ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

นางสาวพรวิมล ลี้ทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PREVALENCE OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND MYCOPLASMA PNEUMONIAE IN ADULTS WITH PROLONGED COUGH

Miss Pornvimol Leethong

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง
โดย	นางสาวพรวิมล ลี้ทอง
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ โศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุชัย สุเทพารักษ์)

……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(พันเอก นายแพทย์ อดิศร วงษา)

พรวิมล ลี้ทอง : ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิใน ผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง (PREVALENCE OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND MYCOPLASMA PNEUMONIAE IN ADULTS WITH PROLONGED COUGH) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ศ.นพ. ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร,67 หน้า.

ที่มา : ภาวะปอดอักเสบพบเป็นปัญหาสำคัญ ทำให้เกิดภาวะพิการและเสียชีวิต ได้ทั่วโลก โดยสาเหตุที่พบบ่อยเกิดจากเชื้อ *M. pneumoniae* และเชื้อ *C. pneumoniae* โดยมักมีอาการและอาการแสดงที่ไม่จำเพาะ อาจพบเพียงอาการไอเรื้อรัง ในประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษาถึงความชุกในการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของการติดเชื้อทั้งสองชนิดในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

วิธีการศึกษา : ผู้ป่วยที่มีอายุมากกว่า 18 ปี ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้รับการทำ nasopharyngeal swab เพื่อส่งตรวจด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (PCR) และตรวจเลือดเพื่อส่งตรวจวิธีทางซีโรโลยีเพื่อหาเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* รวมทั้งการเก็บข้อมูลทั่วไป

ผลการศึกษา : ทำการศึกษาในช่วงเดือน มิถุนายน 2554 ถึง กุมภาพันธ์ 2555 มีผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งหมด 100 คน พบว่าผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษามีอายุเฉลี่ย 58.26±15.95 ปี (28-87 ปี) มีระยะเวลาของการไอเฉลี่ย 30.78±23.99 วัน (14-120 วัน) โดยมีผู้ป่วย 6 รายและ 4 รายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ตามลำดับจากวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุลและวิธีทางซีโรโลยี โดยมีอัตราความชุกอยู่ที่ร้อยละ 6 และร้อยละ 4 ตามลำดับ

สรุปผลการศึกษา : ในผู้ป่วยผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังในประเทศไทยมีโอกาสติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ได้ ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงการติดเชื้อนี้ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

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

สาขาวิชา.....อายุรศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก……...

ปีการศึกษา.....2554.....

5374649230 : MAJOR MEDICINE
KEYWORDS : CHLAMYDIA PNEUMONIAE, MYCOPLASMA PNEUMONIAE, PROLONGED COUGH
PORNVIMOL LEETHONG : PREVALENCE OF CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND MYCOPLASMA PNEUMONIAE IN ADULTS WITH PROLONGED COUGH. ADVISOR : PROFESSOR TERAPONG TANTAWICHIEN, M.D. 67pp.

Background : Pneumonia is an important cause of morbidity and mortality in all population worldwide. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* are the two most common atypical pathogens. The clinical course slow progression and have no specific symptoms. In Thailand, prevalence of *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* in adult with prolonged cough is not well established. This study aimed to evaluate the prevalence of two pathogens in adult with prolonged cough.

Methods : We enrolled patients, 18 years old or older, with persisting cough more than 2 weeks at King Chulalongkorn Memorial Hospital. Nasopharyngeal swabs were taken for detection of nucleic acid by polymerase chain reaction and serology of *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* . Other baseline characteristics were collected.

Results : 100 patients were recruited between June 2011 and February 2012. The participants had mean age of 58.26±15.95 years (28-87 years) and had mean prolonged-cough duration of 30.78±23.99 days (14-120 days). 6 patients had evidence of *C. pneumoniae* and 4 patients were diagnosed *M. pneumoniae*. The prevalence of *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* in adults with prolonged cough in Thailand from this study were 6% and 4%, respectively.

Conclusions : In Thailand, *C. pneumoniae* and *M. pneumoniae* could be found in adult with prolonged cough so that physicians should increase awareness.

Department :.....Medicine..... Student's Signature……
Field of Study :.....Medicine..... Advisor's Signature……
Academic Year :.....2011.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงสมความมุ่งหมาย

สาขาวิชาโรคติดเชื้อ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
- แพทย์หญิง นิรดา ศิริยากร เอื้อเฟื้อจัดหาผู้ป่วยเข้าโครงการวิจัย
- นางสาว เกษิณี อรุณยิ่งมงคล เอื้อเฟื้อในการส่งสิ่งส่งตรวจ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- รองศาสตราจารย์ดอกเตอร์ จินตนา จิรถาวร เอื้อเฟื้อตรวจ serology for *M. pneumoniae*
- นาง รัชดา อินทร์วัฒนา เอื้อเฟื้อตรวจ serology for *M. pneumoniae*
- อาจารย์ดอกเตอร์ ธนิษฐา ฉัตรสุวรรณ เอื้อเฟื้อตรวจ serology for *C. pneumoniae*
- นางสาว อุบลรัตน์ ริเริ่ม เอื้อเฟื้อตรวจ serology for *C. pneumoniae*

ฝ่ายบักเตรีทั่วไป กลุ่มงานบักเตรีทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

- นายอนุศักดิ์ เกิดสิน เอื้อเฟื้อตรวจ PCR for *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*
- นางสาวเสาวลักษณ์ ศรีภักดี เอื้อเฟื้อตรวจ PCR for *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*

ฝ่ายการพยาบาล โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เอื้อเฟื้อการปฏิบัติงานที่ห้องตรวจผู้ป่วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
สารบัญแผนภูมิ..... ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 คำถามการวิจัย..... 6
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 6
1.4 สมมติฐาน..... 6
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย..... 7
1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ..... 8
1.7 ปัญหาทางจริยธรรม..... 9
1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 9
1.9 ขอบเขตการวิจัย..... 9
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 23
3.1 รูปแบบการวิจัย..... 23
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย..... 23
3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย..... 24
3.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง..... 24
3.5 การดำเนินการวิจัย..... 25
3.6 การรวบรวมข้อมูล..... 25

หน้า

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 27
บทที่ 5 อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ..... 34
รายการอ้างอิง..... 39
ภาคผนวก..... 46
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 67

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 แสดงถึงอาการแสดงนอกปอดที่เกิดจากเชื้อ *M. pneumoniae* 3
ตารางที่ 1.2 แสดงถึงอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในคนที่ไม่มีอาการแสดงทางระบบหายใจตั้งแต่ ค.ศ.1994-1999 ในประเทศญี่ปุ่น..... 5
ตารางที่ 2.1 แสดงถึงวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae*.....18
ตารางที่ 2.2 แสดงถึงวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae*.....19
ตารางที่ 4.1 แสดงถึง baseline characteristics ของผู้ป่วย 100 รายที่เข้าร่วมการศึกษา..... 28
ตารางที่ 4.2 แสดงถึงผลการศึกษาของผู้เข้าร่วมการศึกษาที่ติดเชื้อ *M. pneumoniae*… …..31
ตารางที่ 4.3 แสดงถึงผลการศึกษาของผู้เข้าร่วมการศึกษาที่ติดเชื้อ *C. pneumoniae*……..32

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย..... 7
ภาพที่ 1.2 แสดงขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัยอย่างย่อ..... 8

สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 1.1 แสดงถึงอัตราการตรวจพบเชื้อ *M.pneumoniae* ในผู้ใหญ่และเด็กที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจในประเทศจีน ตั้งแต่ปี ค.ศ.2004-2005..... 2

แผนภูมิที่ 1.2 แสดงถึงจำนวนผู้ป่วยที่เกิดปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อ *M.pneumoniae* ในประเทศจีน ตั้งแต่ปี ค.ศ.1988-2004 2

แผนภูมิที่ 4.1 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 100 ราย แยกตามอายุ..... 30

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ACEI	angiotensin coverting enzyme inhibitor
CAP	community acquired pneumonia
Ct	threshold cycle
EB	elementary body
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GPA	gel particle agglutination
IFN	interferon
IgA	immunoglobulin A
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M
IL	interleukine
MIF	microimmunofluoresense
PAP	primary atypical pneumonia
PCR	polymerase chain reaction
RB	reticulate body
Tm	melting temperature
TWAR	Taiwan acute respiratory strain

บทที่ 1

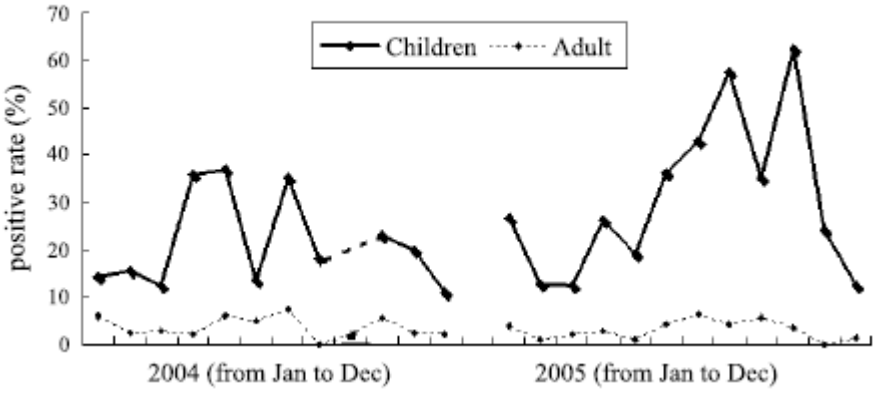
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย(Background and Rationale)

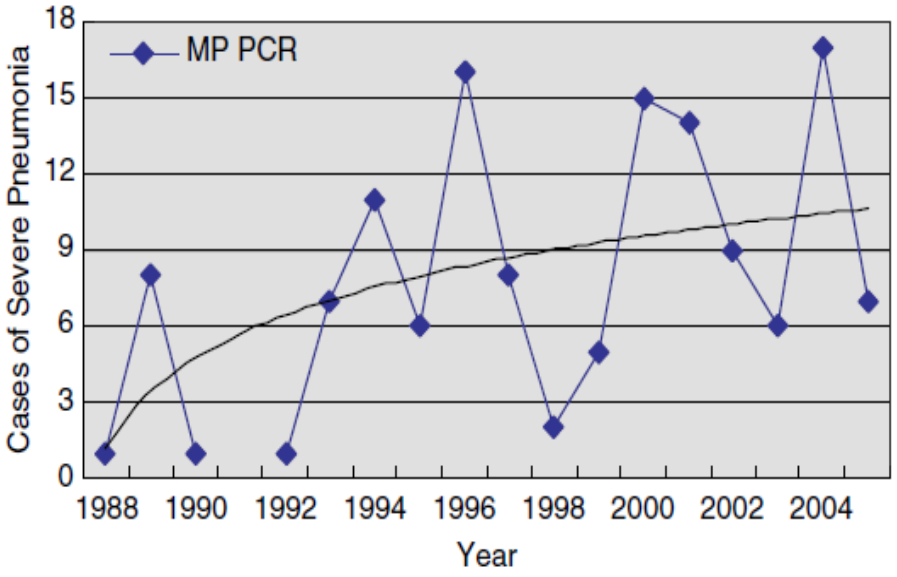
ภาวะปอดอักเสบพบเป็นปัญหาสำคัญและเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะพิการและเสียชีวิตในเด็กและวัยรุ่นทั่วโลก [1] พบว่าอัตราชุกพบเพิ่มมากขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนา [2] โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดปอดอักเสบที่พบบ่อยเกิดจากเชื้อมัยโคพลาสมานิวโมนิอิ (*Mycoplasma pneumoniae*) และเชื้อคลามิเดียมิวโมนิอิ (*Chlamydia pneumoniae*) โดยลักษณะทางคลินิกของการติดเชื้อแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยการติดเชื้อทั้ง *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* นั้นมักค่อยเป็นค่อยไปและส่วนใหญ่ไม่ค่อยมีอาการที่จำเพาะ [3-6] และลักษณะที่พบจากเอ็กซเรย์ทรวงอกอาจไม่สัมพันธ์กับอาการและอาการแสดงทางคลินิก พบว่า *M. pneumoniae* พบเป็นจุลชีพที่เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการเกิดภาวะปอดอักเสบจากชุมชนในเด็กและ *C. pneumoniae* พบเป็นสาเหตุรองลงมา

เชื้อ *M. pneumoniae* เป็นเชื้อจุลชีพที่พบเป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบจากชุมชนในเด็กและผู้ใหญ่บ่อยที่สุด [7] จากการศึกษาพบว่าภาวะปอดอักเสบที่เกิดจาก *M. pneumoniae* ในเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปีพบร้อยละ 1.5-25 และเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปีพบร้อยละ 3-22 แต่พบในผู้ใหญ่ในอัตราที่ต่ำกว่า [แผนภูมิที่ 1.1] แต่จะพบสูงขึ้นในผู้ใหญ่ที่มีอายุมากกว่า 65 ปี [8] โดยอัตราชุกของเชื้อ *M. pneumoniae* มักพบแตกต่างกันขึ้นกับประชากรและวิธีการวินิจฉัย [9,10] ในประเทศไทยอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* พบประมาณร้อยละ 6-40 แต่พบว่ามีเพียงร้อยละ 3-10 ของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* เท่านั้นที่เกิดเป็นโรคปอดอักเสบ และอาจทำให้เกิดโรคปอดที่รุนแรงได้ [11] [แผนภูมิที่ 1.2] ปัจจุบันพบว่าเชื้อนี้พบมากขึ้นในผู้สูงอายุ โดยการติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสบุคคลไปยังบุคคลและสามารถติดต่อแพร่กระจายได้รวดเร็วในสถานที่เช่น โรงเรียน บริษัท และสถานสงเคราะห์ เป็นต้น โดยระยะฟักตัวใช้เวลาหลายวันจนถึงหลายสัปดาห์ โดยอาการมักไม่จำเพาะ เช่นพบมีปวดศีรษะ ไข้ต่ำๆ ไอ เจ็บคอ ปวดเมื่อยตามตัว โดยอาการไอมักเป็นไอแห้งและเป็นพักๆและอาการส่วนมากเป็นตอนกลางคืน ปอดอักเสบที่เกิดจาก *M. pneumoniae* อาการมักไม่รุนแรงและสามารถหายได้เอง (self-limited) อัตราตายพบประมาณร้อยละ 1.4

แผนภูมิที่ 1.1 แสดงถึงอัตราการตรวจพบเชื้อ *M. pneumoniae* ในผู้ใหญ่และเด็กที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจ ในประเทศจีน ตั้งแต่ปี ค.ศ.2004-2005 [8]



แผนภูมิที่ 1.2 แสดงถึงจำนวนผู้ป่วยที่เกิดปอดอักเสบรุนแรงจากเชื้อ *M. pneumoniae* ในประเทศจีน ตั้งแต่ปี ค.ศ.1988-2004 [11]



ส่วนอาการนอกปอดที่พบ ได้แก่อาการทางระบบประสาท [12] เช่นภาวะเยื่อหุ้มสมองอักเสบแบบปลอดเชื้อ (aseptic meningitis) และภาวะสมองอักเสบ (encephalitis), central ataxia, Guillain-Barre syndrome และ transverse myelitis เป็นต้น อย่างไรก็ตามอาจพบภาวะแทรกซ้อน เช่น ลมรั่วในช่องปอด น้ำในช่องปอด หนองในปอดและภาวะหายใจวายฉับพลัน (respiratory distress syndrome) ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis), ตับอ่อนอักเสบและข้ออักเสบ [ตารางที่ 1.1] เป็นต้น

ตารางที่ 1.1 แสดงถึงอาการแสดงนอกปอดที่เกิดจากเชื้อ *M. pneumoniae*

Neurological manifestations	Aseptic meningitis
	Meningo encephalitis
	Cerebro vascular accidents
	Hemiplegia
	Transeverse myelitis, ascending paralysis
	Cranial nerve palsy, cerebellar atxia
	Optic neuritis, polyradiculopathy
	Peripheral neuropathy
	Guillain-Barr'e syndrome
Musculoskeletal	Arthralgias myalgias
	Septic arthritis,
	Polyarthritis
	Acute rhabdomyolysis
Hematological	Hemolytic anemia
	Thrombotic thrombocytopenia purpura
	Intravascular coagulation
	Hemophagocytic syndrome
Cardiovascular	Pericarditis, myocarditis
	Endocarditis, CCF
	Pericardial effusion
	Raynaud's phenomenon
Dermatological	Skin rashes
	Stevens-Johnson syndrome
	Erythemanodosum
	Bullous erythem a multiforme
Gastrointestinal	Diarrhea, pancreatitis
	Cholestatic hepatitis
	Hypoechoic lesions in spleen
Renal	Acute glomerulonephritis, IgA nephropathy
	Tubulointerstitial nephritis, renal failure

การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเพาะเชื้อ การตรวจทางซีโรโลยี (serology) และวิธีทาง PCR วิธีเพาะเชื้อเป็นวิธีที่ยุ่งยาก วิธีทางซีโรโลยีจะเก็บตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วย 2 ครั้งห่างกัน 2-3 สัปดาห์เพื่อเปรียบเทียบค่า Immunoglobulin M (IgM) ของทั้งสองครั้ง [13] ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจพบเชื้อเมื่อมีการติดเชื้อเพียง 1-2 วัน [14] ส่วนวิธี PCR ส่งตรวจจากสารคัดหลั่งในร่างกายเป็นวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ได้เร็วที่สุด แต่มีข้อจำกัดคือเป็นการวินิจฉัยที่มีราคาแพงและยังไม่ได้ส่งทำเป็นประจำในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ [15] การเพาะเชื้อเพื่อวินิจฉัย *M. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจมักต้องใช้เวลานานประมาณ 4-5 สัปดาห์ และมีความไวต่ำเมื่อเทียบกับการวินิจฉัยทางซีโรโลยีซึ่งเป็นการวินิจฉัยที่ทำกันทั่วไปและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน ความไวของการวินิจฉัย *M. pneumoniae* จากวิธี PCR มีความไวร้อยละ 78 และมีความจำเพาะร้อยละ 97

ส่วนเชื้อ *C. pneumoniae* หรือทวาร์ (TWAR) [16] เป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตในการเจริญเติบโตและสามารถก่อโรคทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังได้ การติดเชื้อเรื้อรังและการติดเชื้อกลับเป็นซ้ำจากเชื้อ *C. pneumoniae* ที่ระบบทางเดินหายใจในวัยหนุ่มสาวอาจทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังเมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุได้

C. pneumoniae ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจซึ่งพบบ่อยในเด็กและวัยรุ่นและเป็นสาเหตุรองจากการติดเชื้อ *M. pneumoniae* การติดเชื้อ *C. pneumoniae* ทำให้เกิดภาวะหลอดอักเสบและปอดอักเสบ ส่วนใหญ่มักไม่มีอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบมีความสัมพันธ์กับโรคเรื้อรัง [17] ได้แก่ โรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง โรคหอบหืด โรคหลอดเลือดแดงแข็งและโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ การติดเชื้อ *C. pneumoniae* ครั้งแรกจะทำให้เชื้อนั้นสามารถคงอยู่ในร่างกายได้ตลอดชีวิต โดยตำแหน่งที่เกิดพยาธิสภาพจากเชื้อนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเรื้อรังโดยมีหลักฐานพิสูจน์ยืนยันค่อนข้างชัดเจน คือโรคหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดแดงแข็ง [18] โดยเชื้อจะเจริญแบ่งตัวได้ในเซลล์แมคโครฟาจ และเข้าไปในกระแสเลือดติดอยู่ตามผนังของหลอดเลือดได้นานเป็นปี ส่งผลให้เกิดการอักเสบซึ่งเป็นการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อนั้น จะพบมีพยาธิสภาพที่เห็นลักษณะเป็นแผ่นหรือเป็นจุดบริเวณนั้น เป็นผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงตีบหรือตันและอาจเกิดภาวะหัวใจวายตามมาได้ นอกจากนี้ยังพบเป็นสาเหตุของหลอดเลือดสมอง และเมื่อเชื้อนี้อยู่ในปอดเชื่อว่าสัมพันธ์กับการเกิดการกำเริบของโรคหอบหืด [19] และจากการศึกษาพบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อนี้จะมีอัตราสูงขึ้นในผู้ป่วยหอบหืดหรือถุงลมอุดกั้น สำหรับการติดต่อของ *C. pnemoniae* สามารถติดต่อได้โดยเชื้อจะเข้าทางระบบทางเดินหายใจและพบมีระยะฟักตัวนาน 7-21 วัน เชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่ในบรรยากาศหรือในฝุ่นละอองได้นานถึง 12 ชั่วโมง และถ้าเชื้อที่ติดอยู่ตามผิวหนังของร่างกายและมือจะมีชีวิตสั้นลงโดยสามารถมีชีวิตอยู่ได้เพียง

5 นาที การติดเชื้อ *C. pneumoniae* สามารถติดเชื้อได้ตั้งแต่วัยเด็ก พบบ่อยในเด็กวัยเรียน และอุบัติการณ์จะสูงขึ้นตามอายุจนถึงวัยเจริญพันธุ์ โดยพบว่าผู้ใหญ่ส่วนใหญ่พบมีการติดเชื้อมาแล้วถึงร้อยละ 50 ส่วนในผู้สูงอายุพบมีอัตราการติดเชื้อแล้วประมาณร้อยละ 75

พบว่าอัตราชุกของคนที่มีร่างกายแข็งแรงที่ไม่มีอาการแสดงของทางระบบทางเดินหายใจสามารถตรวจพบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ได้ร้อยละ 0.5-3.5 [ตารางที่ 1.2]

ตารางที่ 1.2 แสดงถึงอัตราชุกการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในคนที่ไม่มีอาการแสดงทางระบบทางเดินหายใจ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1994-1999 ในประเทศญี่ปุ่น [20]

Year	Specimens Tested, No.	Positive Results, No. (%)
1994	141	1 (0.7)
1995	179	2 (1.1)
1996	167	3 (1.8)
1997	153	0 (0)
1998	193	2 (1.0)
1999	185	6 (3.2)

ในปัจจุบันมีการตรวจหาการติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ได้จากการเพาะเชื้อ การตรวจทางชีวโมเลกุล (PCR) และวิธีซีโรโลยี การเพาะเชื้อโดยการส่งตรวจจากสารคัดหลั่งจากบริเวณคอหอยและเสมหะ เป็นวิธีที่ยุ่งยากและไม่ได้ทำเป็นประจำมีเฉพาะห้องปฏิบัติการสำหรับเพื่อการวิจัย ส่วนวิธี PCR และวิธีซีโรโลยีมีความไวมากกว่าการเพาะเชื้อและยังไม่สามารถทำให้ห้องปฏิบัติการทั่วไป การวินิจฉัยการติดเชื้อต้องอาศัยอาการทางคลินิกร่วมกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้อง

การติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจ และยังพบว่าคนส่วนใหญ่อาจเคยติดเชื้อนี้มาก่อนตั้งแต่เป็นวัยเด็ก ทำให้เกิดการกำเริบของโรคในระบบทางเดินหายใจ และอาจเกิดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเรื้อรัง ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ ดังนั้นการปฏิบัติตัวให้มีสุขภาพที่แข็งแรง เป็นวิธีป้องกันที่ดีที่สุดที่ลดภาวะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเรื้อรังในอนาคต

1.2 **คำถามการวิจัย** (Research Question)

ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์มีโอกาสตรวจพบการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิบ่อยแค่ไหน

1.3 **วัตถุประสงค์ของการวิจัย** (Objective)

1.3.1 **วัตถุประสงค์หลัก**

ศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิ ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

1.3.2 **วัตถุประสงค์รอง**

1.3.2.1. เพื่อศึกษาคุณลักษณะ อาการและอาการแสดงร่วมอื่นๆของผู้ที่อาการไอเรื้อรังที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ

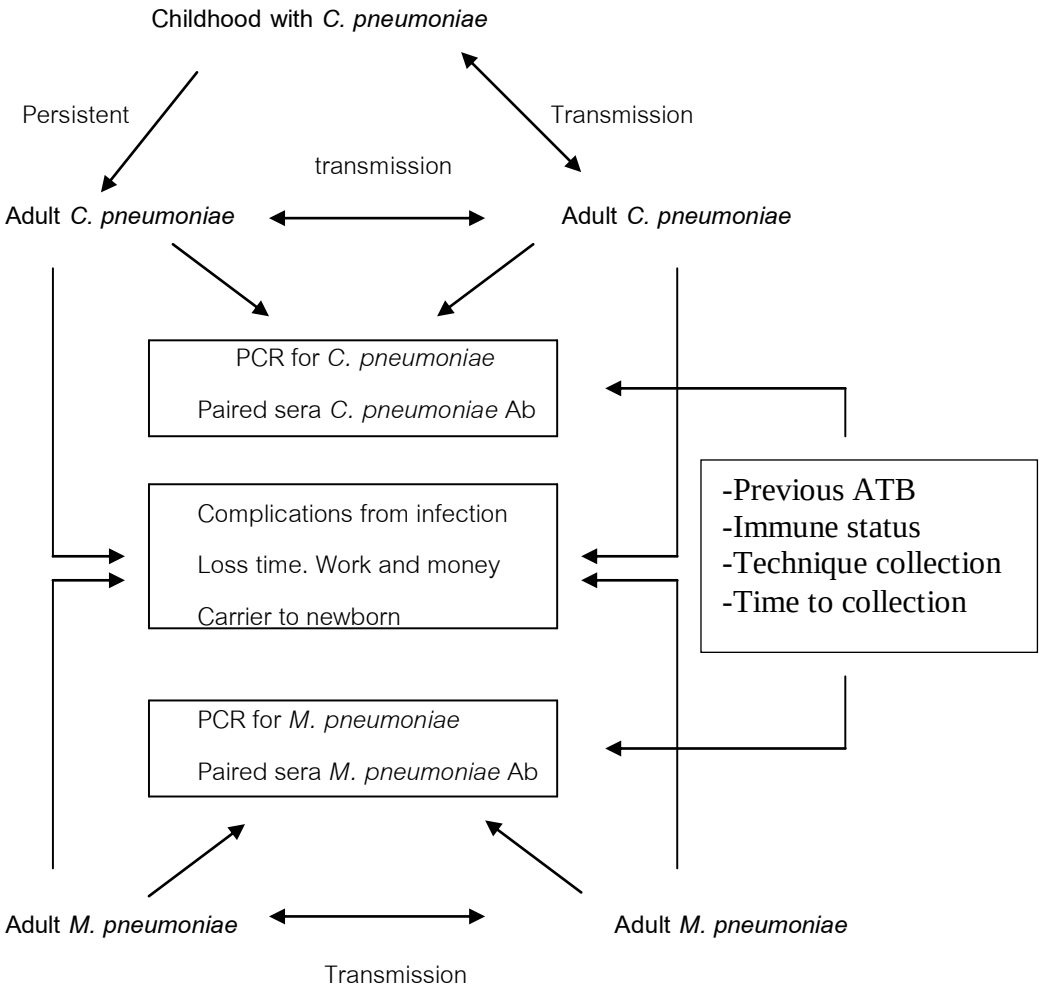
1.3.2.2. เปรียบเทียบอัตราความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังในแต่ละช่วงอายุ

1.4 **สมมติฐาน** (Hypothesis)

มีการตรวจพบการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

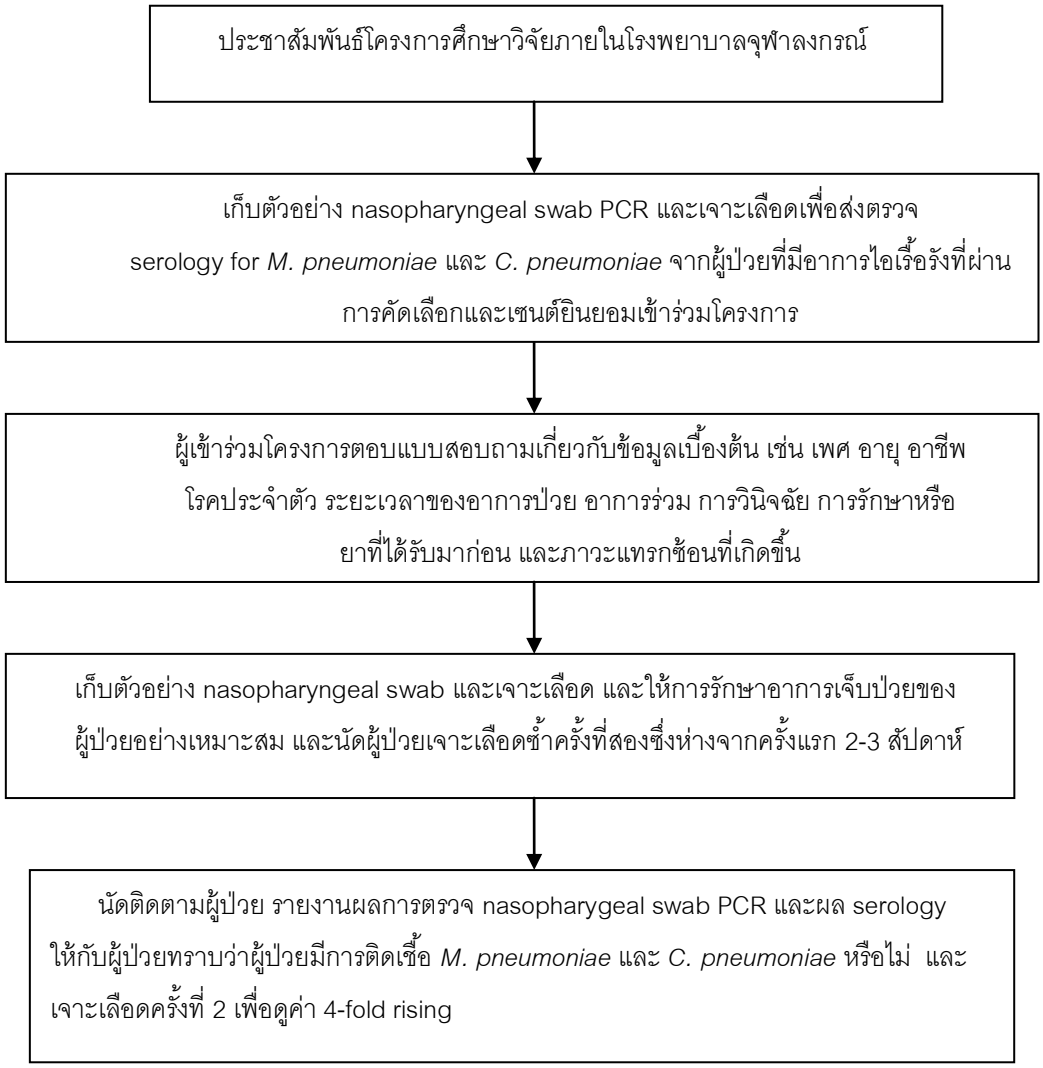
1.5 **กรอบแนวความคิดในการวิจัย** (Conceptual Framework)

รูปที่ 1.1 แสดงกรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.6 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

รูปที่ 1.2 แสดงขั้นตอนวิธีดำเนินการวิจัยอย่างย่อ



1.7 **ปัญหาทางจริยธรรม** (Ethical Considerations)

- Respect of person (**หลักความเคารพในบุคคล**)

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย จะได้รับการชี้แจงถึงวัตถุประสงค์ของการทำวิจัยนี้โดยให้เอกสารข้อมูลและเปิดโอกาสให้ซักถามอย่างอิสระ และได้ชี้แจงภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดจากการตรวจ nasopharyngeal swab และ การเจาะเลือด โดยผู้เข้าร่วมมีสิทธิที่จะถอนตัวจากโครงการวิจัยได้ หากยินยอมเข้าร่วมการวิจัย จะให้ผู้ที่เข้าร่วมโครงการวิจัยเซ็นชื่อ หรือประทับลายนิ้วมือเพื่อยืนยันการตัดสินใจของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย โดยมีพยานรู้เห็นร่วมลงนามด้วย และข้อมูลของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะถูกเก็บไว้เป็นความลับ เอกสารจะเก็บในแฟ้มข้อมูล ซึ่งเฉพาะผู้วิจัยและผู้ร่วมวิจัยที่จะเข้าถึงข้อมูลได้

