บทที่1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

วัณโรคเป็นโรคติดต่อที่สำคัญเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศกำลังพัฒนาทั่วโลก และยังคงมีการแพร่ระบาดในหมู่ประชากรทุกภูมิภาคของโลก ผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว องค์การอนามัยโลกรายงานว่าในแต่ละปีมีผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นประมาณ 7-8 ล้านราย และเสียชีวิตปีละ 2-3 ล้านราย (Raviglione, 2003) จำนวนผู้ป่วยสะสมมีมากกว่า 16 ล้านรายทั่วโลก ในจำนวนนี้ เกือบ 40% เป็นผู้ป่วยที่มีเชื้อวัณโรคในเสมหะ (ภาสกร อัครเสวี, 2543) และสามารถแพร่เชื้อติดต่อไปยังผู้อื่นได้โดยการไอจาม ทำให้เกิดวงจรการแพร่เชื้อวัณโรคต่อเนื่องในทุกภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะในประเทศที่มีผู้ป่วยจำนวนมากระบบสาธารณสุขไม่ดีพอ และการควบคุมวัณโรคขาดความต่อเนื่องไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาไม่ต่อเนื่อง จะส่งผลให้เกิดการดื้อยาต้านวัณโรค และแพร่เชื้อที่ดื้อยาไปยังผู้อื่นได้ การระบาดของเชื้อเอชไอวี ทำให้ปัญหาวัณโรคเลวร้ายมากขึ้น (World Health Organization, 2002) ดังที่พบในแถบประเทศอาฟริกา และปัจจุบันส่งผลกระทบอย่างมากในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงแม้ว่าจะพบวัณโรคในทุกประเทศทั่วโลก แต่มีประมาณ 20 ประเทศเท่านั้นที่มีผู้ป่วยรวมกันเท่ากับ 80% ของผู้ป่วยทั้งหมดทั่วโลก (World Health Organization, 2002) โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย ประเทศที่พบผู้ป่วยมาก ได้แก่ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ เวียดนาม และไทย มีผู้ป่วยรวมกันเป็น 60% ของผู้ป่วยทั่วโลก ดังนั้นองค์การอนามัยโลกได้ประกาศให้วัณโรคเป็นภาวะฉุกเฉินทางสุขภาพและเรียกร้องให้ผู้นำทุกประเทศให้ความสนใจ มุ่งมั่น แก้ปัญหาอย่างจริงจัง

ในประเทศไทยปัญหาการติดเชื้อวัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ เนื่องจากเป็นสาเหตุของการทำลายสุขภาพ และการดำรงชีพของประชากรไทย การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดในชุมชน เช่นในโรงงานอุตสาหกรรม ชุมชนแออัด เรือนจำ เนื่องจากสภาพความเป็นอยู่หนาแน่น ปัญหาเศรษฐกิจไม่เอื้ออำนวยต่อการดูแลสุขภาพ โดยเฉพาะในเรือนจำยังมีปัญหายาเสพติด ซึ่งส่งผลให้มีการติดเชื้อเอชไอวีร่วมด้วย ทำให้การแพร่เชื้อวัณโรคจากผู้ต้องขังคนหนึ่งไปยังผู้ต้องขังอีกคนหนึ่งได้ง่าย ถึงแม้องค์การอนามัยโลก และคณะกรรมการกาชาดระหว่างประเทศ (World Health Organization and International Committee of the Red Cross) ได้ตระหนักถึงปัญหานี้ และได้

จัดทำคู่มือสำหรับการควบคุมวัณโรคในผู้ต้องขัง (Guidelines for The Control of Tuberculosis in Prisons) ในประเทศไทยพบความแออัดของผู้ต้องขังในเรือนจำ และยาเสพติดยังคงเป็นปัญหาที่ยังไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจัง ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับวัณโรคในผู้ต้องขังทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็น (DNA fingerprinting) โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยใช้ IS*6110* เป็นตัวตรวจจับเพื่อที่จะจำแนกความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเชื้อ อันจะนำไปสู่ต้นตอหรือแหล่งของการแพร่เชื้อ รวมทั้งทราบถึงวิธีการติดเชื้อ และข้อมูลเหล่านี้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวางแผนการควบคุมวัณโรคในอนาคต

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 จีนัส มัยโคมัยแบคทีเรีย

เชื้อมัยโคมัยแบคทีเรีย (Mycobacteria) จัดอยู่ในอันดับ (Order) Actinomycetales และวงศ์ Mycobacteriaceae แบคทีเรียในจีนัสนี้ ส่วนที่สำคัญของผนังเซลล์ประกอบด้วย mycolic acid ซึ่งเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ที่ต่อกันเป็นสายยาว ทำให้เชื้อในจีนัสนี้มีคุณสมบัติในการติดสีทนกรด (acid fastness) เมื่อย้อมติดสีแล้วล้างด้วยสารละลายอินทรีย์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดไม่ออก แบคทีเรียในจีนัสอื่นที่มี mycolic acid เป็นส่วนประกอบ ได้แก่ Nocardia, Rhodococcus ติดสีทนกรด เช่นกัน แต่การติดสีทนกรด ไม่สม่ำเสมออย่าง มัยโคมัยแบคทีเรีย เนื่องจาก mycolic acid มีขนาดเล็กกว่า

การจำแนกสปีชีส์ (species) ของมัยโคแบคทีเรียในปัจจุบันมีกว่า 60 สปีชีส์ มีทั้งทำให้เกิดโรคในคนและไม่เกิดโรคในคน การตั้งชื่อสปีชีส์ อาศัยคุณสมบัติในการเจริญเติบโต และคุณสมบัติทางชีวเคมีเป็นหลักที่เรียกว่า Adansonian taxonomy (Metchock *et al*.., 1999) จนถึงปี ค.ศ.1980 มีการตั้งชื่อไว้ 41 species ด้วยกัน ในเวลาต่อมาเมื่อมีการศึกษาทางชีวโมเลกุลของเชื้อและจีนที่ควบคุมการสร้างอาร์เอ็นเอ เช่น 16s ribosomal-RNA ได้อาศัยเทคโนโลยีทางชีวโมเลกุลดังกล่าวตั้งชื่อสปีชีส์ ใหม่ๆ อีกกว่า 20 ชนิด (Connell and Kreiswirth, 2000) โดยเฉพาะแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า เช่น *Mycobacterium gevanense* ซึ่งทำให้เกิดโรคในผู้ป่วยเอดส์ คล้าย *Mycobacterium avium* นอกจากนั้น ในการศึกษาจีนอาร์เอ็นเอพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่าง Mycobacterium, Nocardia และ Rhodococcus จึงมีผู้เสนอให้รวม 3 จีนัส เข้าอยู่ใน family เดียวกัน

มัยโคมัยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในคน จำแนกประเภทได้ดังนี้

ก. Mycobacterium tuberculosis (TB) complex ซึ่งได้แก่ *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* และ *M. microti*

ข. Nontuberculous mycobacteria (NTM) หรือ atypical mycobacteria ซึ่งได้แก่ *M. avium*-intracellularae complex (MAC), *M. kansasii*, *M. scrofulaceum, M. fortuitum, M. chelonae* เป็นต้น

ค. *M. leprae*

เชื้อในกลุ่ม TB complex มี virulence สูง และมีการติดต่อระหว่างคนต่อคนได้ทางละอองหายใจ (droplet infection) ประกอบด้วย 4 สปีชีส์ ได้แก่

M. tuberculosis ทำให้เกิดวัณโรคในคน

M. africanum ทำให้เกิดโรคในคน (พบมากในผู้ป่วยแถบทวีปอาฟริกา)

M. bovis ทำให้เกิดโรคในวัว ควาย และติดต่อมาถึงคนได้

M. microti เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ที่มีฟันแทะเช่น หนู หนูตะเภาและกระต่าย แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในคน เคยนำมาทำเป็นวัคซีนแต่มีผลข้างเคียงมากกว่า BCG จึงเลิกใช้

