส่งตรวจ. ม.ป.ท.; 2552.
17. กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น. การเพาะเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ ระเบียบวิธีปฏิบัติหมายเลข LAB-MI-SOP 201 วันที่มีผลบังคับใช้ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2553. ม.ป.ท.;2553.
18. Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington DC: ASM Press, 1991.
19. Rodrigues C, Shenai S, Sadani M, Sukhadia N, Jani M, Ajbani K, et al. Evaluation of the bactec MGIT 960 TB system for recovery and identification of *Mycobacterium tuberculosis complex* in a high volume tertiary care centre. Indian J Med Microbiol 2009;27:217-21.
20. Crofton SJ, Chaulet P, Maher D. Guidelines for the management of drug resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 1997.
21. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 1985.
22. McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, Nye PM, Stoker NG. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4:69-75.
23. Rudi R, Hamidou T, Hans DB, Wouter M, Geert J, Pim DR, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2093-8.
24. Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of *Mycobacteria* growth indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1999;3:344-8.
25. Glenn DR, Norman LG, Leonid L, Howard WL, Thomas HL, Kenneth M, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of *mycobacteria* and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1983;18:689-96.
26. Robert N M, Genet T, Getahun A, Hakan M. Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 1998;36:1214-9.
27. Wenger P N, Beck-Sague C M, Jarvis W R, Otten J, Breeden A, Orfas D. Control of nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1995;345:235-40.

Abstract: Development of *Mycobacterium* culture at Medical Laboratory, Khon Kaen Hospital

Nuttiya Srisurat, B.Sc. (Medical Technology), M.Sc. (Medical Microbiology); Sasiprapa Wattanavises, B.Sc. (Medical Technology); Natthanit Suwansirikul, B.Sc. (Medical Technology)

Department of Medical Laboratory, Khon Kaen Hospital

Journal of Health Science 2015;24:367-77.

The objective of this study was to determine the combination of solid (Lowenstein-Jensen medium - LJ medium) and liquid media (Mycobacterium growth indicator tube - MGIT) in addition to MTT assay (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to increase positive rate of *Mycobacteria* detection and reduce turnaround time of *Mycobacterium* culture. A total of 2,572 clinical specimens, requested for *Mycobacterium* culture in KhonKaen Hospital from March 2009 to December 2012 were cultured on solid and liquid media and then tested for anti-TB susceptibility test by using MTT method. The liquid media was evaluated and compared with solid media for recovery of *Mycobacteria* in terms of positive rate and detection time. To evaluate the performance of MTT method for first-line drugs susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* and compared to proportion method. The results showed that positive rate of *Mycobacteria* detection was increase from 4.3% to 19.5% when combined the culture on solid and liquid media. A total of 151 samples were tested for the presence of *Mycobacteria* were analysis; The mean time to detection was 16 days (range 3 - 38 days) with liquid media, while 37 days (range 10 - 63 days) with solid media. The recovery rate of *Mycobacteria* was 98.7% (149/151) on liquid media and 21.9% (33/151) on solid media. The results of rifampicin, isoniazid, ethambutal and streptomycin resistance to *Mycobacterium tuberculosis* by using MTT and proportion method, showed a high level of agreement with 96.9% (63/65), 95.4% (62/65), 93.8% (61/65) and 98.5% (64/65), respectively. Inconsistent results of two methods was 12.3% (8/65), these 66.7% (4/6) was the multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), while 6.8% (4/59) was the Non-MDR-TB. Conclusions: the liquid media has better recovery rate and reduce time to detection of *Mycobacteria*. In addition to using MTT method, the turnaround time of Mycobacterium culture was reduced from 7 months (121 - 301 days) to 1.4 months (20 - 79 days).

Key words: **Tuberculosis, *Mycobacterium* culture, culture media**