- Beneficence (**หลักการให้คุณประโยชน์**)

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการสัมภาษณ์และตรวจร่างกายอย่างละเอียด เพื่อหาสาเหตุของอาการไอเรื้อรัง และได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาเป็นไปตามหลักเกณฑ์แห่งวิชาชีพแพทย์อย่างถูกต้องและเหมาะสม หากผู้วิจัยพบความผิดปกติเพิ่มเติม จะรีบให้การรักษา และปรึกษาแพทย์เชี่ยวชาญเฉพาะด้านอย่างรวดเร็วและถูกต้อง

-Justice(**หลักความยุติธรรม**)

ผู้ป่วยที่ตรงตามเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษาทุกรายจะได้รับการเสนอให้เข้าร่วมการวิจัยนี้ ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะได้รับการอธิบายอย่างชัดเจนว่า การเข้าร่วมหรือปฏิเสธการเข้าร่วมการวิจัย หรือการขอถอนตัวในภายหลังจะไม่มีผลกระทบต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยแต่อย่างใด

1.8 **ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย** (Expected benefits and application)

ได้ทราบอัตราความชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรัง เพื่อเป็นองค์ความรู้และข้อมูลในเชิงระบาดวิทยา เพื่อดำเนินการป้องกันการเกิดโรค เนื่องจากเป็นโรคติดเชื้อที่สามารถป้องกัน

1.9 **ขอบเขตการวิจัย**

ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีประชากรเป้าหมาย (target population) คือประชากรทั่วไปที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะพื้นฐานของเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae*

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae*

- เชื้อ *M. pneumoniae* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1938 โดย Reiman [21] ซึ่งได้อธิบายถึงการเกิดปอดอักเสบโดยเชื้อที่ไม่ทราบชนิด แต่มีลักษณะทางคลินิกที่สำคัญคือทำให้เกิดอาการทางระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อที่ทำให้เกิดปอดอักเสบชนิด นิวโมค็อกคอล (pneumococcal) ซึ่งต่อมาเรียกเชื้อชนิดนี้ว่า primary atypical pneumonia (PAP) และในปี ค.ศ.1940 Eaton และคณะ [22] ได้แยกเชื้อชนิดนี้เป็น *Mycoplasma pneumoniae* ซึ่งเป็นจุลชีพที่ไม่มีผนังเซลล์ มีแต่เยื่อหุ้มเซลล์ที่มีเสตอรอล *Mycoplasma* ไม่สามารถสร้างสารประกอบ เช่น กรดมิวรามิค และกรดไดอะมิโนพิเมิลลิค ซึ่งเป็นกรดที่นำมาใช้สร้างผนังเซลล์ มีขนาดเล็กมากประมาณ 0.2-1.0 ไมโครเมตร นับเป็นจุลชีพที่มีขนาดเล็กที่สุดที่สามารถดำรงชีวิตและแบ่งตัวได้เองโดยไม่ต้องอาศัยเซลล์อื่น นอกจากนี้ในปี ค.ศ.1943 Peterson ได้ค้นพบว่าเชื้อชนิดทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า cold agglutination ซึ่งเป็นความจำเพาะของเชื้อชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Mycoplasma* เป็นเชื้อที่มี self-replication ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้นอกเซลล์ของสิ่งมีชีวิต [23]

- เชื้อ *C. pneumoniae* หรือทวาร์ (TWAR หมายถึง Taiwan acute respiratory strain) เป็นจุลชีพก่อโรคขนาดเล็กที่ดำรงชีพอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จัดเป็น obligate intracellular bacteria ซึ่งเดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่มไวรัส แต่เพราะนิวเคลียสประกอบด้วย DNA และ RNA มี ribosomes สามารถสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิคได้เอง จึงถูกจัดในกลุ่มแบคทีเรีย มีผนังเซลล์สองชั้นคล้ายแบคทีเรียแกรมลบ แม้จะสังเคราะห์สารในขบวนการ metabolismได้เองแต่ไม่สามารถสร้าง ATP ได้ ต้องอาศัยพลังงานจาก host cells จึงไม่สามารถอยู่อย่างอิสระภายนอกเซลล์ [24] ดังนั้นในการเพาะแยกเชื้อจุลชีพนี้จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงใน cell culture ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปได้ [25]

ทวาร์มาจากชื่อสายพันธุ์ TW-183 และ AR-39 ซึ่ง Grayston เป็นผู้ค้นพบโดยการเพาะเชื้อจากเยื่อบุตาของเด็กที่เป็นริดสีดวงตาที่ประเทศไต้หวัน ในปี ค.ศ.1965 และสามารถเพาะจากระบบทางเดินหายใจของนักศึกษาในเมืองซีอาเติล ประเทศสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ1983 [26] และในปี ค.ศ.1998 Everett ได้จำแนกฟิโลเจเนติก (phylogenetic) ใช้ข้อมูลยีน 16S rRNA และ 23S rRNA และได้จัดตระกูล (family) Chlamydiaceae เป็น 2 สกุล โดย *C. pneumoniae* และ *C. psittaci* อยู่ในสกุลคลามิเดียฟิลลา (Chlamydophila) ส่วน *C. trachomatis* อยู่ในสกุลคลามิเดียเช่นเดิม [27]

2.1.2 กลไกการเกิดโรค (Pathogenesis)

- กลไกการติดเชื้อหรือทำให้เกิดโรคปอดอักเสบจากเชื้อ *M. pneumoniae* ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 4 ขั้นตอน ได้แก่

(1) **Adherence** เป็นขั้นตอนที่เชื้อเข้าไปเกาะติด (attachment) กับเยื่อบุทางเดินหายใจ และทำให้เกิดการทำลายบริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจโดยเชื้อจะปล่อย toxic substance เช่น hydrogenperoxide และ superoxide radicles ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์

(2) **Evasion of host defenses** เป็นขั้นตอนที่มีการบุกรุกเข้าระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย และร่างกายจะมีกระบวนการอักเสบเพื่อต้านกับ toxic substance ที่เชื้อปล่อยออกมา โดยที่เซลล์เยื่อบุหลอดลมของ host ที่เกิดการอักเสบจะมีการปล่อย cytokine และ interleukine (IL)-8 ออกมาเพื่อตอบสนองต่อกระบวนการที่เกิดขึ้น [28]

(3) **Local damage** ขั้นตอนนี้เชื้อจะเข้าไปทำลายปอดและเกิดการตอบสนองโดยมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ชนิด lymphocyte (lymphocyte proliferation) [29] และมีการผลิต immunoglobulin และปล่อยสาร tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) และ interferon-gamma (IFN-γ) ออกมาเกิดเป็นปอดอักเสบเกิดขึ้น

(4) **Systemic manifestations** เกิดจากการที่ภูมิคุ้มกันในร่างกายถูกกระตุ้น ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่แสดงความรุนแรงของโรคเกิดขึ้น

- กลไกการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อ *C. pneumoniae*

เชื้อ *Chlamydia* มีรูปร่างกลมไม่เคลื่อนที่ มีโครงสร้าง 2 ชนิดคือ elementary body (EB) และ reticulate body (RB) โดยที่ EB เป็นระยะติดต่อเข้าไปอยู่ในเซลล์เยื่อบุทางเดินหายใจโดยวิธี phagocytosis และอยู่ใน phagosome EB จะมีการเปลี่ยนรูปร่างและโครงสร้างเป็นเซลล์ RB มีการแบ่งตัวแบบ binary fission ทำให้มีจำนวนมาก ซึ่งเกิดขึ้นภายใน membrane-bound vacuole เป็น inclusion มีขนาดใหญ่ RB ที่แบ่งตัวแล้ว บางส่วนได้เปลี่ยนแปลงเป็น EB ดังนั้นภายใน inclusion จึงประกอบด้วย RB และ EB ชนิดที่อยู่ในระหว่างการเปลี่ยนแปลง เรียกว่า intermediate form

ผนังของ inclusion มีขนาดใหญ่เต็มที่หลังจากการเพาะเลี้ยง 38-48 ชั่วโมง จะพบ EB เป็นจำนวนมากสุด [30] เมื่อเกิดการติดเชื้อผนังเซลล์ของโฮสต์จะแตกและปล่อยเชื้อ *Chlamydia* ออกมานอกเซลล์ และจะเข้าสู่เซลล์ใหม่ต่อไป

C. pneumoniae ติดต่อจากคนสู่คนทางระบบทางเดินหายใจ โดยสูดเอาละอองฝอยที่ปนเปื้อนจากน้ำมูกหรือน้ำลายของผู้ป่วย *C. pneumoniae* มีชีวิตในละอองที่อุณหภูมิที่มีความชื้นหรือในกระดาษชำระได้นานเป็นวัน จึงทำให้สามารถติดต่อโดยการสัมผัสโดยตรง ระยะฟักตัว 2-3 สัปดาห์

2.1.3 ระบาดวิทยาโดยรวม

- ระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *M. pneumoniae*

การระบาดของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* จะเกิดการระบาดได้ทุก 4-5 ปี และเกิดได้ทั่วโลก ติดต่อได้ง่ายจากการไอ พบได้มากจากเด็กนักเรียนอายุ 5-25 ปี ในค่ายทหาร และสถานเลี้ยงเด็กกลางวัน [31] ในประเทศไทยมีผู้รายงานผู้ป่วยเป็นรายแรกในปี พ.ศ.2518 และรวมพบเป็นผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 16 ราย ได้มีการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อ พ.ศ.2523 ณ ศูนย์อพยพชาวกัมพูชาค่ายพญากัมพุช จังหวัดจันทบุรี พบผู้ป่วยจำนวน 72 ราย โรคนี้มักจะเป็นร่วมกับผู้ที่เป็นโรคหลอดลมเรื้อรัง หรือผู้ที่เป็นโรคหอบหืด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบอัตราชุกของการเกิดปอดอักเสบจากเชื้อ *M. pneumoniae* อยู่ระหว่างร้อยละ 1.9 ถึง 30 และพบมากที่สุดในช่วงอายุ 4-7 ปี [32] พบการระบาดส่วนใหญ่ในกลุ่มคนที่อยู่รวมกันเป็นจำนวนมากเช่น โรงเรียน สถานสงเคราะห์ค่ายทหาร เป็นต้น [33] โดยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* พบสัมพันธ์กับอายุ โดยพบมากสุดในช่วงอายุ 4-9 ปี (4 per 1000 per year) รองลงมาคืออายุ 10-14 ปี (3 per 1000 per year)

- ระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *C. pneumoniae*

ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ *C. pneumoniae* เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิด Community Acquired Pneumonia (CAP) ร้อยละ 16.3 ในผู้ป่วยใน และร้อยละ 36.7 ในผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาล 3 แห่งในกรุงเทพมหานคร โดยพบมากที่สุดในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า5 ปีที่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ [34] พบมีการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการหลอดลมอักเสบ และในประเทศสหรัฐอเมริกามีรายงานพบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ที่เป็นผู้ป่วยใหม่ 200,000 รายต่อปี ส่วนใหญ่เป็นวัยรุ่น [35] นอกจากนี้ยังพบว่าร้อยละ 50 ของประชากรมีแอนติบอดีจำเพาะต่อ *C. pneumoniae* พบมีการติดเชื้อมากในนักเรียนประจำและทหาร ไม่มีสัตว์เป็นรังโรคของเชื้อชนิดนี้

2.2 อาการและอาการแสดงของการติดเชื้อ (Clinical Manifestation)

2.2.1 อาการและอาการแสดงของการติดเชื้อ *M. pneumoniae*

M. pneumoniae ทำให้เกิดโรคทางระบบทางเดินหายใจ คือปอดบวม (pneumonia) หลอดลมคอ และหลอดลมอักเสบ (tracheobronchitis) และคอหอยอักเสบ (pharyngitis) อาการของปอดบวมจะมีระยะฟักตัวประมาณ 1-3 สัปดาห์ อาการจะค่อยๆเกิด โดยร่างกายมีอาการอ่อนเพลีย ไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ เจ็บคอ ไอ จะเป็นอยู่หลายสัปดาห์ อาจเป็น 4-6 สัปดาห์ ถึงแม้จะไม่มีโรคแทรกซ้อน ตอนแรกอาการไอจะไม่ค่อยมาก ต่อมาจะมีอาการรุนแรงขึ้น [36] อาจมีเสมหะมีเลือดปน หรือมีหนองและเจ็บบริเวณหน้าอก ถ้าเป็นรุนแรงมากมักเกิดโรคแทรกซ้อนกับระบบประสาทส่วนกลาง เช่นเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ รากประสาทโดยเฉพาะประสาทไขสันหลังอักเสบ หรือเกิดโรคแทรกซ้อนกับระบบอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ระบบผิวหนังและเยื่อเมือก ระบบกล้ามเนื้อและข้อ เป็นต้น

ส่วนอาการของหลอดลมคอ และหลอดลมปอดอักเสบ ซึ่งเป็นโรคที่เกิดขึ้นได้เสมอเมื่อมีการติดเชื้อชนิดนี้ โดยมีอาการคล้ายปอดบวม โรคนี้เริ่มโดยการอักเสบของหลอดลมปอด และอาจเกิดโรคแทรกคือ โรคหลอดลมคออักเสบ มีไข้ ปวดศีรษะ เจ็บคอ เกิด pharyngeal exudate และต่อมน้ำเหลืองที่คออักเสบ [36] ส่วนอาการคอหอยอักเสบจาก *M. pneumoniae* ไม่แตกต่างจากคอหอยอักเสบที่เกิดจากเชื้อ group A streptococci, Epstein-Barr virus หรือไวรัสชนิดอื่นๆ ในระบบทางเดินหายใจส่วนบน

2.2.2 อาการและอาการแสดงของการติดเชื้อ *C. pneumoniae*

C. pneumoniae เป็นสาเหตุของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ bronchitis pharyngitis และ atypical pneumonia ผู้ป่วยมักมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ไอเรื้อรัง ส่วนใหญ่อาการไม่รุนแรงมากนัก [37] มักเริ่มด้วยอาการคออักเสบ ไอเรื้อรังและตามด้วยหลอดลมอักเสบหรือปอดบวม น้ำท่วมปอดพบได้ในรายที่มีอาการรุนแรง และอาจเสียชีวิตได้ในกรณีที่มีโรคอื่นแทรกซ้อน เช่นผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น [38] มีรายงานการติดเชื้อนอกระบบทางเดินหายใจเช่น เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ลิ้นหัวใจอักเสบ [39] นอกจากนี้ยังพบมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของหลอดเลือด เช่น coronary heart disease, atherosclerosis, asthma, sarcoidosis และ Alzheimer จากการตรวจทางพยาธิวิทยาและสารพันธุกรรมพบว่ามีเชื้อ *C. pneumoniae* อยู่ในหลอดเลือดของผู้ป่วยที่มี atherosclerosis 68% ของผู้ป่วยที่เป็น acute myocardial infarction และพบ 50% ในผู้ป่วย coronary heart disease ที่เคยติดเชื้อ *C. pneumoniae* [40] นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์กับโรค Alzheimer โดยผู้ป่วย 90% ตรวจพบสารพันธุกรรมของ *C. pneumoniae* ในเนื้อเยื่อสมอง

2.3 ภาวะแทรกซ้อน (Complications)

2.3.1 เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ (Respiratory)

- การติดเชื้อต่อระบบทางเดินหายใจของทั้ง *M. pneumoniae* ตอนแรกอาการไอจะไม่ค่อยมาก ต่อมาจะมีอาการรุนแรงขึ้น อาจมีเสมหะมีเลือดปน (hemoptysis) หรือมีหนอง (purulent sputum) และเจ็บบริเวณหน้าอก (pluritic chest pain) อาจพบมีลมรั่วในปอด (pneumothorax) หรือปอดอักเสบ (pneumonia) ได้

- การติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในเด็กพบว่าอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจแบบเรื้อรังได้ ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับการทำงานที่ผิดปกติของ cilia และ epithelium cell ที่อยู่ในหลอดลม โดยในปัจจุบันพบว่าการเกิดโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการที่เคยติดเชื้อ *C. pneumoniae* มาก่อน [41] จากการศึกษาพบว่า *C. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียที่ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตในการเจริญเติบโตและสามารถก่อให้เกิดโรคทางเดินหายใจแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังได้ การติดเชื้อเรื้อรังและการติดเชื้อกลับเป็นซ้ำจาก *C. pneumoniae* ของระบบทางเดินหายใจในวัยหนุ่มสาว [42] อาจทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังเมื่อเข้าสูงวัยสูงอายุได้