ทั้ง 4 สปีชีส์นี้ แม้จะมีความแตกต่างกันในคุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะของการเพาะเชื้อ แต่ก็มีความคล้ายคลึงกันใน DNA sequence โดยเฉพาะ Insertion sequence ที่ชื่อว่า IS*6110* จึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันและเชื่อว่าอาจเป็น variant ของสปีชีส์เดียวกัน

M. tuberculosis ยังแบ่งออกได้เป็น 2 variants คือ classical variant และ Asian variant ทั้งสอง variant แยกจากกันได้โดย TCH (Thiophen-2-carboxylic acid hydrazide) คือ classical variant resist ต่อ TCH แต่ Asian variant susceptible ต่อ TCH

M. africanum ก็แบ่งออกได้เป็น 2 variant คือ africanum I และ africanum II africanum I มีคุณสมบัติทางชีวเคมีใกล้มาทาง *M. bovis* คือไม่ reduce nitrate ส่วน africanum II มีคุณสมบัติทางชีวเคมีใกล้มาทาง *M. tuberculosis* คือ reduce nitrate

M. bovis ก็มี 2 variants คือ classical และ BCG (Bacillus Calmette-Guerin)แยกจากกันได้โดย BCG เจริญได้ดีใน glycerol

การจำแนก variant ไม่มีความสำคัญในเชิงการรักษากล่าวคือในทางการรักษาจะใช้ยารักษาสูตรเดียวกันได้ผล แต่มีความสำคัญในเชิงระบาดวิทยามากกว่า

1.2.2 **เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis***

Robert Koch เป็นคนแรกที่พิสูจน์ไว้เมื่อปี ค.ศ.1882 ว่า วัณโรคปอดในมนุษย์มีสาเหตุจากเชื้อโรคซึ่งสามารถแยกบริสุทธิ์ได้จากผู้ป่วย และเมื่อฉีดเข้าสัตว์ทดลองก็ทำให้เกิดโรคในสัตว์ทดลอง แล้วสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์กลับคืนจากสัตว์ทดลองที่เป็นโรคได้ เชื้อดังกล่าว เรียกกันว่า Koch's tubercle bacillus ซึ่งต่อมาได้รับการตั้งชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Mycobacterium tuberculosis* โดย Lehman and Neuman ในปี ค.ศ. 1896 โดยได้รวมเอา human และ bovine type เข้าด้วยกัน (American Thoracic Society, 1990) ต่อมาในปี ค.ศ.1970 Karlson และ Lessel จึงตั้งชื่อ bovine type เป็นสปีชีส์ต่างหากคือ *Mycobacterium bovis* และเอาชื่อ *M. tuberculosis* คงไว้เป็นชื่อเรียกของ human tubercle bacillus เชื้อ *M. tuberculosis* เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคในคน เชื้อนี้พบในรอยโรคของผู้ป่วยเท่านั้น ไม่พบในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ

1.2.2.1 สมบัติของเชื้อวัณโรค

เชื้อวัณโรคมีรูปร่างเป็นท่อน หนาประมาณ 0.3 ไมครอน ยาวประมาณ 2-5 ไมครอน ไม่มีแคปซูล ไม่สามารถเคลื่อนที่ และไม่มีสปอร์ เมื่อย้อมด้วยสีแกรม จะติดสีแกรมจางๆ เมื่อย้อมด้วยสี carbol fuchsin ด้วยวิธี Ziehl Neelsen จะติดสีแดง บางครั้งเห็นเป็นแท่งตรงๆ หรือเป็นแท่งโค้งเล็กน้อย อาจพบการติดสีไม่สม่ำเสมอ beaded form ส่วนที่ติดสีมากเกิดจาก inclusion bodies ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นพวก polymetaphosphate และส่วนที่ไม่ติดสีเกิดจาก unstained vacuole ภายในเซลล์ เชื้อวัณโรคที่เพิ่งเพาะเชื้อขึ้น อาจไม่ติดสี acid fast การถูกแสงอุลตราไวโอเลตก็ทำให้คุณสมบัติในการติดสี acid fast เปลี่ยนไปได้ด้วย

โครงสร้างของเซลล์มีลักษณะทำนองเดียวกับที่พบในแบคทีเรียทั่วไป มีผนังเซลล์ cytoplasmic membrane, mesosomes, ribosomes, fibril และ inclusion bodiesโครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยโมเลกุลของสารที่สำคัญ 3 ชนิด คือ peptidoglycan (ซึ่งเป็น glycopeptide), arabinogalactan (ซึ่งเป็น polysaccharides) และ mycolic acid (ซึ่งเป็นกรดไขมัน) สารดังกล่าวรวมตัวกันเป็น mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan complex โดยมีชั้นของ peptidoglycan อยู่ติดกับ plasma membrane ถัดออกมาเป็น arabinogalactan และ mycolic acid ตามลำดับ และมี mycoside (ซึ่งเป็น glycolipid), sulfatides (sulfolipid) และ lipid ชนิดต่างๆ คลุมอีกชั้นหนึ่ง นอกจากนั้น ยังมีโครงสร้างของ lipopolysaccharide ที่มีชื่อว่า lipoarabinomannan ผ่านชั้นต่างๆของผนังเซลล์ไปยึดติดกับ phospholipid ของ plasma membrane เสมือนหนึ่งเป็นโครงให้กับผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคมีการเรียงตัวของ peptidoglycan เป็นชั้นๆ คล้ายแบคทีเรียแกรมบวก แต่มีส่วนประกอบค่อนมาทางแบคทีเรียแกรมลบ กล่าวคือ มี lipid มาก มี glycopeptide และโปรตีนน้อย การที่ผนังเซลล์มีไขมันสูงทำให้การซึมผ่านของสารต่างๆ ซึ่งเป็น polar compound ไม่ค่อยดี ทนต่อการทำลายของกรดหรือด่างได้ดี

สารต่างๆที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์มีคุณสมบัติในการเป็น antigen ดังนี้

ก. Arabinomannan และ arabinogalactan ซึ่งเป็น polysaccharide ทำให้เกิด neutrophilic response ใน host และเชื่อว่าทำให้เกิด immediate type hypersensitivity

ข. Glycolipid ชนิดต่างๆ เช่น

Wax D (peptidoglycolipid) มีสมบัติเป็น Freund ‘s adjuvant, ช่วยกระตุ้น immunogenicity ของแอนติเจนต่างๆ และทำให้เกิด delayed hypersensitivity

Trehalose dimycolate (cord factor) ทำให้เกิด granulomatous reaction ใน host

Mycoside C (peptidoglycolipid) ของ *M. avium* complex เป็น type specific ซึ่งนำมาใช้แยก serotype ต่างๆ ของ *M. avium* complex

Phospholipid ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ plasma membrane เช่น phosphatidyl inosital mannosides กระตุ้นให้เกิด humoral antibody

การเจริญของเชื้อวัณโรคเป็นแบบ obligate aerobe เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบง่ายๆ กล่าวคือ มี glycerol, pyruvate หรือ glucose เป็น carbon source มี ammonium salt, glutamine, glutamate เป็น nitrogen source แต่ชอบ asparagine มากกว่า ดังนั้น การเติม asparagine และ amino acid บางตัว เช่น alanine ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยเร่งให้เชื้อวัณโรคมีการเริ่มต้นเจริญพันธุ์และมีอัตราการเจริญพันธุ์เร็วขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญพันธุ์ คือ 38 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสม คือ 6.8