2.3.2 ไม่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ (Nonrespiratory)

- พบว่าการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ถ้าเป็นรุนแรงมากมักพบอาการแทรกซ้อนที่เกี่ยวกับระบบประสาทส่วนกลาง เช่นเกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ สมองอักเสบ เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ รากประสาทโดยเฉพาะประสาทไขสันหลังอักเสบ หรือเกิดโรคแทรกซ้อนกับระบบอื่นๆ ในร่างกาย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ระบบผิวหนังและเยื่อเมือก ระบบกล้ามเนื้อและข้อ [43] เป็นต้น

2.4 การวินิจฉัยการติดเชื้อ (Diagnosis)

2.4.1 การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Investigations)

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนี้ ประกอบด้วย การเพาะเชื้อ (culture) การตรวจหาชิ้นส่วนของตัวเชื้อ (direct antigen detection) ซึ่งประกอบด้วย วิธี PCR และการตรวจทางเซรุ่ม (serologic demonstration) เพื่อตรวจดูระดับภูมิคุ้มกันในร่างกายด้วย เช่น วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) วิธี agglutination และวิธี microimmunofluorescence (MIF) [ตารางที่ 2.1 และ 2.2]

2.4.1.1 การเพาะเชื้อ (Culture)

- การเพาะเชื้อ *M. pneumoniae* ให้ได้ผลดีนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องตั้งแต่ การเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่ถูกต้อง การขนส่งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไปยังห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสม และวิธีขั้นตอนการเพาะเชื้อที่ถูกต้อง แต่วิธีการเพาะเชื้อมักต้องใช้เวลานานประมาณ 4-5 สัปดาห์และมีความไวต่ำ

- การเพาะเชื้อ *C. pneumoniae* เป็นวิธีการทำที่ยุ่งยาก จะต้องนำสิ่งส่งตรวจมาใส่ใน transport media ชนิดซูโครสฟอสเฟต และแช่ในกระติกน้ำแข็งระหว่างการนำส่งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส การเพาะเชื้อ *C. pneumoniae* ทำได้ยากต้องมีการถ่ายซ้ำ [44] (subpassage) 2 ครั้งเนื่องจากสิ่งส่งตรวจมีเชื้อจำนวนน้อย ในประเทศไทยไม่มีการเพาะเชื้อที่ทำเป็นงานประจำจากสิ่งส่งตรวจ ส่วนใหญ่วิธีนี้ทำอยู่ในงานวิจัยเท่านั้น

-วิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจ (Specimen Collection)

เนื่องจากเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* จะพบอยู่บริเวณเยื่อบุผิวทางเดินหายใจทั้งส่วนบนและส่วนล่าง ดังนั้นการส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อเพาะเชื้อทั้งสองชนิดนี้ จึงควรจะเก็บให้ได้จากบริเวณผิวของเยื่อบุทางเดินหายใจ (ciliated epithelial cells) ไม่ควรเก็บจากบริเวณลำคอ (throat) หรือ จมูก (anterior nose) ดังนั้นวิธีการเก็บที่เหมาะสมจึงมี 2 วิธี คือ nasopharyngeal swab และ nasopharyngeal aspiration ซึ่งในเด็กเล็กนั้น การทำ nasopharyngeal wash นั้นก็พอยอมรับได้ ถึงแม้อาจมีการเจือจางของเชื้อไป [45] ข้อควรระวังในการทำ nasopharyngeal swab นั้นคือ อาจทำให้ผู้ป่วยเจ็บหรือรำคาญได้ จึงอาจทำให้ได้สิ่งส่งตรวจมาปริมาณไม่เพียงพอ และการที่ส่วนปลายของไม้ไม่โดนเยื่อบุผิวทางเดินหายใจก็อาจเป็นสาเหตุให้ผลเพาะเชื้อเป็นลบได้

2.4.1.2 การตรวจทางชีวโมเลกุล (PCR)

การตรวจด้วยวิธี PCR นั้นทำให้การวินิจฉัยโรคทำได้รวดเร็วมากขึ้น แต่หลักสำคัญในการที่จะนำ PCR มาใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อจะประสบความสำเร็จนั้นเกี่ยวข้องกับการเก็บสิ่งส่งตรวจอย่างถูกต้อง และ กระบวนการขั้นตอนในการทำ PCR (DNA purification, primer selection and amplification conditions, detection specificity of the amplified product และ internal and external positive และ negative control) [44-45]

สำหรับเชื้อ *M. pneumoniae* ความไวของการวินิจฉัยการติดเชื้อชนิดนี้โดยวิธี PCR มีความไวร้อยละ 78 และมีความจำเพาะร้อยละ 97 และสำหรับเชื้อ *C. pneumoniae* การตรวจโดยวิธี PCR สามารถทำในห้องปฏิบัติการอ้างอิงเท่านั้น และในปัจจุบันยังไม่มีการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้ใช้เป็นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae* แต่โดยทั่วไปถือว่ามีความไวและความจำเพาะอยู่ระหว่างร้อยละ 53 และร้อยละ 100 จากการศึกษาพบว่าข้อดี

ของวิธี PCR จะมีความไวมากกว่าการเพาะเชื้อร้อยละ 25 ทั้งนี้เนื่องจากการนำส่งและการแช่แข็งก่อนนำมาเพาะเชื้อทำให้เชื้อส่วนหนึ่งตายไปก่อน นอกจากนี้วิธี PCR ยังมีข้อดีอีกได้แก่สามารถนำวิธีตรวจได้จากทั้งสิ่งตรวจเนื้อเยื่อและจากตัวอย่างในพาราฟินของทางพยาธิวิทยา [46] มีการนำวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ (real time PCR) มาใช้ตรวจหา *C. pneumoniae* จากสิ่งตรวจ แต่ก็ยังต้องมีการศึกษาต่อไปก่อนที่จะนำมาใช้ในงานประจำ

2.4.1.3 **การตรวจทางซีโรโลยี** (Serology)

- การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* โดยการวินิจฉัยทางซีโรโลยี ซึ่งมีการตรวจโดยวิธี cold agglutinin และ serum complement fixation และโดยวิธีทาง ELISA โดยวิธี cold agglutinins เป็นวิธีที่ไม่มีความจำเพาะเนื่องจากระดับภูมิคุ้มกันที่สามารถตรวจพบต้องใช้ระยะเวลานานหลายสัปดาห์ วิธีที่นิยมกันได้แก่วิธี serum complement fixation , gel partical agglutination และวิธีทาง ELISA การวินิจฉัยที่เรียกว่าเป็น definite diagnosis criteria คือการที่มี four-fold increase ของระดับภูมิคุ้มกัน เมื่อมีการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน IgM ครั้งแรกและครั้งที่สองซึ่งห่างจากครั้งแรก อย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ ส่วนถ้าตรวจพบระดับภูมิคุ้มกัน IgM ครั้งแรก มากกว่า 1:16 โดยวิธี ELISA หรือตรวจหาระดับ titer มากกว่า 1:160 โดยวิธี gel particle agglutination หรือตรวจพบระดับภูมิคุ้มกัน IgG ครั้งแรกมากกว่า 1:64 โดยวิธี serum complement fixation จัดเป็นการวินิจฉัยชนิด possible diagnostic criteria

- สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae* โดยวิธีทางซีโรโลยี การติดเชื้อครั้งแรกจะเป็นการหาแอนติบอดีย์ชนิด IgM ซึ่งแสดงถึงกำลังมีการติดเชื้อคลามัยเดีย โดยจะตรวจพบว่ามีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM ขึ้นที่ประมาณสัปดาห์ที่ 3-6 หลังการติดเชื้อ ส่วนแอนติบอดีย์ชนิด IgG จะเริ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 6-8 ส่วนในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำจะมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG จะสูงขึ้นเร็วภายในสัปดาห์ที่ 1-2 หลังการติดเชื้อ และมักไม่พบแอนติบอดีย์ชนิด IgM สำหรับการตรวจทางซีโรโลยีเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae* วิธีที่เป็นมาตรฐานได้แก่วิธีที่เรียกว่า microimmunofluoresense (MIF) [47] วิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องการความชำนาญในการตรวจ มีขั้นตอนยุ่งยากและต้องมีการควบคุมมาตรฐาน สำหรับการแปลผลจะดูผลจากการตรวจซีรั่ม 2 ตัวอย่างห่างกัน 4-8 สัปดาห์ ผลของซีรั่มตัวอย่างเดียวในผู้ป่วยสูงอายุและผู้ที่ติดเชื้อเรื้อรัง อาจมีแอนติบอดีย์ชนิด IgG เท่านั้น วิธีการตรวจโดยวิธีนี้สามารถทำในห้องปฏิบัติการมาตรฐานเท่านั้น ได้แก่ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลรามาธิบดี และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สำหรับการแปลผลการตรวจแอนติบอดีย์ด้วยวิธี MIF นั้น ถ้ามีการเพิ่มระดับแอนติบอดีย์มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าในการตรวจซีรั่ม 2 ตัวอย่างห่างกัน 2-4 สัปดาห์เรียกว่าเป็น

definite diagnostic criteria แต่ถ้าผู้ป่วยกำลังมีการติดเชื้อในปัจจุบันจะมีแอนติบอดีย์ชนิด IgM มากกว่าหรือเท่ากับ 1:16 หรือชนิด IgG มากกว่าหรือเท่ากับ 1:512 เรียกว่าเป็น possible diagnostic criteria อย่างไรก็ตามการแปลผลการตรวจดังกล่าวต้องอาศัยลักษณะทางคลินิกประกอบด้วย เนื่องจากการใช้ระดับแอนติบอดีย์ IgM หรือ IgG ที่มากกว่าหรือเท่ากับจุดกำหนด (cut-off point) พบว่ามีโอกาสเกิดผลบวกลวง (false positive) ในอัตราสูง เมื่อเทียบกับการที่มีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG สูงขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่าในการตรวจซีรั่ม 2 ตัวอย่างห่างกัน 2-4 สัปดาห์ สำหรับผู้ที่เคยได้รับเชื้อมาก่อนพบมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG อยู่ระหว่าง 1:16 แต่ไม่เกิน 512

ตารางที่ 2.1 แสดงถึงวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* [8]

Test	Specimen	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Comments
Culture	NP swab, sputum bronchial washing, tissue	>90	50-90	-Not routinely available, slow growing organism (7-10 days for preliminary growth), - need DNA probe for speciation
PCR	Throat or NP swab sputum, bronchial washing, tissue	>95	>90	- Not commercially available, available from reference and research laboratory
Serology	Gel particle agglutination (GPA Serum Complement fixation; ELISA	70 95	70 95	- Non-specific, takes several week to develop - Paired acute-convalenscent sera preferred (take 2-8 week for seroconversion) **Diagnostic criteria** **Definite**: 4-fold increase in titer **Possible**: IgG≥64 (complement fixation) Excess 1 :160 (GPA) IgM≥16 (ELISA)

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงวิธีวินิจฉัยการติดเชื้อ *Chlamydia pneumoniae* [44,46]

Test	Specimen	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Comments
Culture	NP swab, sputum bronchial washing, pleural fluid	50-90	?	Requires tissue culture, not widely available, require several day incubation
PCR	Throat or NP swab sputum, bronchial washing, pleural fluid, tissue	> 95	> 90	No FDA approved kits, available from reference and research laboratory
Serology	Serum microimmuno-fluorescence (MIF), IgM and IgG	95	95	Paired acute and convalenscent preferred **Diagnostic criteria** **Definite**: 4-fold rise MIF antibody **Possible**: IgG≥512 IgM≥16

2.5 การศึกษาระบาดวิทยาในประเทศไทย

- อัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* พบประมาณร้อยละ 6-40 แต่พบว่ามีเพียงร้อยละ 3-10 ของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* เท่านั้นที่เกิดเป็นโรคปอดอักเสบ [48] ปัจจุบันพบว่าเชื้อนี้พบมากขึ้นในผู้สูงอายุ

- ในประเทศไทยมีการศึกษาการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในเด็กนักเรียนพบว่าเด็กที่มีอาการของระบบทางเดินหายใจ มีการตรวจพบแอนติบอดีย์ประมาณร้อยละ 4 และพบว่าเคยมีการติดเชื้อมาก่อนถึงร้อยละ 29-35 และยังมีการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์ที่ไม่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจพบว่าแสดงว่าเคยมีการติดเชื้อในอดีตโดยตรวจพบมีแอนติบอดีย์ต่อ *C. pneumoniae* ในอัตราร้อยละ 45 นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในปี พ.ศ.2542 เพื่อยืนยันว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคปอดบวมทั้งในเด็กและในผู้ใหญ่ รวมทั้งความสำคัญของการเกิดโรคหอบหืดกำเริบและวามสัมพันธ์ของสาเหตุโรคหลอดเลือดแดง โดยผู้สูงอายุมีการติดเชื้อแล้วถึงร้อยละ 70-75 [49] การศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* มีความแตกต่างกันแต่ละการศึกษา จากการศึกษาของนวลจันทร์และคณะในปี 2546 [50] พบว่าอัตราชุกของ *C. pneumoniae* ร้อยละ 3.4 ซึ่งพบมากสุดในเด็กอายุมากกว่า 5 ปี ซึ่งส่วนใหญ่ลักษณะทางคลินิกจะไม่พบภาวะหายใจลำบาก และมักพบการตรวจทางรังสีวิทยาเป็นลักษณะ lobar consolidation และจากการศึกษาของสนทนาและคณะ [51] ในปี 2547 พบว่า *C. pneumoniae* สามารถทำให้เกิดโรคทางเดินหายใจทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง การติดเชื้อแบบเรื้อรังและการกลับเป็นซ้ำพบได้มากขึ้นในผู้สูงอายุ พบว่าอัตราชุกและอุบัติการณ์ของการเกิดแอนติบอดี้ต่อ *C. pneumoniae* ในผู้สูงอายุที่เป็นโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังจำนวน 127 ราย เทียบกับกลุ่มควบคุมจำนวน 131 รายโดยการหา antibody IgM และ antibody IgG ต่อ *C. pneumoniae* ด้วยวิธีทาง ELISA ผลการศึกษาพบความชุกของ antibody IgM หรือ IgG ต่อ *C.pneumoniae* ในผู้สูงอายุที่มีโรคปอดอุดกั้นเรื้อรังถึงร้อยละ 96.1 ซึ่งมากกว่าในกลุ่มควบคุมที่พบเพียงร้อยละ 75.6 และจากการศึกษานี้จึงสรุปว่าพบความชุกและอุบัติการณ์การพบ antibody ต่อ *C. pneumoniae* มากขึ้นในผู้ป่วยที่เคยมีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ และการใช้ยาปฏิชีวนะต่อเชื้อ *C. pneumoniae* ในผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจมีความสำคัญมากขึ้นเพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดได้จากการติดเชื้อ *C. pneumoniae* [52]

2.6 การศึกษาระบาดวิทยาในต่างประเทศ

- ในปี ค.ศ.1997 โรงพยาบาลในรัฐ Ohio [36] พบอัตราชุกการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ร้อยละ 32.5 โดยการวินิจฉัยทางซีโรโลยี (four-fold increase≥1:64) ปี ค.ศ. 1998 มีการศึกษาจากประเทศ Baltimore พบอัตราชุกของ *M. pneumoniae* เพียงร้อยละ 1.9 ส่วนในปี 1999 Sopena [48] และคณะพบอัตราชุกของ *M. pneumoniae* ร้อยละ 1.3 ซึ่งทำการศึกษาในโรงพยาบาลในเมือง Barcelona โดยใช้การวินิจฉัยจาก four-fold increase ≥1:160 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Ruiz-Gonzales และคณะ [53] ในปี ค.ศ. 1999 ที่วินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* โดยวิธีซีโรโลยี (four-fold increase IgG and IgA) ในผู้ป่วย 19 คน จาก 109 คน (คิดเป็นร้อยละ 17) ที่รับการรักษาในโรงพยาบาล Lleda ในประเทศสเปน โดยระยะเวลาศึกษามากกว่า 15 เดือน และวินิจฉัยจากการทำ PCR ร่วมด้วยโดยเก็บสิ่งส่งตรวจจากการเจาะน้ำในปอดไปตรวจ จากผู้ป่วย 55 รายพบว่ามี 20 คน (คิดเป็นร้อยละ 22) ที่ให้ผลบวกโดยวิธี PCR

- ส่วนการศึกษาการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศอื่นๆ พบว่าผู้ใหญ่มักพบมีการติดเชื้อนี้มาก่อนแล้วซึ่งพบมากกว่าร้อยละ 50 ในเด็กและวัยรุ่นพบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของการเกิดปอดอักเสบน้อยว่าผู้ใหญ่ แต่อาจพบได้มากในช่วงวัยเรียนระดับประถม โดยพบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของการเกิด CAP ร้อยละ 10 และพบเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไซนัสอักเสบและหลอดลมอักเสบร้อยละ 5

การศึกษาระบาดวิทยาของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังนานกว่า 2 สัปดาห์มีหลายการศึกษา

- การศึกษาในเด็ก ได้แก่การศึกษาของ Hallander และคณะ [54] ซึ่งเป็นการศึกษาไปข้างหน้าในปีค.ศ.1992 ถึงปี 1995 ในโรงพยาบาลเด็กในเมือง Stockholm ประเทศสวีเดน ในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 15 ปีโดยใช้วิธี PCR ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ พบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ร้อยละ 26 และ 17 ตามลำดับ การศึกษาต่อมาเป็นการศึกษาของ Biemont และคณะ [55] โดยการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาสาเหตุของการไอเรื้อรังในเด็กจำนวน 100 คนในโรงพยาบาลเด็กแห่งหนึ่งในประเทศฝรั่งเศสพบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 4 และ 3 ตามลำดับ และการศึกษาของ Velissariou และคณะ [56] ซึ่งศึกษาในเด็กอายุตั้งแต่ 2 ปีถึง 16 ปีโดยใช้วิธี ELISA และ immunofluorescences assay (IFA) พบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ร้อยละ 29.9 และ 6 ตามลำดับ

- ส่วนการศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังนานกว่า 2 สัปดาห์ ได้แก่การศึกษาของ Wright และคณะ [57] ซึ่งศึกษาในผู้ใหญ่ที่มีอายุมากกว่า 18 ปีที่มาตรวจรักษาที่ห้องฉุกเฉินในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในประเทศ

สหรัฐอเมริกาจำนวน 65 คนพบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* แบบเฉียบพลันโดยมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM $\geq$ 1:16 หรือชนิด IgG $\geq$ 1:512 ร้อยละ 20 การศึกษาต่อมาได้แก่การศึกษา Wadowsky และคณะ [58] ซึ่งเป็นการศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ในวัยรุ่นและผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ตั้งแต่เดือนกันยายนปีค.ศ.1997 ถึงเดือนธันวาคมปี 1998 ในโรงพยาบาลในเมืองแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 491 คน อายุเฉลี่ย 35 ปี โดยวินิจฉัยการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้โดยวิธี PCR และจากการเพาะเชื้อพบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ร้อยละ 0.8 แต่ไม่พบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ส่วนการศึกษาสุดท้ายเป็นการศึกษาของ Kim และคณะ [59] ซึ่งเป็นการศึกษาในผู้ที่มีอาการไอเรื้อรังเพียงอย่างเดียวในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยในประเทศเกาหลีตั้งแต่ปีค.ศ. 2003 ถึงปี 2004 ในผู้ป่วย 37 คน โดยมีหลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ชนิดเฉียบพลัน (acute infection) โดยมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM $\geq$ 1:16 หรือชนิด IgG $\geq$ 1:512 และถ้าเป็นการติดเชื้อมาก่อน (chronic infection) คือมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG อยู่ระหว่าง 1:64 ถึง 1:512 ซึ่งจากการศึกษานี้พบมีผู้ป่วย 9 รายจาก 37 รายที่มีการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ชนิดเฉียบพลันคิดเป็นร้อยละ 24.3 และพบมี 19 รายที่มีการติดเชื้อชนิดนี้มาก่อนคิดเป็นร้อยละ 49

3. สรุป

การรักษาผู้ป่วยที่เจ็บป่วยจากเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* พบว่าการรักษาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะอาจมีความไม่เหมาะสมเนื่องจากอัตราการเสียชีวิตของการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้อยู่ในอัตราที่ต่ำมาก และส่วนใหญ่แล้วการดำเนินโรคของการติดเชื้อนี้มักหายได้เองหรือมีอาการไม่รุนแรงถ้าไม่ได้รับการรักษา ดังนั้นจึงเกิดมีคำถามว่าเมื่อมีการติดเชื้อนี้แล้วจะให้การรักษาหรือไม่ หรือการรักษานั้นเพื่อลดการเป็นภาวะปอดอักเสบและลดระยะเวลาของอาการให้สั้นลง [60] ซึ่งการรักษาผู้ที่ติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้ยาปฏิชีวนะ erythromycin และ tetracycline เป็นยาชนิดแรกที่นำมาใช้รักษา [61] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายาทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองนี้ได้เป็นอย่างดีทำให้ผลการรักษาได้ผลดี ส่วนยากลุ่ม macrolide ชนิดใหม่ๆ เช่น clarithromycin และ azithromycin พบว่ามีผลต่อเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ได้ดีเช่นเดียวกัน [62-64] และยังเป็นที่ถกเถียงกันว่าถ้าในประเทศที่พบอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ที่อยู่ในระดับต่ำการให้ยาดังที่กล่าวไปแล้วจะยังคงมีความจำเป็นหรือไม่เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อทั้งสองนี้มีอัตราตายต่ำและเมื่อติดเชื้อนี้แล้วสามารถหายได้เองเป็นส่วนใหญ่โดยไม่ต้องรับการรักษา

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย

Prospective Observational Study

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย

ประชากร (population) และ ตัวอย่าง (sample)

ประชากร (population) และตัวอย่าง (sample)

- ประชากรเป้าหมาย (Target population) คือ ประชากรทั่วไปที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์

-กลุ่มตัวอย่าง (Sample population) คือ ผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมในการวิจัย (Inclusion criteria)

1.ผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีอายุ มากกว่า 18 ปี

2. ผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรัง มากกว่า 2 สัปดาห์

เกณฑ์การไม่รับผู้เข้าร่วมในการวิจัย (Exclusion criteria)

1.ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูกหรือได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน โดยข้อมูลทั้งหมดได้จากการซักประวัติจากผู้เข้าร่วมทำการศึกษา

2. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นปอดอักเสบติดเชื้อ วัณโรค หรือโรคเกี่ยวกับหลอดลมที่ได้รับการรักษาอยู่หรือ รูปแบบการไอไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจาก 1 เดือนที่ผ่านมา ข้อมูลทั้งหมดได้จากการซักประวัติจากผู้เข้าร่วมทำการศึกษาร่วมกับการดูภาพถ่ายทางรังสีวิทยา

3. ผู้ป่วยที่ได้รับยาที่เป็นสาเหตุของการไอ เช่น ACEI (angiotensin-coverting-enzyme inhibitor)

3.3 การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่ใช้ในการวิจัย (Operation Definition)

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA อย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ เพื่อตรวจหาชิ้นส่วนของเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ในสิ่งส่งตรวจ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- เก็บตัวอย่างจาก Nasopharyngeal swab ตรวจโดยวิธี PCR เพื่อหาเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae*
- ส่งตัวอย่างเลือดโดยวิธีซีโรโลยีเพื่อหาระดับแอนติบอดีย์ต่อเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae*

การแปลผลข้อมูล

จะได้รับการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* เมื่อ

- PCR for *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ให้ผลบวก **และ**
- การแปลผลระดับภูมิคุ้มกัน ให้ผลบวก คือระดับแอนติบอดีย์ขึ้นมากกว่า 4 เท่าเมื่อเทียบกันระหว่างผลของซีรั่มครั้งแรกและครั้งสองเมื่อเก็บตัวอย่างห่างกันอย่างน้อย 2 สัปดาห์ [four-fold rising in acute and convalescent phase (paired serum)] หรือ agglutinin titer $\geq$ 3 SD (single serum)

3.4 การคำนวนขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

โดยคำนวณหาจำนวนตัวอย่างจากการศึกษาที่ไต้หวัน ที่ทำมาก่อน (ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น) โดยพบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังคือ 5-8% โดยคิดที่ความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และความคลาดเคลื่อนไม่เกินร้อยละ 5 ได้จำนวนผู้ที่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยรวมทั้งหมด 100 คน โดยคำนวณจำนวนประชากรจากสูตร

$N = Z^2_{\alpha} p(1-p)/\Delta^2$

N จำนวนประชากรที่คำนวณได้

Z_{α} ค่า Z ที่ระดับความเคลื่อนที่ชนิดที่ 1 โดย α เท่ากับ 0.05

(ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) $Z_{.05} = 1.96$

P อัตราความชุกในตัวอย่างประชากรที่สนใจ = 0.05-0.08

Δ ค่าความผิดพลาดที่ยอมรับได้ = 0.05

ดังนั้นขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้คือ $N = [(1.96)^2 (0.08)(0.92)] / (0.05)^2$

$N = 100$

3.5 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. ประชาสัมพันธ์โครงการศึกษาวิจัยภายในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร
2. เมื่อแพทย์ท่านอื่นๆพบผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังและมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสามารถเข้าร่วมวิจัยได้ จะส่งผู้ป่วยมาพบผู้ทำวิจัย
3. ผู้ทำวิจัยชี้แจงวัตถุประสงค์ ขั้นตอนการวิจัยและ ผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นให้ผู้ป่วยรับทราบ
4. ผู้ป่วยหรือผู้แทนโดยชอบธรรม ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอม
5. ให้ผู้เข้าร่วมโครงการตอบแบบสอบถามเกี่ยวกับข้อมูลเบื้องต้น เช่น เพศ อายุ อาชีพ โรคประจำตัว ระยะเวลาของอาการป่วย อาการร่วม การวินิจฉัย การรักษาหรือยาที่ได้รับมาก่อน ประวัติการได้รับวัคซีน ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้น
6. ขอเก็บตัวอย่าง nasopharyngeal swab PCR for *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* และเก็บเลือดของผู้เข้าร่วมโครงการคนละ 5 มิลลิลิตร (1 ช้อนชา) เพื่อตรวจเลือดดูระดับภูมิคุ้มกันจากผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังที่เข้าร่วมการวิจัยที่ผ่านการคัดเลือกและยินยอมเข้าร่วมโครงการ
7. ให้การวินิจฉัยและรักษาอาการเจ็บป่วยของผู้ป่วยอย่างเหมาะสม
8. นัดติดตามผู้ป่วยเพื่อประเมินผลของการรักษา รายงานผลการตรวจ nasopharyngeal swab PCR กับผู้ป่วย และนัดเก็บตัวอย่างเลือดอีกครั้งเพื่อตรวจดูระดับภูมิคุ้มกันโดยมีระยะห่างจากครั้งแรกอย่างน้อย 2 สัปดาห์

3.6 การรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลจากแบบบันทึกข้อมูล (ภาคผนวก) โดยผู้ดำเนินการวิจัย

- ประวัติข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย ระยะเวลาของอาการป่วย อาการร่วม เช่น น้ำหนักลด เสียงแหบ ปวดศีรษะ การนอนหลับผิดปกติ หายใจลำบาก น้ำมูกไหล ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ จามเป็นชุดๆ
- การวินิจฉัยที่ได้รับมาก่อนหน้าเข้าร่วมวิจัย ที่เกี่ยวกับสาเหตุของอาการไอเรื้อรัง
- การรักษาหรือยาที่ได้รับมาก่อน
- ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้น
- ผลการตรวจ nasopharyngeal swab for *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae*
- ผลการตรวจ serum sample for Antibodies to *C. pneumoniae* และ *M.pneumoniae*

3.7 **การวิเคราะห์ข้อมูล** (Data analysis)

ข้อมูลต่าง ๆ ข้างต้นจะได้รับการรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์สถิติโดยโปรแกรม SPSS เปรียบเทียบทางสถิติผลในเรื่อง

1. อัตราความชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรัง สถิติที่ใช้ คือ ความถี่และเปอร์เซนต์

2. ใช้ Chi-square test หรือ Fisher's exact test ในการเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างตัวแปรแบบกลุ่มระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ หรือ ความแตกต่างในแต่ละช่วงอายุ

3. ใช้ student t-test หรือ Mann Whiney U test ในการเปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างตัวแปรแบบต่อเนื่องระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อ *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* และกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ หรือ ความแตกต่างในแต่ละช่วงอายุ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

มีผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ผ่านเกณฑ์คัดเลือกและยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 100 ราย ในระหว่างเดือน มิถุนายน 2554 ถึง กุมภาพันธ์ 2555 โดยเป็นเพศชาย 36 คน (ร้อยละ 36) และเพศหญิง 64 คน (ร้อยละ64) อายุเฉลี่ยประมาณ 58 ปี (ค่าเฉลี่ย 58.26±15.98 ปี ขอบเขตในช่วง 28-87 ปี) ส่วนใหญ่ไม่มีโรคประจำตัว (ร้อยละ 68) โรคปอดและถุงลม (ร้อยละ 14) โรคหัวใจและหลอดเลือด (ร้อยละ 10) และโรคภูมิแพ้ (ร้อยละ 8) มีระยะเวลาการไอเฉลี่ยประมาณ 30 วัน (ค่าเฉลี่ย 30.78±23.99 วัน ขอบเขตในช่วง 14-120 วัน) โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มักได้รับการวินิจฉัยก่อนหน้านี้ว่าเป็นหลอดลมอักเสบ (ร้อยละ 38) ภูมิแพ้ (ร้อยละ 20) ส่วนใหญ่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน (ร้อยละ 68) และส่วนใหญ่ไม่เคยมีภาวะแทรกซ้อน (ร้อยละ 87) โดยภาวะแทรกซ้อนที่พบคือ ไอจนมีปัสสาวะเล็ด (ร้อยละ 11) และหูอักเสบหรือการได้ยินลดลง (ร้อยละ 2) อาการไอของผู้เข้าร่วมศึกษามีอาการดีขึ้น (ร้อยละ 87) อาการไอเท่าเดิม (ร้อยละ 13) และไม่พบผู้ที่มีอาการไอแย่ลงกว่าเดิม โดยลักษณะพื้นฐานของผู้ป่วยทั้ง 100 รายแสดงในตาราง 4.1

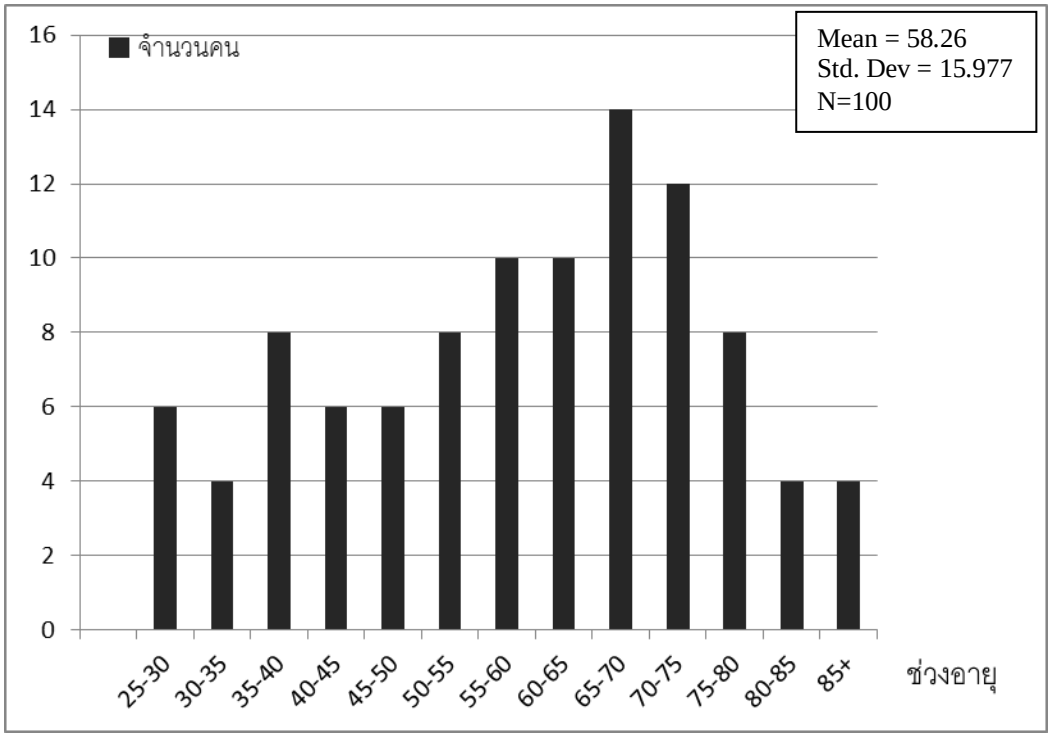
ตารางที่ 4.1 แสดงถึง baseline characteristics ของผู้ป่วย 100 รายที่เข้าร่วมการศึกษา