เชื้อวัณโรคชอบอาหารที่มีไขมันสูง ดังนั้นในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อวัณโรค จึงมีไข่แดงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ เช่นสูตรของ Löwentein Jensen, Ogawa และ Petragnani เป็นต้น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5-10 ช่วยให้การเจริญพันธุ์ของเชื้อวัณโรคดีขึ้น เชื้อวัณโรคมีอัตราการเจริญพันธุ์ค่อนข้างช้า ระยะเวลาที่เชื้อวัณโรคจะทวีจำนวนจากหนึ่งเป็นสอง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนั้น อย่างสั้นที่สุดกินเวลาถึง 12 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียอื่นใช้เวลาเพียง 20 นาที ก่อนนี้เข้าใจว่าเป็นเพราะผนังเซลล์ของเชื้อวัณโรคซึ่งมีไขมันสูงนั้นเป็นสิ่งกีดกั้นทำให้สารละลายต่างๆ ซึมเข้าสู่เซลล์ไม่ดี ทำให้เชื้อวัณโรคเจริญช้า แต่ข้อเท็จจริง พบว่า เชื้อที่แบ่งตัวเร็วมีโครงสร้างของผนังเซลล์ไม่แตกต่างไปจากเชื้อวัณโรค แต่มีจำนวน copy ของจีนแตกต่างกัน จึงเชื่อว่าจำนวนจีนที่ควบคุมการสร้าง RNA polymerase และอัตราการสร้าง อาร์เอ็นเอคงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากกว่า โคโลนีของ *M. tuberculosis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทไข่ จะเห็นด้วยตาเปล่าได้หลังจากอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 สัปดาห์ (18-24 วัน) ลักษณะของโคโลนีที่เห็นในระยะแรกๆ มีขนาดเล็ก (1-3 ม.ม.) สีเหลืองแกมเทา (buff color) ผิวแห้ง ขรุขระคล้ายหูด โคโลนีที่มีอายุหลายๆ สัปดาห์จะนูนโตขึ้น (5-8 ม.ม.) มีลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำ โคโลนีเหล่านี้ขูดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่ายแต่ emulsify ยาก ต่างจาก *M. bovis* ซึ่ง emulsify ได้ง่าย

มัยโคแบคทีเรีย แต่ละชนิดเจริญพันธุ์ได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมต่างๆกัน เช่น อาหารที่มี 5 % glycerol จะช่วยให้ *M. tuberculosis* เจริญพันธุ์ได้ดีขึ้น แต่ทำให้การเจริญพันธุ์ของ *M. bovis* ชะงักลง มัยโคแบคทีเรียแต่ละชนิดจึงสร้างสารเคมีและเอนไซม์ต่างๆได้ไม่เท่ากัน ทำให้มีปฏิกิริยาทางชีวเคมีไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงใช้อัตราการเจริญพันธุ์ การดูลักษณะโคโลนี และปฏิกิริยาทางชีวเคมี เป็นหลักสำคัญในการแยกชนิดของมัยโคแบคทีเรีย

1.2.2.2 พยาธิกำเนิดของโรคและการติดเชื้อวัณโรค

M. tuberculosis เป็นสาเหตุสำคัญของวัณโรคปอดในคนเป็นส่วนใหญ่ ที่เหลืออาจมีสาเหตุจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น ได้แก่ *M. bovis, M. avium, M. intracellulare, M. africanum* เป็นต้น

เชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายได้ ทางหายใจ ทางผิวหนัง และทางเดินอาหาร แต่ทางหายใจเป็นทางที่เชื้อเข้าสู่ร่างกายที่สำคัญที่สุด (ครอฟตัน และ คณะ, 2537) เมื่อผู้ป่วยวัณโรคปอดไอเอาเสมหะที่มีเชื้อวัณโรคออกมา ละอองฝอยที่มีขนาดเล็กๆ ขนาด 1-10 ไมครอน จะลอยและกระจายอยู่ในบรรยากาศ ละอองฝอยขนาดเล็กๆเหล่านี้อาจมีเชื้อโรคอยู่ 1-3 ตัว เมื่อถูกสูดเข้าไปตามลมหายใจ จะเข้าถึงหลอดลมฝอย และถุงลม (ซึ่งไม่มีสารเมือกฉาบอยู่) และก่อการอักเสบขึ้นได้ ละอองฝอยที่มีขนาดใหญ่กว่านี้ มักตกสู่พื้นเสียก่อน หรือถ้าไม่ตกสู่พื้น เมื่อถูกสูดเข้าไปก็มักติดอยู่บนสารเมือกซึ่งบุอยู่ในหลอดลมขนาดใหญ่และถูกขับออกมาภายนอก

ความต้านทานด่านแรกของร่างกายในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนคือ alveolar macrophage และถูกทำลายเป็นส่วนใหญ่ ในกรณีที่เชื้อวัณโรคมี virulence สูง เชื้อสามารถทวีจำนวนและทำลาย macrophage และถูกปลดปล่อยออกมาจาก macrophage เมื่อมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell mediated immunity) จะทำให้เกิดการอักเสบขึ้น จะมีการสร้าง tubercle เล็กๆ และมีการทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้น ทำให้เกิดโพรง ซึ่งต่อมาจะมีการสะสมของหินปูน (calcification) ล้อมรอบบริเวณนั้น เชื้อวัณโรคที่เหลืออยู่จะสงบในปอด จนกระทั่งมีปัจจัยที่ทำให้ร่างกายอ่อนแอ และถูกกระตุ้น (reactivate) ทำให้เพิ่มจำนวน และก่อโรคอีกครั้ง วัณโรคปอดในผู้ใหญ่ซึ่งมีความต้านทานปกติ ส่วนมากไม่ได้เกิดจากการรับเชื้อใหม่จากภายนอก (exogenous) แต่เกิดจากเชื้อที่เคยสงบนิ่งอยู่นานถูกกระตุ้น (endogenous reactivate) ในผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งมีภูมิต้านทานต่ำ วัณโรคส่วนใหญ่เกิดจาก exogenous infection และมีการดำเนินโรคที่รุนแรง

ปัจจัยที่กระตุ้นเชื้อวัณโรค ได้แก่โรคเบาหวาน, malnutrition, corticosteroid, immunosuppressive drugs, puberty, postpartum, และ postgastrectomy เป็นต้น มีผู้ประมาณไว้ว่า ประมาณร้อยละ 5 ของผู้ที่เคยได้รับเชื้อวัณโรค จะเกิดเป็นโรคขึ้นภายในระยะเวลา 1 ปี Canetti และคณะ ได้ทำการศึกษาจำนวนของเชื้อวัณโรคในรอยโรคที่ยังไม่ได้รับการรักษาลักษณะต่างๆ พบว่า รอยโรคที่ไม่เป็นโพรง (non-cavity) มีเชื้อจำนวนไม่มากนัก ($1x10^2$-$1x10^5$) และเชื้อส่วนใหญ่มี metabolic activity ต่ำหรืออาจจะสูงเป็นพักๆ เพราะรอยโรคประเภทนี้มีออกซิเจนน้อย ตรงข้ามกับรอยโรคที่เป็นโพรง (cavity) ซึ่งออกซิเจนจากบรรยากาศเข้าถึง รอยโรคประเภทนี้จะมีเชื้อวัณโรคจำนวนมาก ($1x10^7$-$1x10^9$) และมี metabolic activity สูง

1.2.2.3 **การวินิจฉัยวัณโรคทางคลินิก** (Clinical diagnosis of tuberculosis)

ผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่มีอาการ และมีอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่มีอาการ อาการวัณโรคอาจเป็นได้ทั้งอาการทั่ว ๆ ไป หรืออาการแสดงของวัณโรคปอด หรืออาการที่สัมพันธ์กับอวัยวะที่เป็นโรค หรืออาการแทรกซ้อนอื่น ๆ ดังนั้นในการวินิจฉัยวัณโรคทางคลินิกต้องอาศัย

ก. การซักประวัติ

เพื่อดูว่าเคยใกล้ชิดกับผู้ป่วยวัณโรคปอด หรือผู้ป่วยที่ไอเรื้อรัง เคยมีประวัติของปอดอักเสบหรือมีการผิดปกติของภาพรังสี และเคยมีประวัติของระบบอื่นๆที่ผิดปกติหรือไม่ เพราะวัณโรคสามารถลุกลามไปทุกอวัยวะในร่างกายได้