ลักษณะผู้ป่วย (characteristics)	**คน (ร้อยละ, %)**
เพศชาย (male)	36 (36)
เพศหญิง (female)	64 (64)
อายุ (age) :mean±SD(range)	58.26±15.98 ปี (28-87)
โรคประจำตัว (underlying diseases)	
- none	58 (58)
- cardiovascular diseases	10 (10)
- pulmonary disease	24 (24)
- allergy	8 (8)
ระยะเวลาที่ไอ (duration of cough): mean±SD(range)	30.78±23.99 วัน (14-120)
อาการร่วม (associated symptoms)	
- น้ำหนักลด (weight loss)	8 (8)
- เสียงแหบ (hoarseness)	40 (40)
- ปวดศีรษะ (headache)	16 (16)
- การนอนหลับผิดปกติ (sleep disturbance)	14 (14)
- หายใจลำบาก (whooping cough)	20 (20)
- น้ำมูกไหลปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Influenza-like symptoms)	36(36)
- จามเป็นชุดๆ (sneezing attack)	14 (14)
การวินิจฉัยก่อนเข้าร่วมวิจัย (previous diagnosis)	
- ภูมิแพ้ (allergy)	
- โรคกรดไหลย้อน (GERD)	20 (20)
- หลอดลมอักเสบ (bronchitis)	6 (6)
- หอบหืด (asthma)	38 (38)
- อาการไอตามหลังการติดเชื้อ (post-infectious cough)	6 (6)
- ไม่ทราบสาเหตุ (unknown)	12 (12)
- อื่นๆ (others)	15 (15)

ลักษณะผู้ป่วย(characteristics)	คน (ร้อยละ, %)
ยาปฏิชีวนะที่ได้รับมาก่อน (previous antibiotics)	
- ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน (no)	68 (68)
- ได้รับยาปฏิชีวินะมาก่อน (yes)	32 (32)
ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้น (complications)	
- ไม่มี (none)	87 (87)
- ปัสสาวะเล็ด (urinary incontinence)	11 (11)
- กระดูกซี่โครงหัก (rib fracture)	0 (0)
- ลมรั่วในเยื่อหุ้มปอด (pneumothorax)	0 (0)
- ไส้เลื่อน (inguinal hernia)	0 (0)
- ชัก (seizure)	0 (0)
- หูอักเสบหรือการได้ยินลดลง (otitis media or hearing loss)	2 (2)
- หลอดเลือดแดงใหญ่ที่บริเวณลำคอแตกเซาะ (carotid artery dissection)	0 (0)
อาการไอหลังจากมาตรวจติดตามการรักษา (clinical course)	
- ดีขึ้น	87 (87)
- เท่าเดิม	13 (13)
- แย่ลง	0 (0)

ตารางที่ 4.1 แสดงถึง baseline characteristics ของผู้ป่วย 100 รายที่เข้าร่วมการศึกษา (ต่อ)

แผนภูมิ 4.1 แสดงจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 100 ราย แยกตามอายุ



ตารางที่ 4.2 แสดงผลการศึกษาของผู้เข้าร่วมการศึกษาที่ติดเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae*

Patient Number	PCR for *M. pneumoniae*	*M. pneumoniae* ครั้งที่1		*M. pneumoniae* ครั้งที่ 2	
		IgM	IgG	IgM	IgG
No. 12	Positive	1:16	negative	1:32	negative
No. 24	Positive	1:32	positive	1:32	positive
No. 30	Positive	1:16	negative	1:16	negative
No. 50	Positive	1:32	negative	1:16	negative

- All patients have titer more than 1:160 by Gel particle aggluitination test (GPA)
- IgG by ELISA method (Qualitative immunoenzymatic determination of IgG antibodies base on ELISA)
- IgM by ELISA method if positive defined antibody titers (positive more than cut-off value = 0.5503, mean calibrator = 0.550)
- No four-fold rising antibodies

ตารางที่ 4.3 แสดงถึงผลการศึกษาของผู้เข้าร่วมการศึกษาที่ติดเชื้อ *Chlamydia pneumoniae*

Patient Number	PCR for *C. pneumoniae*	*C. pneumoniae* ครั้งที่1		*C. pneumoniae* ครั้งที่ 2	
		IgM	IgG	IgM	IgG
No. 20	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<1:512
No. 23	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<1:512
No. 26 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512
No. 31	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<!:512
No. 33	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<1:512
No. 39 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512
No. 51 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512
No. 53 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512
No. 54 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512
No. 60	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<1:512
No. 68	Positive	<1:16	<1:512	<1:16	<1:512
No. 79 *	Positive	<1:16	1:512	<1:16	1:512

* participants were diagnosed acute *Chlamydia pneumoniae* infection

- IgG $\geq$1:512 by Microimmunofluorescence (MIF) method (possible diagnostic criteria)
- No four-fold rising antibodies

โดยสรุปจากการศึกษานี้พบว่า อัตราความชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์คิดเป็นร้อยละ 4 [ตาราง 4.2] โดยพบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* โดยวิธีทางชีวโมเลกุล (PCR) และวิธีทางซีโรโลยี โดยวิธี ELISA พบมีระดับ antibody ชนิด IgM ต่อเชื้อ *M. pneumoniae* ให้ผลบวกมากกว่าหรือเท่ากับ 1:16 และทุกคนพบมีค่า titer มากกว่า 1:160 จากการทำด้วยวิธี gel partical agglutination (GPA) ซึ่งเข้าได้กับ possible diagnostic criteria และทั้งสี่รายไม่พบมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM ที่มีระดับเพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า (four-fold increase titer) เมื่อตรวจซีรั่ม 2 ตัวอย่างห่างกันอย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้เข้าร่วมการศึกษาหมายเลย 24 มีแอนติบอดีย์ชนิด IgG ให้ผลบวกจากวิธี ELISA อาจเป็นเพราะผู้เข้าร่วมการศึกษารายนี้เคยมีการติดเชื้อ *M. pneumonia* มาก่อนหน้านี้แล้วและเป็นการติดเชื้อซ้ำในปัจจุบัน โดยผู้เข้าร่วมการศึกษาทั้งสี่รายพบเป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 2 ราย อายุเฉลี่ย 54 ปี (ขอบเขต 44-63 ปี) ทั้งสี่รายไม่มีโรคประจำตัว ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะใดๆ ในช่วง 1 เดือนที่ผ่านมาและไม่มีภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น

ส่วนอัตราความชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์คิดเป็นร้อยละ 6 [ตาราง 4.3] โดยพบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ด้วยวิธีทางPCR และวิธีทางซีโรโลยี ด้วยวิธี serum microimmunofluorescence (MIF) พบมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG ให้ผลบวกมากกว่าหรือเท่ากับ 1:512 (possible diagnostic criteria) ไม่พบมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM เลยและทั้งหกรายไม่พบมีการเพิ่มของระดับแอนติบอดีย์มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า (four-fold increase titer) ในการตรวจซีรั่ม 2 ตัวอย่างห่างกันอย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ เป็นเพศชาย 2 รายและเพศหญิง 4 ราย อายุเฉลี่ย 46 ปี (ขอบเขต 28-76 ปี) พบมีสองรายที่มีโรคประจำตัว ได้แก่โรคปอดและถุงลม และโรคหัวใจและหลอดเลือดอย่างละ 1 ราย ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวเป็นโรคปอดและถุงลม ได้รับการวินิจฉัยก่อนเข้าร่วมการวิจัยเป็นหลอดลมอักเสบ และได้รับยาปฏิชีวนะชนิดรับประทานมาก่อนในช่วง 1 เดือน แต่ไม่พบว่าผู้ป่วยรายใดเกิดภาวะแทรกซ้อน ขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ที่เข้าร่วมการศึกษาอีก 6 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธีทาง PCR ต่อเชื้อ *C. pneumoniae* แต่ไม่พบผลบวกโดยวิธีทางซีโรโลยี ซึ่งไม่เข้ากับคำจำกัดความของการติดเชื้อของการศึกษานี้ที่ต้องให้ผลบวกทั้งวิธี PCR และวิธีทางซีโรโลยี

บทที่ 5

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ภาวะปอดอักเสบพบเป็นปัญหาสำคัญและเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะพิการและเสียชีวิตในเด็กและวัยรุ่นทั่วโลก พบว่าอัตราชุกพบเพิ่มมากขึ้นในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดปอดอักเสบที่พบบ่อยเกิดจากเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* โดยลักษณะทางคลินิกของการติดเชื้อแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียและไวรัส โดยการติดเชื้อทั้ง *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* นั้นมักค่อยเป็นค่อยไปและส่วนใหญ่ไม่ค่อยมีอาการที่จำเพาะ และลักษณะที่พบจากเอ็กซเรย์ทรวงอกอาจไม่สัมพันธ์กับอาการและอาการแสดงทางคลินิก พบว่า *M. pneumoniae* พบเป็นจุลชีพที่เป็นสาเหตุที่พบบ่อยที่สุดของการเกิดภาวะปอดอักเสบจากชุมชนในเด็กและ *C. pneumoniae* พบเป็นสาเหตุรองลงมา

การติดเชื้อ *M. pneumoniae* เป็นสาเหตุของการเกิดปอดติดเชื้อจากชุมชนได้ถึงร้อยละ 15-20 และพบเป็นสาเหตุในเด็กโตและผู้ใหญ่ และยังทำให้เกิดทางเดินหายใจติดเชื้อในเด็กเล็กได้อีกด้วย มีการรายงานอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ในประเทศไทยโดยพบมีรายการศึกษาโดยอัตราชุกพบได้แตกต่างกันระหว่างประชากรที่ทำการศึกษาพบอยู่ในช่วงร้อยละ 6-40 ซึ่งอัตราชุกที่พบแตกต่างกันอาจขึ้นกับเกณฑ์การวินิจฉัยที่แตกต่างกันอีกด้วย การวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ขึ้นกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการมากกว่าอาการทางคลินิก เนื่องจากอาจมีอาการทางคลินิกที่ไม่จำเพาะต่อโรค โดยอาการและอาการแสดงมักคล้ายกับโรคติดเชื้อทางเดินหายใจที่เกิดจากสาเหตุอื่นๆ นอกจากนี้ยังไม่มีความจำเพาะทางการตรวจทางรังสีวิทยาอีกด้วย ซึ่งการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumoniae* มักมีหลายวิธี เช่นการตรวจจากสารคัดหลั่งในร่างกาย เช่น เสมหะ โดยการส่งตรวจโดยการเพาะเชื้อหรือทางชีวโมเลกุล ได้แก่การทำโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) หรือการตรวจทางซีโรโลยีซึ่งเป็นการหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ *M. pneumoniae* การเพาะเชื้อเพื่อดูว่ามีการติดเชื้อ *M. pneumoniae* หรือไม่โดยการตรวจจากสารคัดหลั่งมักต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 5 สัปดาห์ โดยความไวของการเพาะเชื้อค่อนข้างต่ำกว่าวิธีการตรวจทางซีโรโลยีโดยวิธี complement fixation test (CFT) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความนิยมมากที่สุด ซึ่งเป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ 2 ครั้งโดยครั้งที่ 2 ห่างจากครั้งแรกประมาณ 2-4 สัปดาห์ หรือเป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดีครั้งเดียวโดยมีค่าแอนติบอดีชนิด IgG มากกว่าหรือเท่ากับ 1:64 โดย

วิธี complement fixation แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความยุ่งยากและมีราคาแพง ในการศึกษานี้จึงใช้วิธีทาง ELISA ซึ่งจะเป็นวิธีที่มีราคาถูกกว่าและผลการตรวจก็มีความน่าเชื่อถือเช่นกัน โดยวิธีนี้จะดูระดับแอนติบอดีชนิด IgM มากกว่าหรือเท่ากับ 1:16 โดยวิธีทาง ELISA ร่วมกับการใช้วิธี gel particle agglutination ร่วมด้วยเพื่อให้ผลการศึกษามีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งวิธี ELISA ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความไวและความจำเพาะอยู่ที่ 95%

โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบวิธีการเพาะเชื้อ มีความไวมากกว่าร้อยละ 90 ส่วนความจำเพาะอยู่ที่ร้อยะละ 50-90 การตรวจโดยวิธี PCR ต่อ *M. pneumoniae* มีความไวอยู่ที่ร้อยละ 95 และความจำเพาะอยู่ที่ร้อยละ 90-95% และการตรวจทาง serology ทั้งวิธี serum complement fixation และ ELISA พบมีความไวอยู่ที่ร้อยละ 75-80 และความจำเพาะร้อยละ 80-90

ส่วนการติดเชื้อ *C. pneumoniae* พบเป็นสาเหตุของการไอเรื้อรังได้บ่อย จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Wright และคณะ [57] ได้รายงานการอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังพบอัตราชุกร้อยละ 20 โดยการตรวจทางซีโรโลยีห่างกัน 2 สัปดาห์ แต่การศึกษาเป็นการหาอัตราชุกโดยการใช้วิธีทางซีโรโลยีเพียงอย่างเดียว ต่อมาได้มีการศึกษาของ Hallander และคณะ [54] ซึ่งเป็นการศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในเด็กที่มีอาการไอเรื้อรังโดยระยะเวลาการไอไม่นานกว่า 3 เดือนพบว่าอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* โดยการตรวจโดยวิธี PCR พบร้อยละ 17 การศึกษาของ Kaneko และคณะ [65] ได้ศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในเด็กที่มีอาการไอเรื้อรังโดยการตรวจทางซีโรโลยีโดยวิธี indirect immunofluorescence พบอัตราชุกร้อยละ 38 ซึ่งเป็นอัตราชุกที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ส่วนการศึกษาล่าสุดเป็นการศึกษาของ Birkeback และคณะ [66] ได้ศึกษาอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังโดยวิธี PCR พบอัตราชุกเพียงร้อยละ 1.5 เท่านั้นซึ่งเป็นอัตราชุกที่ต่ำสุดในบรรดาการศึกษาที่ผ่านมา ซึ่งพบว่าอัตราชุกที่มีความแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย เช่นประชากรที่ศึกษามีความแตกต่างกัน เช่นอายุ เพศ เชื้อชาติ เป็นต้น หรือในประเทศที่ต่างกันหรืออยู่ในภูมิภาคที่ต่างกันก็อาจส่งผลต่อการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ที่ไม่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังอาจขึ้นกับวิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อไม่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งถ้าตรวจด้วยวิธีที่แตกต่างกันหรือเกณฑ์การวินิจฉัยที่ไม่เหมือนกันก็อาจส่งผลการตรวจที่ได้ทำให้อัตราชุกในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกัน เป็นต้น