ข. การตรวจร่างกายในระบบทางเดินหายใจ

ผู้ป่วยจะไอมีเสมหะมากกว่า 3 สัปดาห์ อาจมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด ไข้ต่ำ ๆ ซึ่งมักเป็นตอนบ่าย ๆ หรือตอนเย็น เหงื่อออกตอนกลางคืน อาการเหล่านี้อาจนานเป็นสัปดาห์หรือเดือน ก่อนผู้ป่วยพบแพทย์

ค. การตรวจภาพรังสีทรวงอก

ลักษณะของภาพถ่ายรังสีทรวงอกที่เห็นอาจไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้แน่นอน เพราะมีโรคอื่นๆที่มีลักษณะคล้ายวัณโรค การพบภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติ จะเป็นประโยชน์ในแง่ที่แสดงว่าผู้ป่วยไม่เป็นวัณโรคปอด อย่างไรก็ดี วัณโรคของหลอดลมซึ่งพบได้ไม่น้อย จะมีผลภาพถ่ายรังสีทรวงอกปกติได้ ภาพถ่ายรังสีทรวงอกที่ทำให้สงสัยเป็นวัณโรคปอดคือ

ก. เป็นฝ้า หรือก้อน (Nodular หรือ patchy shadow) ที่ส่วนบนของปอดข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง

ข. มีเงาการเปลี่ยนแปลงที่ปอดส่วนบนทั้ง 2 ข้าง

ค. มีโพรงอากาศที่ปอดส่วนบน หรือปอดเป็นโพรง (cavity) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถ้ามีหลายโพรง

ง. เงาที่มีหินปูนเกาะ (calcified shadow) อาจจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการวินิจฉัยโดยทั่วๆไป เพราะปอดบวม หรือโรคมะเร็ง อาจจะเกิดขึ้นบริเวณเดียวกันกับที่เคยเป็นวัณโรคปอด และหายแล้วโดยวิธีมีหินปูนไปเกาะ เนื้องอกที่ไม่ร้ายแรงบางชนิดก็มี calcification ได้

จ. มีลักษณะเงาเส้นแสดงถึงพังผืด (fibrosis) ที่ปอดส่วนบน โดยเฉพาะร่วมกับเงาขาวบางๆแบบ soft shadow แสดงถึงวัณโรคแบบคุกคาม (active process) เป็นต้น

1.2.2.4 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory diagnosis of tuberculosis)

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธีได้แก่ การตรวจหาตัวเชื้อ ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ตรวจหาแอนติบอดีต่อส่วนประกอบของเชื้อ และตรวจหาเอนไซม์หรือเมตาโบไลท์บางชนิดที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญและจำนวนเชื้อวัณโรคเพื่อประกอบการพิจารณาว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรคหรือไม่ (ชัยเวช นุชประยูร, 2529) ในวิธีตรวจต่างๆเหล่านี้ การตรวจหาเชื้อวัณโรคทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยามีความสำคัญมากที่สุด เพราะการพบเชื้อในเสมหะ หรือสิ่งส่งตรวจชนิดอื่นจากผู้ป่วย นอกจากจะเป็นหลักฐานยืนยันว่าผู้ป่วยเป็นวัณโรค ยังบ่งชี้ว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะแพร่เชื้อ (active disease) ต้องได้รับการรักษาทันที การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาศัยการนำสิ่งส่งตรวจมาป้ายสไลด์และย้อมสีทนกรด (smear and acid fast staining) อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเพาะเชื้อเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรค

1.2.2.4.1 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการย้อมสีเพื่อหาเชื้อวัณโรคที่นิยมใช้มี 3 วิธี

ก. วิธี Ziehl-Neelsen จะใช้สี 0.3% carbofuchsin แล้วใช้ความร้อนเร่งการซึมผ่านของสีเข้าไปในเซลล์วัณโรคจากนั้นล้างด้วย acid-alcohol แล้วย้อมทับด้วย 0.1% methylene blue

ข. วิธี Kinyoun สีที่ใช้ย้อมเป็น 3.0% carbofuchsin โดยทำวิธีเดียวกับการย้อมวิธี Ziehl-Neelsen แต่ไม่ต้องใช้ความร้อน

ค. วิธีการย้อม fluorochrome ใช้สี fluorescence ที่นิยมใช้คือ auramine-O ข้อดีคือเชื้อที่ย้อมติดสีสามารถจะเห็นได้ง่ายในกล้องจุลทรรศน์ fluorescence

วิธีการย้อมเชื้อวัณโรคบอกเพียงว่าเชื้อที่เห็นเป็นมัยโคแบคทีเรีย แต่ไม่สามารถบอกชนิดของมัยโคแบคทีเรียได้

1.2.2.4.2 การเพาะเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจ (culture) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นการตรวจที่มีความจำเพาะสูงสุด ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ของการวินิจฉัยวัณโรค อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงวัณโรคมี 2 ประเภท ได้แก่ อาหารวุ้น (agar base medium) เช่น Middlebrook 7H10 และ Middlebrook 7H11 กับ อาหารไข่ (egg-base medium) เช่น Löwenstein-Jensen medium (Nauman,1995) และ Ogawa medium (Kanai, 1990) นอกจากอาหารแข็งนี้แล้ว อาจทดสอบในอาหารเหลวได้เช่น Middle-brook 7H9 และ Sauton medium เป็นต้น เมื่อเพาะเชื้อในอาหารที่เหมาะสมแล้ว ต้องนำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วจึงจำแนกชนิดของมัยโคแบคทีเรีย ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ วิธีนี้มีข้อดีในเรื่องความไว เพราะสามารถเพาะแยกเชื้อได้แม้มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตเพียง 10 เซลล์ต่อสิ่งส่งตรวจ 1 มิลลิลิตร

(American Thoracic Society, Centers for Disease Control. 1990) แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลานาน 4-6 สัปดาห์

1.2.2.4.3 การจำแนกเชื้อ *M. tuberculosis*

การพิสูจน์นิคมของเชื้อ จะดูจากลักษณะนิคม (ตาราง 1.2) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกเชื้อ *M. tuberculosis* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่มีการสร้างเม็ดสีใดๆ ยกเว้นสีเหลืองอ่อน (light buff color) ไม่ว่าจะบ่มที่มีแสงหรือไม่มีแสง การย้อมสีของเชื้อบนแผ่นสไลด์จะมีลักษณะของการเกาะของเชื้อเป็นสายคล้ายงู (serpentine cord) นอกจากนี้ยังใช้การทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีช่วยจำแนก *M. tuberculosis* ซึ่งมี 3 การทดสอบ (Kubica, 1973) คือ

ก. การทดสอบ Niacin

เชื้อ *M. tuberculosis* ไม่สามารถเปลี่ยน free niacin เป็น niacin ribonucleotide ดังนั้นจึงมีการสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ข. การทดสอบ Nitrate reduction

เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถผลิตเอนไซม์ เพื่อรีดิวส์ nitrate เป็น nitrite

ค. การทดสอบ Catalase ที่ 68 องศาเซลเซียส

เชื้อมัยโคแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase แต่เอนไซม์ catalase ของ *M. tuberculosis* ไม่ทนความร้อนที่ 68 องศาเซลเซียส เมื่อนำเชื้อไปอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกทำลายไป

ตาราง 1.1 สมบัติต่างๆที่ใช้สำหรับแยกเชื้อวัณโรคออกจากเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น (NTM) มีดังนี้

สมบัติ	*M. tuberculosis*	NTM
อัตราการเจริญเติบโต	>7 วัน	3 วัน หรือมากกว่า
อุณหภูมิ	37 ^{o}C	25^{o}C - 45^{o}C
ลักษณะของโคโลนี	แห้ง ขรุขระ คล้ายดอกกระหล่ำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง > 1-3 มม.	มีทั้งแห้ง ชื้น ขรุขระ และเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ~1-2 มม.
สีของโคโลนี	คล้ายฟางหญ้าแห้ง	ครีม เหลือง ส้ม หรือ ชมพู
Niacin test	บวก	ลบ
Nitrate reduction test	บวก	บวก หรือ ลบ
68^{o}C Catalase test	ลบ	บวก
Cord formation	บวก	ลบ