จากการศึกษานี้พบว่าจากผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่เข้าร่วมการศึกษานี้ทั้งหมด 100 คน พบอัตราความชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 4 โดยพบการติดเชื้อ *M. pneumoniae* โดยวิธีทางชีวโมเลกุล (PCR) และวิธีทางซีโรโลยี โดยวิธี ELISA ผู้เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการตรวจโดยวิธี

gel particle agglutination เพื่อดูว่ามีการติดเชื้อ *M. pneumonia* หรือไม่ โดยในการศึกษานี้พบว่ามีผู้เข้าร่วมการศึกษาจำนวน 4 รายที่มีระดับ titier มากกว่า 1:160 และทั้งสี่รายได้รับการตรวจโดยวิธี ELISA อีกครั้งเพื่อหาระดับแอนติบอดีย์ทั้งชนิด IgM และ IgG พบว่าผู้ป่วยทุกรายมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM มากกว่า 1:16 แต่เมื่อทำการตรวจซีรั่มครั้งที่สองซึ่งห่างจากครั้งแรก 2 สัปดาห์ไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีย์มากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า ดังนั้นการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. pneumonia* จึงเป็นแค่ possible diagnostic criteria เท่านั้น นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบอีกว่ามีผู้ร่วมการศึกษาหนึ่งรายคือผู้ร่วมการศึกษาหมายเลย 24 ที่พบมีแอนติบอดีย์ชนิด IgG ต่อเชื้อ *M. pneumoniae* ที่ให้ผลบวกโดยวิธี ELISA แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้หาระดับแอนติบอดีย์ว่ามีระดับเท่าไร เนื่องจากผู้เข้าร่วมการศึกษารายนี้น่าจะเคยมีการติดเชื้อ *M. pneumoniae* มาก่อนหน้านี้แล้ว และในครั้งนี้เป็นการติดเชื้อซ้ำใหม่โดยตรวจพบว่ามีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM ที่ให้ผลบวกร่วมด้วย

การหาอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อนานมากกว่า 2 สัปดาห์สำหรับในประเทศไทยที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษา การศึกษานี้ถือว่าเป็นการศึกษาแรกที่มีการศึกษาในผู้ใหญ่มีอาการไอเรื้อรังนานมากกว่า 2 สัปดาห์ จากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าในผู้ที่มีอาการไอเรื้อรังนานกว่า 2 สัปดาห์แต่ไม่มีอาการหรืออาการแสดงอย่างอื่นร่วมด้วย แพทย์ผู้ดูแลการรักษาต้องคำนึงถึงการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ไว้ด้วยเสมอและมีโอกาสที่พบผู้ป่วยที่เคยมีการติดเชื้อมาก่อนหน้านี้และสามารถติดเชื้อซ้ำใหม่ได้อีกด้วย

ส่วนอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 6 โดยพบการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ด้วยวิธี PCR และวิธีทางซีโรโลยี ด้วยวิธี serum microimmunofluorescence (MIF) พบมีระดับแอนติบอดีย์ ชนิด IgG ให้ผลบวกมากกว่า 1:512 (possible diagnostic criteria) แต่ไม่พบมีระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgM ขึ้น นอกจากนี้ยังพบผู้เข้าร่วมการศึกษามีผลบวกจากการตรวจโดยวิธี PCR สำหรับเชื้อ *C. pneumoniae* จำนวน 6 รายแต่ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีย์ทั้งชนิด IgM และ IgG อาจเป็นเพราะการตรวจโดยวิธี PCR มักมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธีทางซีโรโลยี โดยในการศึกษานี้ได้ใช้สารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกเพื่อส่งตรวจหาการติดเชื้อทั้งสองชนิดโดยวิธี PCR ส่งตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซึ่งมีค่าความไวมากกว่าร้อยละ 97 และค่าความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 90 [67] ทำให้ผลการศึกษาที่ได้มีผลบวกโดยวิธี PCR ของเชื้อ *C. pneumoniae* มากถึง 12 รายแต่มีเพียง 6 รายเท่านั้นที่ให้ผลบวกทั้งวิธี PCR และทางซีโรโลยี ซึ่งตรงกับคำจำกัดความของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ของการศึกษานี้ ทำให้ในการศึกษานี้มีอัตราชุกของการติดเชื้อ *C. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์เพียงร้อยละ 6 เท่านั้น ซึ่งอาจน้อยกว่าการศึกษาที่ผ่านมาที่ใช้วิธีการวินิจฉัยการติดเชื้อ

C. pneumoniae โดยใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเท่านั้น ไม่ได้ใช้ทั้งสองวิธีเหมือนการศึกษานี้ และอีกประการหนึ่งอาจเป็นเพราะประชากรที่ทำการศึกษามีความแตกต่างกัน เป็นต้น

ในการศึกษานี้ไม่พบมีระดับแอนติบอดีย์ที่เพิ่มขึ้นชนิด 4-fold rising titer โดยการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรั่ม 2 ครั้งซึ่งครั้งที่สองห่างจากครั้งแรกอย่างน้อย 2-4 สัปดาห์ ทั้งการตรวจหาเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* อาจเป็นจากผู้เข้าร่วมการศึกษาบางรายได้รับการรักษามาก่อนหน้าที่จะมาร่วมการศึกษา เช่นได้รับยาปฏิชีวินะเพื่อการรักษาอาการไอมาก่อนทำให้เมื่อมาเข้าร่วมการวิจัยทำให้เมื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีย์จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีย์ นอกจากนี้อาจเป็นจากผู้เข้าร่วมการศึกษาได้รับการเจาะเลือดในระยะเวลาที่ช้าเกินไปเมื่อเทียบกับระยะเวลาเฉลี่ยที่ไอในการศึกษานี้คือประมาณ 30 วัน ทำให้เมื่อมาเจาะเลือดเพื่อตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ทำให้เลยระยะเวลาที่จะมีระดับแอนติบอดีย์ที่เพิ่มขึ้นไปแล้วทำให้ในการศึกษานี้จึงไม่พบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีย์ชนิด 4-fold rising

การหาอัตราชุกของการติดเชื้อ *M. pneumoniae* ในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังนานกว่า 2 สัปดาห์ เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยเนื่องจากเท่าที่ผ่านมาเป็นการศึษาอัตราชุกในเด็กหรือผู้ใหญ่ที่มีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ หรือเป็นการศึกษาในกลุ่มประชากรบางกลุ่มเช่น เด็กอายุน้อยกว่า 5 ปีหรือในผู้ใหญ่ที่มีโรคประจำตัวเช่น โรคหอบหืดหรือโรคถุงลมโป่งพอง เป็นต้น แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงอัตราชุกของการติดเชื้อชนิดนี้ในผู้ใหญ่ที่มีเฉพาะอาการไอเรื้อรัง

นอกจากนี้เมื่อติดตามผู้ที่เข้าร่วมการศึกษาไปประมาณ 2-4 สัปดาห์พบว่าผู้เข้าร่วมการศึกษาส่วนใหญ่ (ร้อยละ 87) มีอาการไอดีขึ้นโดยที่ไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ ได้รับเพียงการรักษาตามอาการเท่านั้น อาจเป็นเพราะการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถหายได้เองโดยไม่ต้องได้รับการรักษาและไม่พบผู้เข้าร่วมการศึกษารายใดที่มีอาการแย่ลงหรือเกิดภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น

ข้อจำกัดในการศึกษานี้ เนื่องจากการศึกษานี้ทำการศึกษาในโรงพยาบาลที่เป็นโรงเรียนแพทย์ขนาดใหญ่ อาจจะเกิดอคติในการคัดเลือกผู้ที่มาเข้าร่วมการศึกษา และในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังทั่วไปที่อาจมีอาการเพียงเล็กน้อยหรือมีระยะอาการช่วงเริ่มต้นอาจไม่ได้เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลขนาดใหญ่ตั้งแต่แรกแต่ซื้อยารับประทานเองหรือพบแพทย์ที่คลินิกแทน นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังทุกคนที่เข้ามารับการตรวจที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์อาจไม่ได้มาเข้าร่วมการศึกษาทุกคนถึงแม้จะได้มีการประชาสัมพันธ์อย่างต่อเนื่อง

และในการศึกษานี้ เนื่องจากพบผู้ร่วมการศึกษามีการติดเชื้อ *M. pneumoniae* 4 รายและ *C. pneumoniae* 6 รายเท่านั้น การศึกษาตามวัตถุประสงค์รองเกี่ยวกับการเปรียบเทียบระหว่างอาการและอาการแสดงร่วมอื่นๆของผู้ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ในกลุ่มที่มีการติดเชื้อ

ทั้งสองชนิดนี้และอีกกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ หรือการเปรียบเทียบอัตราความชุกของโรคการติดเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรังในแต่ละช่วงอายุจึงไม่แปลผลในการศึกษานี้

M. pneumoniae และ *C. pneumoniae* เป็นเชื้อที่เกือบทุกคนได้รับครั้งหนึ่งในชีวิต นอกจากจะเกิดโรคของระบบทางเดินหายใจแล้ว อาจจะเสี่ยงต่อการเป็นโรคเรื้อรัง ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านสุขภาพ ดังนั้นการปฏิบัติตัว การรักษาสุขภาพให้แข็งแรง และการป้องกันความเสี่ยงที่จะเป็นโรคระบบทางเดินหายใจ น่าจะเป็นวิธีป้องกันที่ดีที่สุด

รายการอ้างอิง

[1] Tsolia M, Psawas S, Bossios A. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school age children : evidence for high prevalence of viral infection. **Clin Infect Dis** 2004;39:681-6.

[2] Suwanjutha S, Ruangkanchanasetr S, Chantarojanariri T. Risk factors associated with morbidity and mortality of pneumonia in Thai children nder 5 years. **Southeast Asain J Trop Med Public Health** 1994;25:60-6.

[3] Cunha B. The atypical pneumonias:clinical diagnosis and importance. **Clin Microbiol Infect** 2006;3:12-24.

[4] Deerojanawong J, Prapphal N, Suwanjutha S, Lochindarat S, Chantarojanasiri T, Kunakorn M, et al. Prevalence and clinical features of *Mycoplasma pneumoniae* in Thai children. **J med Assoc Thai** 2006;89(10):1641-7.

[5] David HT, Grayston T, Wang S, Kuo C, Altman J. *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR, *Mycoplasma pneumoniae*, and viral infections in acute respiratory disease in a university student health clinic population. **Am J of Epidemiol** 1990;132(2):248-56.

[6] Bamba M, Jozaki K, Sugaya N, Tamai S, Ishihara J, Kori T, et al. Prospective surveillance for atypical pathogen in children with community-acquired pneumonia in Japan. **J Infect Chemother** 2006;12:36-41.

[7] Wang K, Chalker V, Bermingham A, Harrison T, Mant D, Harnden A. *Mycoplasma pneumoniae* and respiratory virus infection in children with persistent cough in England. **Pediatr Infect Dis J** 2011;30:1047-51.

[8] Liu FC, Chen PY, Huan FL, Tsai CR, Lee CY, Lin CF. Do serological tests provide adequate rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Jpn J Infect Dis** 2008;61:397-9.

[9] Gaydos C, Quinn T. The role of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular disease. **Adv Intern Med** 2000;45:139-43.

[10] Birkebaek NH, Jensen JS, Deefeldt T, Degn J, Huniche B, Andersen P, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in adults with chronic cough compared with healthy blood donors. **Eur Respir J** 2000;16:108-11.

[11] Ou Zy, Zhou R, Wang FH, Lu JP, Xia JQ, Xia HM, et al. Retrospcetive analysis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric fatal pneumonia in China. **Clin Pediatr(Phila)** 2008;47:791-6.

[12] Psausler B, Engelhardt K, Spiss H. Post-infectious central and peripheral nervous disease complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection: Report of three cases and review of the literature. **Eur J Neurol** 2002;9:93-6.

[13] Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB, Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. **Clin Diagn Lab Immunol** 2004;11(5):862-7.

[14] Dorigo-Zetsma JW, Zaat SA, Wertheim PM, Spanjaard L, Rihnthes J, VanWaveren G, et al. Comparison of PCR, culture and serological tests for diagnosis of *M.pneumoniae* respiratory tract infection in children. **J Clin Microbiol** 1999;37(1):14-7.

[15] Michelow IC, Kurt OL, Juanita LO, Lynn BD, George H, Hardy RD. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community -acquired pneumonia. **J Clin Microbiol** 2004;42:3339-41.

[16] Grayston J. Infection caused by *Chlamydia pneumoniae* stain TWAR. **Clin Infect Dis** 1992;15:757-61.

[17] Margaret RH. *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Curr Opin Infect Dis** 2001;14:181-6.

[18] Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. *Chlamydia pneumoniae* as an emerging risk factor in cardiovascular disease. **JAMA** 2002;288:2724-31.

[19] Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, Niki Y, Hawane H, Matsushima T. *Chlamydia pneumoniae* and exacerbations of asthma in adults. **Ann Allergy Asthma Immunol** 1998;80:405-9.

[20] Naoyuki M, Yoshihito N, Masamitsu N, Hiroshi F, Toshiharu M. Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. **Chest** 2001;119:1416-9.

[21] Reiman H. An acute infection of the respiratory tract with atypical pneumonia. **JAMA** 1938;26:2377-84.

[22] Eaton M, Meiklejohn G, VanHerick W. Studies on the etiology of pulmonary atypical pneumonia: A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos. **J Exp Med** 1944;76:649-68.

[23] Himmerlreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res** 1996;24:4420-9.

[24] File TM,Bartlett JG, Cassell GH. The importance of *Chlamydia pneumoniae* as a pathogen. **Infect Dis Clin Pract** 1997;6:28-31.

[25] Kuo C, Jackson LA, Campbell LA, Grayston TJ. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). **Clin Microb Rev** 1995 ;8 :451-61.

[26] Grayston JT,Wang SP, Duo CC. Current knowledge on *Chlamydia pneumoniae*, stain TWAR, an important cause of pneumonia and other acute respiratory diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1989 ;8 :191-202.

[27] Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* family containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **Int J Syst Bacteriol** 1999;49:415-50.

[28] Chmura K, Lutz RD, Chiba H, Numata MS, Choi HJ, Fantuzzi G et al. *Mycoplasma pneumoniae* antigens stimulate interleukin-8. **Chest** 2003;123:425S.

[29] Yang J, Hooper WC, Phillips DJ, Talkington DF. Regulation of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. **Infect Immun** 2002;70:3649-55.

[30] Kinjo K, Sato H, Ohnishi Y, Hishida E, Nakatani D, Mizuno H, et al. Joint effect of *Chlamydia pneumoniae* infection and classic coronary risk factors on risk of acute myocardial infarction. **Am Heart J** 2003;141:324-30.

[31] Foy HM, Kenny GE, McMahan R, Mansy AM, Grayston JT. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in and urban area: Five years of surveillance. **JAMA** 1970;214:1666-72.

[32] Cassell GH. The changing role of mycoplasmas in respiratory disease and AIDS. **Clin Infect Dis** 1993;17(suppl 1):S1-2

[33] Foy HM, Cooney KM, McMahan R, Grayston JT. Viral and *Mycoplasma pneumonia* in a prepaid medical care group during an eight-year period. **Am J Epidemiol** 1973;97: 93-102.

[34] Wangroongsarb P, Geenkajorn K, Petkanchanapong W, Vedjapoon A, Kusum M, Hagiwara T. *Chalmydophila (Chlamydia) pneumoniae* infection among young children with respiratory disease in Thailand. **Jpn J Infect Dis** 2003;56:146-50.

[35] Fernald G, Clyde W. Epidemic pneumonia in university students. **J Adoles Health Care** 1989;10:520-6.

[36] Marslon BJ, Plouffe JF, File JM, Hackman BA, Salstrome SJ, Lipman HB, et al. Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. **Arch Intern Med** 1997;157:1709-18.

[37] Piyada W, Kanonkporn G, Winol P, Apiram V, Nayura K, Toshikatsu H. *Chlamydophila pneumoniae* infection among young children with respiratory diseased in Thailand. **Jpn J Infect Dis** 2003;56:146-50.

[38] Dowell SF, Peel RW, Bomann J. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assay: Recommendations from the Centers for disease control and prevention and the laboratory Center for disease control. **J Infect Dis** 2001;33:492-502.

[39] Smieja M, Mahony J, Petrich A, Boman J, Chernesky M. Association of circulation *Chlamydia pneumoniae* DNA with cardiovascular disease: a systematic review. **BMC Infect Dis** 2002;2:21-30.

[40] Higuchi Mde L, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SA, Castelli JB, Gutierrez PS, et al. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol** 2003;81:12-22.

[41] Mussa FF, Chai H, Wang X, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease:an update. **J Vasc Surg** 2006;43(6):1301-7.