1.2.2.4.4 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธีอื่นๆ

มีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรค เพื่อได้ผลรวดเร็วยิ่งขึ้น

ก. การเพาะเชื้อวัณโรค

เพื่อลดระยะเวลาการวินิจฉัยจาก 6-8 สัปดาห์ ให้เหลือเพียง 3-4 สัปดาห์ (อังคณา ฉายประเสริฐ, 2542) บริษัทเอกชนพัฒนาสูตรอาหารเหลว และแยกเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติได้แก่ BACTEC 460 TB System (Middlebrook *et al*., 1977) โดยเพาะเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว BACTEC 12B ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี ^{14}C อยู่ในรูปของเกลือ palmitate เมื่อสิ่งส่งตรวจมีเชื้อมัยโคแบคทีเรีย เชื้อจะใช้สารประกอบ palmitate ในการเจริญเติบโต และปล่อย $^{14}CO_2$ ออกมา และเครื่องวัดจะแปลงค่าเป็นดัชนีการเติบโต (growth index : GI) ถ้าค่า GI > 10 แสดงว่ามีเชื้อ วิธีนี้ใช้เวลาประมาณ 12-18 วัน และสามารถจำแนกสปีชีส์ว่าใช่หรือไม่ใช่ *M. tuberculosis* complex นอกจากนี้ยังทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านวัณโรคได้ โดยจะทราบผลภายใน 1-2 สัปดาห์ ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้สารกัมมันตรังสี ปัจจุบันมีระบบอื่นที่ปลอดภัยกว่าเช่น BACTEC 9000 MB System, BACTEC MGIT 960 System, MB/Bac T System เป็นระบบการเพาะเชื้อวัณโรคคล้ายกับวิธีเดิม แต่ไม่ใช้สารกัมมันตรังสี

ข. การจำแนกชนิดของเชื้อวัณโรค และมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ

มีการพัฒนาการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อให้รวดเร็วเช่น

ข.1 NAP Test (Siddiqi *et al*., 1984) โดย การเติม NAP reagent (p-nitro-α-acetllamino-β-hydroxy-propiophenone) ลงในอาหารเพาะเชื้อ BACTEC 12B สารนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม Mycobacterium tuberculosis complex ออกจาก non-tuberculous mycobacteria

ข.2 การใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบติดฉลากด้วยสารรังสี หรือสารปลอดรังสี ตรวจหาสารพันธุ์กรรมของเชื้อวัณโรค เช่น ดีเอ็นเอ หรือ อาร์เอ็นเอ ซึ่งให้ผลรวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะสูง เมื่อทดสอบกับเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ แต่มีความไวต่ำถ้าตรวจจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง ที่นิยมใช้ได้แก่ Accu probe ของบริษัท Gen-Probe ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้ acridinium ester ซึ่งเป็นสารเคมีเรืองแสง เป็นตัวติดฉลาก (Musial *et al*., 1988 ; Goto *et al*., 1991) และ SNAP probe ของบริษัท Syngene ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase วิธี PCR/REA และ PCR/ELISA เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Perry,1993) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วตรวจดู band pattern หรือ ตรวจ PCR product โดยใช้ specific oligonucleotide probe (Patel *et al*.,1997)

นอกจากนี้แล้วยังมีวิธีอื่นๆเช่น high performance liquid chromatography (HPLC), thin layer chromatography (TLC), arbitrarily-primed PCR (AP-PCR), ligation-mediated PCR (LMPCR), variable number of tendem repeat (VNTR) typing เป็นต้น หลายวิธีอยู่ระหว่างศึกษาวิจัยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เพื่อหาความไว และความจำเพาะของการทดสอบ

1.2.2.4.5 การทดสอบยาต้านเชื้อวัณโรค (สมศักดิ์ เหรียญทอง, 2542)

การทดสอบการยาวัณโรคแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

ก. การทดสอบความไวต่อยาแบบตรง (Direct Drug Susceptibility Testing Method)

เป็นการทดสอบความไวต่อยารักษาวัณโรค โดยใช้เชื้อที่เพาะขึ้นจากเสมหะ หรือสิ่งส่งตรวจ (clinical specimens) หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาผสมอยู่ ควบคู่ไปกับขวดอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ไม่ผสมยาเป็นตัวควบคุม วิธีการทดสอบแบบตรงนี้มีข้อดี และข้อเสียดังนี้

ข้อดีของการทดสอบแบบตรง

- ให้ผลการทดสอบที่รวดเร็ว คือเมื่อผลเพาะเชื้อขึ้นก็จะได้ผลการทดสอบการต้านยาไปด้วย
- เป็นการทดสอบเชื้อที่ได้มาจากรอยโรคโดยตรง ผลที่ได้จึงน่าจะใกล้เคียงข้อเท็จจริงมากกว่าแบบ indirect

ข้อเสียหรือข้อจำกัดของการทดสอบแบบตรง

- ทำได้เฉพาะกรณีพบเชื้อในเสมหะ หรือสิ่งส่งตรวจจำนวนมากๆ และจำนวนเชื้อที่ขวดควบคุมควรมีมากพอ 50-100 โคโลนี หรือมากกว่า ถ้าน้อยกว่านี้ผลการทดสอบที่ได้ไม่น่าเชื่อถือ
- ไม่สามารถทำได้ในกรณีของคนไข้ที่ smear negative แต่การเพาะเชื้อเป็นบวกในภายหลัง
- มีการปนเปื้อนได้ง่ายทำให้แปลผลการทดสอบไม่ได้
- ควบคุมขนาด และความสม่ำเสมอของเชื้อที่ขึ้นได้ยาก

ข. การทดสอบความไวแบบโดยอ้อม (Indirect Drug Susceptibility Testing Method) (บัญญัติ ปริชญานนท์ และ คณะ,2542)

เป็นการทดสอบความไวของยาต่อเชื้อวัณโรค ที่เพาะเลี้ยงขึ้นมาก่อน และนำเชื้อที่เพาะขึ้นมาเตรียมเป็น inoculum สามารถทำการทดสอบได้กับเชื้อทุกสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงได้ วิธีนี้สามารถควบคุมคุณภาพของการทดสอบ โดยการควบคุมขนาด และความสม่ำเสมอของ inoculum

ข้อเสียของวิธีการทดสอบแบบโดยอ้อมคือ ใช้เวลานานกว่าวิธีโดยตรง และในกรณีที่เชื้อที่นำมาทดสอบไม่ดี อาจจะทำให้ผลการทดสอบไม่ตรงตามความจริงของเชื้อที่มีอยู่ในผู้ป่วย ดังนั้นการเตรียม inoculum จะต้องเลือกเขี่ยเชื้อจากหลายๆโคโลนี จะทำให้ได้เชื้อที่เป็นตัวแทนที่ดีมาทดสอบ การทดสอบแบบโดยอ้อมแบ่งเป็น 3 วิธี (Inderlied and Nash, 1996) คือ

ก. วิธี absolute concentration

ข. วิธี resistance ratio

ค. วิธี proportional

ก. วิธี absolute concentration

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มียา โดยให้ปริมาณเชื้อที่เพาะลงอาหารอยู่ระหว่าง 2,000 – 10,000 นิคม ถ้าหากมีนิคมของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารดังกล่าวเกินกว่า 20 นิคม แสดงว่าเชื้อมีการดื้อยา

ข. วิธี resistance ratio

หาระดับของยา ที่ต่ำที่สุดที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของวัณโรค (minimal inhibitory concentration) โดยใช้เชื้อจากผู้ป่วยเปรียบเทียบกับเชื้อวัณโรคมาตรฐาน H37Rv ถ้าสัดส่วนของยาต่ำสุดที่จะยับยั้งเชื้อของสายพันธุ์ที่ทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ H37Rv ไม่เกิน 2 แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทดสอบจะยังไวต่อยาอยู่ ข้อเสียของวิธีการทดสอบนี้คือจะต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและระดับยาหลายระดับ

ค. วิธี proportional

เพาะเชื้อปริมาณที่ทราบจำนวน (ประมาณ 300 นิคม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 หลอด) ลงในอาหารที่มียาและไม่มียาอยู่ เมื่อนิคมของเชื้อขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำการคำนวณหาสัดส่วนโดยนำจำนวนนิคมของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่มียา หารด้วยจำนวนนิคมของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารที่ไม่มียา ถ้าหากสัดส่วนดังกล่าวมากกว่าร้อยละ 1 จะแปลผลว่าเชื้อดื้อต่อยา

นอกจากนี้ยังมีวิธี radiometry (ใช้ BACTEC 460) ซึ่งสามารถทดสอบได้ทั้งจากตัวอย่างตรวจแบบตรง หรือแบบอ้อม และมีการตรวจหาจีนดื้อยา พบว่าการดื้อยาต่อ isoniazid เกิดจากจีน 2 ชนิด คือ kat G และ inh A จีนตัวแรกควบคุมการสร้างเอนไซม์ catalase-peroxidase ส่วนจีนตัวหลังควบคุมการสร้างกรดไขมัน เชื้อวัณโรคที่ดื้อยา isoniazid เกือบทั้งหมดจะมีการหาย (deletion) หรือ กลายพันธุ์ (mutation) ของ kat G และจำนวนหนึ่งจะมีการกลายพันธุ์ของจีน inh A สำหรับการดื้อยา rifampin พบว่าร้อยละ 97 มีการกลายพันธุ์ของจีน rpo B ที่ควบคุมการสร้าง subunit ของเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase

1.2.2.5 การศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรค

องค์การณ์อนามัยโลกได้ตระหนักถึงการระบาดของวัณโรค ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เป็นโรคเก่าแก่ที่คร่าชีวิตมนุษย์ ใน พ.ศ. 2534 องค์การอนามัยโลกได้ประมาณว่าประชากรโลกประมาณ 1,700 ล้านราย ติดเชื้อวัณโรค เกิดผู้ป่วยรายใหม่ประมาณ 8 ล้านรายต่อปี

และมีผู้เสียชีวิตจากวัณโรคปีละประมาณ 3 ล้านราย ใน พ.ศ. 2539 องค์การอนามัยโลกได้ประมาณว่า ประชากรที่ติดเชื้อเอชไอวีมีประมาณ 5.2 ล้านราย จากปัญหาที่มีการระบาดของเชื้อเอชไอวีเพิ่มขึ้นอย่างมาก

สำหรับประเทศไทยไม่มีบันทึกในประวัติศาสตร์ว่าวัณโรคเกิดขึ้นในยุคสมัยใด เข้าใจว่าวัณโรคระบาดในหมู่คนไทยตลอดมาทุกยุคทุกสมัย และเป็นโรคที่ทำให้ประชากรไทยเสียชีวิตมาก ในบรรดาโรคติดเชื้อ สถานการณ์ล่าสุด รวบรวมโดยคณะทำงานด้านวัณโรคของกระทรวงสาธารณสุข และองค์การอนามัยโลก พ.ศ. 2538 สรุปว่าในปี พ.ศ. 2537 มีรายงานผู้ป่วยรายใหม่ทั่วประเทศประมาณ 47,767 คน (อัตราป่วย 79 คนต่อประชากรแสนคน) ผู้ป่วยส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อก่อโรคในปริมาณมาก จึงคาดว่าจำนวนผู้ป่วยจริงจะมีมากกว่าที่รายงาน โดยจะมีจำนวนระหว่าง 75,000-100,000 คนต่อปี นอกจากนี้ได้ประเมินต่อไปอีกว่าในปี พ.ศ. 2543 จะมีมากกว่า 120,000 คนต่อปี โดยเป็นผู้ป่วยวัณโรคที่ติดเชื้อเอชไอวี ประมาณ 20,000 คน และผู้ป่วยมากกว่าครึ่งจะเป็นผู้ที่มีอายุอยู่ในวัยทำงาน จากการศึกษาแบบ prospective multicenter cohort study ของผู้ป่วย 1,130 คน (วินัย รัตนสุวรรณ และ สุรพล สุวรรณกูล, 2544) พบอัตราการเกิดวัณโรคในผู้ติดเชื้อเอชไอวีประมาณ 100 เท่าของการเกิดวัณโรคในประชากรทั่วไป อาการที่พบทั่วไปจะมี 2 ลักษณะคือ reactivation และ newly acquire infection แต่จากการศึกษาในต่างประเทศพบปริมาณผู้ติดเชื้อใกล้เคียงกัน ทั้ง 2 กลุ่ม และ ประมาณ 10-50% ของผู้ป่วยเอชไอวีจะเสียชีวิตเนื่องจากวัณโรค (เจริญ ชูโชติถาวร, 2542)

นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยวัณโรคในประชากรกลุ่มต่างๆคือ กลุ่มผู้สัมผัสโรค หมายถึงผู้ร่วมบ้านกับผู้ป่วย (ธีระ ชำนาญกิจ, 2530 ; สุจิตรา อังคศรีทองกุล, 2531 ; ทองพัน เทพสุวรรณ และ สุปนก รัตนดิลก ณ ภูเก็ต, 2533 ; เพชรวรรณ พึ่งรัศมี และคณะ, 2537) กลุ่มบุคคลากรโรงพยาบาลซึ่งประกอบด้วย แพทย์ พยาบาล ผู้ช่วยพยาบาล นักศึกษาแพทย์ เจ้าหน้าที่ชันสูตร (นรวีร์ จั่วแจ่มใส และคณะ, 2540 ; ศิริภัณฑ์ เจียรพงศ์ และคณะ, 2540 ; อาภรณ์ อุบลสะอาด และคณะ, 2540 ; ดวงเดือน วรสิงห์ และคณะ, 2540 ; ประคอง วรุตตมางกูร และคณะ, 2541) และกลุ่มผู้ต้องขังในเรือนจำ (นิมิต มงคล, 2533 ; ไพฑูรย์ มณีแสง และคณะ, 2537 ; มัณฑนา จิระกังวาน และคณะ, 2540)

ในประเทศฝรั่งเศสจากการศึกษาวัณโรคในผู้ต้องขัง ระหว่างปี พ.ศ. 2537-2538 พบว่า ผู้ต้องขังมีอัตราการติดเชื้อวัณโรคสูงกว่าประชากรทั่วไป และมีการถ่ายทอดเชื้อวัณโรคจากผู้ที่เป็นไปยังผู้ที่ไม่เป็น (Hanau – Bercot *et al*., 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาที่ประเทศมาดากัสการ์ ในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าวัณโรคในผู้ต้องขังสูงเป็น 16 เท่าของคนปกติ 9.5% ของผู้ต้องขังที่เป็น

วัณโรคเป็นแหล่งแพร่เชื้อ 15.1% เป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระหว่างถูกคุมขัง และ 37% เคยเป็นวัณโรคกลับเป็นซ้ำ (reactivation) (Rasolofo-Razanamparany *et al*., 2000) ต่อมาในปี 1996 เกิดการระบาดของวัณโรคในผู้ต้องขัง ประเทศสหรัฐอเมริกา พบผู้ต้องขังและผู้คุมติดเชื้อวัณโรค 35 คน และ 5 คน ตามลำดับ (Jones *et al*.., 1999) จากการประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อวัณโรคในผู้ต้องขังพบว่า ระยะเวลาที่อยู่ในเรือนจำ ความล่าช้าในการวินิจฉัยโรค การฉีดยาเสพติด และการติดเชื้อเอชไอวี มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อ (March *et al.,* 2000 ; Martin *et al.,*2000) ในประเทศไทยพบว่า อัตราผู้ต้องขังที่เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0% ในช่วงแรกที่เอชไอวีระบาด ปี พ.ศ. 2530 เป็น 19.7% ในปี พ.ศ. 2534 (Suwanagool *et al*., 1988 ; Nationnal HIV Sentinel Serosurveillance, 1991 ; Sretrirutchai *et al*., 2002) และพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะมีการติดเชื้อวัณโรคเพิ่มขึ้น (Ruxrungtham *et al*., 1996 ; Sathapatayavongs *et al*., 1999 ; Tansuphasawadikul *et al*., 1999 ; Sretrirutchai *et al*., 2002) ในประเทศไทยจากการสำรวจในปี พ.ศ. 2540 มีผู้ต้องขังทั่วประเทศทั้งหมด 138,367 คน (Lerwitworapong, 1997 ; Sretrirutchai *et al*., 2002) และปริมาณผู้ต้องขังมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ในขณะที่จำนวนห้องขังเท่าเดิม ทำให้มีความเป็นอยู่อย่างแออัด ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรคในผู้ต้องขังของประเทศไทย และ หาความสัมพันธ์กับผู้ต้องขังที่ติดเชื้อเอชไอวี

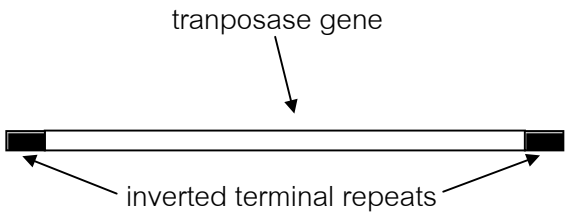
1.2.2.6 การศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรค ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1.2.2.6.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)

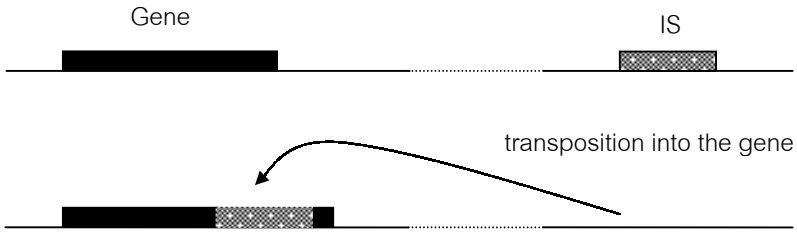
เป็นการศึกษาเพื่อหาความแตกต่างระหว่างเชื้อแต่ละสายพันธุ์ มีประโยชน์ในด้านระบาดวิทยา ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับแหล่งที่มาของเชื้อ วิธีการติดเชื้อ การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมีหลายวิธีเช่น ใช้ดีเอ็นเอสายสั้นๆ(primer) ไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซม (arbitrarily primed PCR) (Welsh and McClelland, 1990 ; Willinms, 1990) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ตรวจสอบด้วยตัวตรวจจับ (probe) ซึ่งอาจเป็นอาร์เอ็นเอ (ribotyping) หรือบางส่วนของดีเอ็นเอ (restriction fragment length polymorphism : RFLP) หรือตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาวิ่งในกระแสไฟฟ้าสลับ (pulsed-field gel electrophoresis) (Bannerman *et al*., 1995) การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วขยายและเพิ่มจำนวนแต่ละชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (amplified fragment polymorphism) อย่างไรก็ตาม ในการตรวจความแตกต่างของสายพันธุ์ *M. tuberculosis* วิธีที่นิยมคือ restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้ insertion sequence เป็นตัวตรวจจับ

1.2.2.6.2 Insertion sequences (IS)

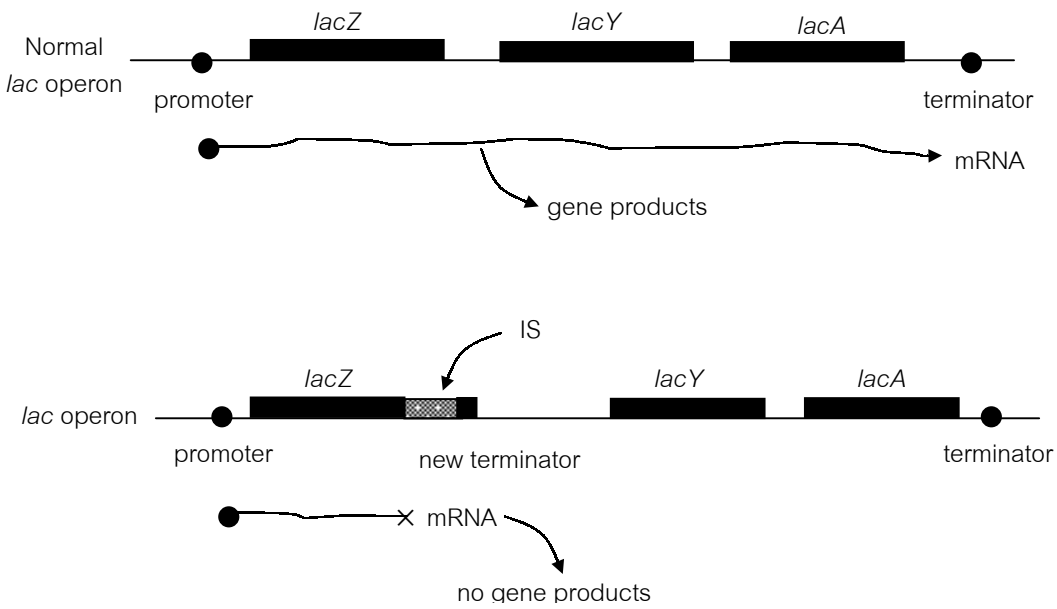
ในโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพวก Eucaryote หรือ Prokaryote จะพบส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนจากตำแหน่งเดิมในโครโมโซม และแทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่งใหม่ของโครโมโซมเดียวกัน หรือต่างกันเช่น พลาสมิด เรียกส่วนของดีเอ็นเอนี้ว่า transposon และขบวนการนี้เรียก transposition โดยมีเอนไซม์ transposase ช่วยในการสอดแทรก insertion sequence เป็นรูปแบบหนึ่งของ tranposon ถูกพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2504 (Starlinger, 1980 ; Cohen and Stapiro, 1980) โครงสร้างโดยทั่วไปของ insertion sequence จะเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มียีนซึ่งควบคุมการสร้างเอนไซม์ transposase และมี inverted terminal repeats อยู่ที่ปลายทั้งสองข้าง (ภาพประกอบ 1.1) ใน Procaryote ขณะที่ดีเอ็นเอแบ่งตัว และเกิด transposition จะพบ insertion sequences เพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด ในตำแหน่งใหม่ อย่างไรก็ตามบางครั้ง insertion sequences จะถูกตัดจากตำแหน่งเดิมในโครโมโซม หรือ พลาสมิด แล้วแทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่งใหม่ โดยไม่มีการเพิ่มจำนวนได้ insertion sequence ที่แทรกเข้าอยู่ในยีนใด จะทำให้การทำงานของยีนนั้นเสียไป (ภาพประกอบ 1.2) หรือขัดขวางการแสดงออกของยีนที่อยู่ถัดมาใน operon (ภาพประกอบ 1.3) และแม้ insertion sequence จะเคลื่อนออกจากยีนอยู่ในตำแหน่งใหม่ ก็ยังคงให้การทำงานของยีนนั้นเสียไป เนื่องจากยังคงมีบางส่วนหลงเหลืออยู่ (ภาพประกอบ 1.4) insertion sequence ส่วนใหญ่พบใน Procaryote และมีหลาย family แตกต่างกันไป (ตาราง 1.1) ซึ่งแต่ละ family ก็มีคุณสมบัติจำเพาะต่างกันเช่น ควบคุมพันธุกรรม (genetic organization) บอกความแตกต่างของสายพันธุ์ (host range) และเกี่ยวข้องกับการเกิด transposition



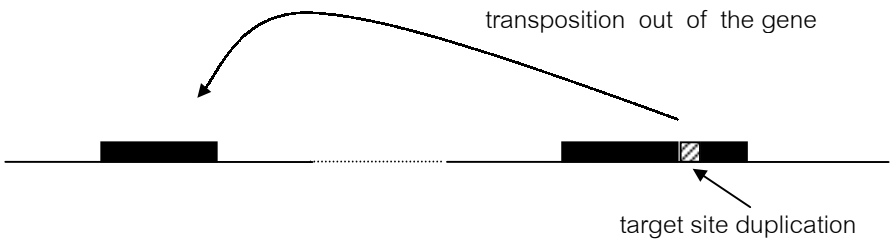
ภาพประกอบ 1.1 โครงสร้าง insertion sequence



ภาพประกอบ 1.2 transposition ของ IS ทำให้เกิด mutation



ภาพประกอบ 1.3 IS ขัดขวางการแสดงออกของจีนที่อยู่ถัดมาใน operon



ภาพประกอบ 1.4 IS ออกจากจีนไปอยู่ตำแหน่งใหม่

ตาราง 1.2 Insertion sequence ของเชื้อ *E. coli*

Insertion sequence	Length (kb)	Flanking repeat (bp)	Target site duplication (bp)
IS*1*	768	23	9
IS*2*	1327	41	5
IS*4*	1428	18	11
IS*5*	1195	16	4
IS*10*	1329	22	9
IS*50*	1531	9	9

ในการเกิด transposition และมี insertion sequence เพิ่มขึ้น 1 ชุด (copy) ทำให้พบส่วนของดีเอ็นเอที่ซ้ำกัน (repetitive sequences) ในจีโนมของแบคทีเรียเช่น พบ IS *1* ในโครโมโซมของ *S. sonnei* 30 ชุด ใน *E. coli* 9 ชุด เป็นต้น ในจีนัส Mycobacterium พบ repetitive sequences หลายชนิดเช่น พบ IS*900* 1 ชุด ใน *M. leprae* และ พบ 15 -20 ชุด ใน *M. paratuberculosis* นอกจากนี้ยังพบ IS*901* ในบางสายพันธุ์ของ *M. avium* พบ IS*986* ใน *M. tuberculosis* และพบ IS*6110* ซึ่ง identical กับ IS*986* ใน *M. tuberculosis* ส่วน *M. bovis* BCG พบ IS*987* 1 ชุด ซึ่ง identical กับ IS*986* (Dale,1995) ในจีโนมของเชื้อมัยโคแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมี insertion sequence และจำนวน copy แตกต่างกัน (ตาราง 1.2) ซึ่งจะมีประโยชน์ในการวินิจฉัย และศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อวัณโรค

ตาราง 1.2 ตัวอย่าง insertion sequence ของเชื้อมัยโคแบคทีเรีย (Collins *et al.,* 1997)

Sequence	Origin	Number of copies
IS*6110* (IS*986*)	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

1.2.2.6.3 การใช้ insertion sequence ในการวินิจฉัยโรคและระบาดวิทยา

จากการศึกษาพบว่า insertion sequence มีหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบหลายชุด และอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน ในจีโนมของแบคทีเรีย ทำให้นำมาใช้เป็นประโยชน์ในการบ่งชี้สปีชีส์หรือวินิจฉัยโรคได้

ในอดีตการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ *M. tuberculosis* ใช้วิธี phage typing ซึ่งมีไม่กี่ type ทำให้บางสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอยู่ใน type เดียวกัน นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเสียเวลา ปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) มาใช้ ที่นิยมกันมากคือ RFLP โดยใช้ IS*6110* เป็นตัวตรวจจับ (McAdam *et al.,* 1990. ; Thierry *et al.,* 1990a ; Thierry *et al.,* 1990b) IS*6110* มีขนาด 1,355 bp พบใน Mycobacterium tuberculosis complex

M. tuberculosis ที่ต่างสายพันธุ์กัน จะให้ RFLP pattern ต่างกันเมื่อ hybridize ด้วย IS*6110* (Eisenach *et al.,* 1988 ; Zainuddin *et al.,* 1989) ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยาของวัณโรค เนื่องจากแม้ว่าจะถ่าย *M. tuberculosis* เข้าสัตว์ทดลองไปหลายๆครั้ง หรือเหนี่ยวนำให้เกิด drug resistance รูปแบบของ RFLP ก็ไม่เปลี่ยนแปลง (Herman, 1990 ; Soolingen *et al.,* 1991a) เชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกจากคนๆเดียว ในช่วง 1 ปี หรือหลายปีต่อมาก็ยังคงมี DNA pattern เหมือนเดิม (Soolingen *et al.,* 1991a ; Otal *et al.,* 1991 ; Cave *et al.,* 1994.) เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยก่อน และหลังดื้อยา ก็ให้แบบแผนเดียวกัน (Godfrey-Faussett *et al.,* 1993) จากการศึกษา RFLP ของเชื้อ *M. tuberculosis* หลายประเทศพบว่า เชื้อที่แยกจากประเทศอาฟริกา และยุโรป มี 5-15 copies แต่จากฮ่องกงมีหลาย copies (Das *et al.*, 1993) 30% ของเชื้อที่แยกจากประเทศอินเดียพบ 1 copy (single copy) และ 40% ของเชื้อที่แยกจาก Madras พบ 1 copy หรือไม่พบเลย (Das *et al.,* 1995) ในขณะที่เชื้อที่แยกจากประเทศเวียดนาม 41 สายพันธุ์ พบ 5 สายพันธุ์ เป็น single copy และ 4 สายพันธุ์ ไม่มี insertion sequence (Yuen *et al.,* 1993) เช่นเดียวกับ เชื้อที่แยกจากประเทศมาเลเซีย แทนซาเนีย และโอมาน พบเป็นแบบ single copy (Fomukong *et al.,* 1994) ที่น่าสนใจคือเชื้อที่แยกจาก แทนซาเนีย และเดนมาร์ก เป็นเชื้อที่ได้จากคนไข้ซึ่งมีพื้นเพจากเอเชีย (Yang *et al.,* 1995) และเชื้อส่วนใหญ่ที่เป็น single copy จะพบ IS อยู่บนส่วนของ 1.5 kb. *Pvu* II fragment

การศึกษาเชื้อวัณโรคที่แยกจากประเทศจีนพบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน ซึ่งประกอบด้วย 15-20 copies ของ IS*6110* เรียกว่า สายพันธุ์ปักกิ่ง (Beijing family) (Soolingen *et al.,* 1995) สายพันธุ์นี้ตรวจพบได้ที่ประเทศ มาเลเซีย เกาหลีใต้ และ

ประเทศไทย เช่นกัน ในขณะที่พบได้น้อยในประเทศ หรือทวีปอื่น สำหรับประเทศไทย นอกจากจะพบสายพันธุ์วัณโรคแบบสายพันธุ์ปักกิ่ง แล้วยังพบสายพันธุ์วัณโรคกลุ่มหนึ่งที่ประกอบด้วย 11-15 copies ของ IS*6110* และแตกต่างจากสายพันธุ์ปักกิ่ง เรียกสายพันธุ์กลุ่มนี้ว่า สายพันธุ์นนทบุรี (Nonthaburii group) (Pallittapongarnpim *et al*., 1997) ส่วนสายพันธุ์อื่นที่เหลือจะเป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่มี IS*6110* เพียงชุดเดียว (single copy) และ กลุ่มสายพันธุ์ที่ไม่สามารถจัดเป็นหมวดหมู่ได้ (hetrogeneous group) (Pallittapongarnpim *et al*., 1997)

ดังนั้นการทดสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค จึงเป็นลักษณะของสารพันธุกรรมเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยวัณโรคที่อยู่ในเขตพื้นที่ภูมิศาสตร์ของโลกที่แตกต่างกันมาเปรียบเทียบ เพื่อติดตามการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคแต่ละสายพันธุ์ ทำให้ทราบถึงแหล่งหรือต้นตอการแพร่ระบาดของเชื้อ และบอกถึงคุณสมบัติพิเศษของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยว่ามีความสามารถในการก่อโรคสูง หรือมีความรุนแรงของโรคสูง หรือเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยาหลายขนาน เป็นต้น