[42] Lang BR. *Chlamydia pneumoniae* as a differential diagnosis? Follow-up to a case report on progression pneumonitis in an adolescent. **Pateint Care** 1991;15: 201-4.

[43] Cole BC, Griffiths MM. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma pneumoniae* superantigen MAM. **Arthritis Rheum** 1993;36(7):994-1002.

[44] Persson K, Boman J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infection by *Chlamydia pneumoniae*. **Clin Diagn Lab Immunol** 2000;7:739-44.

[45] Hall CB, Douglas RG Jr. Clinically useful method for the isolation of respiratory syncytial virus. **J Infect Dis** 1975;131:1-5.

[46] Gaydos CA, Roblin PM, Hammerschlag MR, Hyman CL, Eiden JJ, Schachter JU, Quinn TC. Diagnostic utility of PCR-enzyme immunoassay, culture, and serology for detection of *Chlamydia pneumoniae* in symptomatic and asymptomatic patients. **J Clin Microbiol** 1994;32(4):903-5.

[47] Bennedsen M, Berthelsen L, Lind I. Performance of three microimmunofluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* immunoglobulin M, G and A antibodies.**Clin Diag Lab Immunol** 2002;9:833-9.

[48] Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet M. Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults. **Eur J Clin Microbiolo Infect Dis** 1999;18:852-8.

[49] ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์. *Chlamydia pneumoniae*. Available at http://www.idthai.org/microbiology/download/pneumoniae.pdf. Accessed 19 December 2010.

[50] Prapphal N, Juwanjutha S, Durongkaveroj P, Lochindarat S, Kunakorn M, Derrojanawong J, et al. Prevalence and clinical presentations of atypical pathogens infection in community-acquired pneumonia in Thailand. **J Med Assoc Thai** 2006;89(9):1412-9.

[51] Siritantikorn S, Maranetra KN, Wongsurakiat P, Traditsuwan R, Puthavathana P, Ngamurulert S, Suthamsamai T. Prevalence and incidence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies among the healthy elderly and patients with chronic obstructive pulmonary disease. **J Med Assoc Thai** 2004;87(4):377-81.

[52] Mundy P, Oldach D, Amcaerler P. Implications for macrolide treatment in community-acquired pneumonia. **Chest** 1998;113:1201-6.

[53] Reiz-Gonzalez A, Falguera M, Nognes A. Is *Streptococcus pneumoniae* the loading cause of pneumonia of unknown etiology ? A microbiologic study of lung aspirates in consecutive patients with community-acquired pneumonia. **Am J Med** 1999;106:385-90.

[54] Hallander HO, Gnarpe J, Gnarpe H, Olin P. *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and persistent cough in children. **Scand J Infect Dis** 1999;31:281-6.

[55] Bremont F, Micheau P, Le Roux P, Brouard J, Pin I, Fayon M. Etiology of chronic cough in children : analysis of 100 cases. **Arch Pediatr** 2001;8(Supple3):645-9.

[56] Velissariou IM, Papadopoulos NG, Ginnake M, Tsolia M. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* chronic cough in children: efficacy of clarithromycin. **Inter J Antimicrob Agents** 2005;26:179-80.

[57] Wright SW, Edward KM, Decker MD, Grayston JT, Wang SP. Prevalence of positive serology for acute *Chalmydia pneumoniae* infection in emergency department patients with persistent cough. **Acad Emerg Med** 1997;4:179-83.

[58] Wadowsky RM, Castilla EA, Laus S, Kozy A, Atchison RW, Kingsley LA, et al. Evaluation of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* as etiology agents of persistent cough in aldolescents and adults. **J Clin Microb** 2002;40(2):637-40.

[59] Kim WJ, Lee HY, Lee ME, Lee JS. Serology of *Chlamydia pneumoniae* in patients with chronic cough. **Respirology** 2006;11(6):805-8.

[60] Margaret RH, Keith C, Patricia MR, Maureen G, Wilson D, Laura M, et al. Persistent infection of *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. **Clin Infect Dis** 1992;14:178-82.

[61] Smith C, Friedwell W, Chanock R. Shedding of *Mycoplasma pneumoniae* after tetracycline and erythromycin. **N Engl J Med** 1967;276:1172-5.

[62] Jackson L, Grayston J. *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections. **Curr Opin Infect Dis** 1996;9:89-93.

[63] Kuo C, Jackson L, Lee A, Grayston J. In vitro activities of azithromycin, clarithromycin and other antibiotics against *Chlamydia pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** 1996:40:2669-70.

[64] Retsema J, Girard A, Schelkly W. Spectrum and mode of action of azithromycin: a new 15-membered-ring macrolide with improved potency against gram-negative organism. **Antimicrob Agents Chemother** 1987;31:1939-47.

[65] Kaneko K, Yamashiro Y, Marutyma T, Obinata K. *Chlamydia pneumoniae* infection in children with persistent cough. **Arch Dis Child** 1999;28:179-85.

[66] Birkebaek NH, Jensen JS, Seefeldt T, Degn J, Huniche B. *Chlamydia pneumoniae* infection in adults with chronic cough compared the healthy blood donors. **Eur Respir J** 2000;16:108-11.

[67] Kerdsin A, Uchida R, Verathamjamrus C, Puangpatra P, Kawakami K, Puntanakul P. et al. Development of triplex SYBR green real-time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Legionella* spp. Without extraction of DNA. **Jpn J Infect Dis** 2010;63:173-80.

ภาคผนวก

Protocol : **การวินิจฉัยแบคทีเรีย** *Chlamydia pneumoniae* **และ** *Mycoplasma pneumoniae* **โดยวิธี** Real-time Polymerase Chain Reaction [67]

หลักการ

การตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคปอดอักเสบจากเชื้อ *Chlamydia pneumoniae* และ *Mycoplasma pneumoniae* เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณจำเพาะของแบคทีเรียเป้าหมาย ที่ไม่พบในแบคทีเรียอื่นด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณนั้น คือ upstream region ของ *ompA* gene ซึ่งจำเพาะกับเชื้อ *Chlamydia pneumoniae* และ *P1* ซึ่งจำเพาะกับเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* ด้วยเทคนิค PCR หลังจากผ่านปฏิกิริยา PCR และวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis หรือวิเคราะห์ด้วยค่า melting temperature (Tm) และ threshold cycle (Ct) ของ PCR product ในกรณีของ real-time PCR ชนิดที่ใช้สี SYBR green เป็นตัวติดตามผลิตภัณฑ์แล้วจะสามารถทราบได้ว่าในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจมีเชื้อ *Chlamydia pneumoniae* และ *Mycoplasma pneumoniae* อยู่หรือไม่ โดยเทียบกับตัวควบคุมผลบวก (positive control) และผลลบ (negative control)

PCR Method : Triplex SYBR Green real-time PCR without extraction DNA สำหรับตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* และ *Chlamydia pneumoniae* โดยส่งตรวจที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

น้ำยาและสารเคมี

8.2.1. Deoxyribonucletide triphosphate (dATP, dTTP,dGTP, dCTP)

8.2.2. บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

8.2.3. Magnesium chloride ($MgCl_2$)

8.2.4. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

8.2.5. น้ำกลั่นปราศจากประจุ ที่ผ่านการทำลายเชื้อ (sterile deionized water)

8.2.6. Agarose gel

8.2.7. 50 bp DNA ladder หรือ 100 bp DNA ladder

8.2.8. Loading dye ความเข้มข้น 6X

8.2.9. ชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป Nucleospin® Tissue Kit ประเทศเยอรมัน ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย ดังนี้

- สารละลาย T1 เป็นสารละลายสำหรับขั้น pre-lysis
- สารละลาย B3 เตรียมจากการผสมระหว่างสารละลาย B1 และ B2 เป็นสารละลายสำหรับในขั้น lysis
- สารละลาย BW เป็นสารละลายตัวที่ 1 สำหรับล้าง silica membrane column
- สารละลาย B5 เป็นสารละลายตัวที่ 2 สำหรับล้าง silica membrane column
- สารละลาย BE เป็นสารละลายสำหรับชะ DNA ออกจาก silica membrane column

8.2.10.น้ำยา real-time PCR สำเร็จรูป เช่น Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas), DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes), KAPA SYBR Green Fast Universal qPCR Kit (KAPA Biosystems), Brilliant II SYBR Green qPCR master mix (Stratagene)

ตาราง 1 แสดงลำดับเบสของ primer ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product

Bacteria	Primer name	Primer sequence (5′-3′)	Target gene	Product size (bp)
C. pneumoniae	CpnRT-F CpnRT-R	AGGGCTATAAAGGCGTTGCT CATGATAATTGATGGTCGCAGACT	*ompA*	90
M. pneumoniae	MpnRT-F MpnRT-R	TCAATCTGGCGTGGATCTCT CACCACATCATTCCCCGTATTA	*P1*	136

เชื้อมาตรฐาน

M. pneumoniae M129 (GenBank accession no. FJ603706)

C. pneumoniae koala (X72023)

วิธีดำเนินการ

วิธีสกัดสารพันธุกรรม DNA จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

1. นำ nasopharyngeal swab แช่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีสารละลาย T1 ปริมาตร 180 μl ทำการ vortex ประมาณ 5-6 ครั้ง เป็นเวลา ประมาณ 10 วินาที แล้ว นำ swab ทิ้งไป แต่ถ้าตัวอย่างเป็น nasopharyngeal aspirates ให้ทำการดูด aspirates ปริมาตร 200-300 μl ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml แล้วเติมสารละลาย T1 ปริมาตร 180 μl ลงไป ทำการผสมให้เข้ากันด้วย vortex

2. เติมเอนไซม์ Proteinase K ลงไปในปริมาตร 10 μl จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. เติมสารละลาย B3 ปริมาตร 150 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. เติมเอธิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 200 μl แล้วผสมให้เข้ากัน

5. ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมด ลงในหลอด silica membrane column จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6. เติมสารละลาย BW ปริมาตร 500 μl ลงในหลอด silica membrane column ดังกล่าว จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

7. เติมสารละลาย B5 ปริมาตร 600 μl ลงในหลอด silica membrane column จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

8. ทำการปั่นเหวี่ยงหลอด silica membrane column เปล่า ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง

9. ย้าย silica membrane column ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

10.ทำการชะ DNA ออกจาก silica membrane column ด้วยสารละลาย BE ปริมาตร 50 μl ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 1-2 นาที

11.ทำการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้ง silica membrane column

12. เก็บ DNA ที่ได้ ณ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวิเคราะห์ด้วย PCR ต่อไป

การทำ PCR: โดยสามารถเตรียมสารผสมสำหรับทำ PCR ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละองค์ประกอบ ดังแสดงในตารางดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2: แสดงความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมของ SYBR green real-time PCR master mix

PCR cycle สำหรับ real-time PCR

Pre-PCR ที่ 95 °C 7 นาที แล้วเข้าสู่รอบการทำ PCR ด้วย

Reagents	Final concentration	1x
Ddwater	--	6.5
2X SYBR Green real-time PCR master mix	1x	12.5
10 uM BP-B3	0.2 uM	0.5
10 uM BP-BF	0.2 uM	0.5
Template DNA	--	5
Total Volume	--	25

95 °C 15 วินาที

65 °C 25 วินาที จำนวน 45 รอบ

จากนั้นต่อด้วยการทำ dissociation analysis จำนวน 1 รอบ ดังนี้

95 °C 15 วินาที

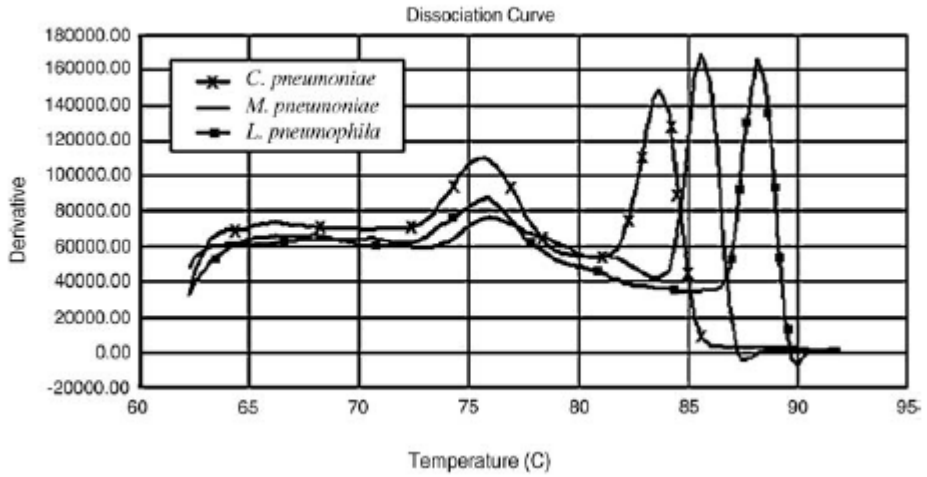
60 °C 1 นาที

95 °C 15 วินาที

เก็บรักษา PCR product ที่ได้ ณ อุณหภูมิ 4 °C

การวิเคราะห์ผล

กรณี SYBR green real-time PCR: ให้ทำการวิเคราะห์ค่า Tm ของ PCR product ว่าตรงกับตัวควบคุมผลบวกหรือไม่ คือ 82.8-84.3 องศาเซลเซียส และ 85.0-86.3 องศาเซลเซียส ถ้าผลที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับกับค่าอุณหภูมิดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่าในตัวอย้างสิ่งส่งตรวจนั้นมี DNA ของแบคทีเรีย *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างค่า Tm ของ PCR product จาก *C. pneumoniae* และ *M. pneumoniae* ด้วยวิธี SYBR green real-time PCR จากเครื่อง FAST 7500 Real-time PCR (Applied Biosystem, USA)

Protocol : **การวินิจฉัยแบคทีเรีย** *Mycoplasma pneumoniae* **โดยวิธี** Gel Particle Agglutination (GPA)

Method : gel particle agglutination [Serodia Myco II (PA) Lot. WP11121]

ขั้นตอนการทำ

1. หลุมที่เป็น Serum หยด Diluent 4 หยด ในหลุมที่ 1 (100 ul)
   ส่วนหลุมที่ 2-12 หยด Diluent หลุมละ 1 หยด
   หลุมที่เป็น control+ หยด Diluent หลุมที่ 3-12 หลุมละ 1 หยด (หลุมที่ 1 และหลุมที่ 2 ไม่ต้องหยด)
2. หลุมที่เป็น Serum ใส่ serum 25 ul ในหลุมที่ 1 Mix
   ดูด dilute serum 25 ul จากหลุมที่ 1 ไปหลุมที่ 2 Mix แล้วทำซ้ำไปเรื่อยๆ จนถึงหลุมที่ 12 Mix แล้วดูดทิ้ง 25 ul
3. หลุมที่เป็น control+ ใส่ Control+ ในหลุมที่ 2 25 ul
   ใส่ Control+ ในหลุมที่ 3 25 ul
   ดูด dilute serum 25 ul จากหลุมที่ 4 Mix แล้วทำซ้ำไปเรื่อยๆ จนถึงหลุมที่ 12 Mix แล้วดูดทิ้งไป 25 ul
4. หยด Unsensitized (จุกสีส้ม) ในหลุมที่ 2 ทั้ง Serum และ Control+
5. หยด Sensitized (จุกสีเทา) ในหลุมที่ 3-12 ทั้ง Serum และ Control+
6. Mix ข้าง plate วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล

ผลบวก **เกิด Agglutination ที่ 2+ มีการแผ่กระจากของตะกอน**

ผลลบ **ตกตะกอนเป็นเม็ดกระดุม ไม่แผ่กระจาย**

การรายงานผล

ผลบวก **อ่านค่าตาม Titer สุดท้ายที่ตกตะกอนเกิด agglutination ที่ 2+**

ผลลบ **ไม่มีการแผ่กระจากของตะกอนตั้งแต่หลุมที่ 3-12 รายงานผลเป็น** <1:40

Protocol : **การวินิจฉัยแบคทีเรีย** *Mycoplasma pneumoniae* **โดยวิธี** Qualitative Immunoenzymatic determination of IgM antibodies base on ELISA

Method : NovaTec *Mycoplasma penumoniae* ELISA qualitative determination of IgM class (product number: MYCM0350)

วิธีการตรวจหา antibody IgM **ต่อเชื้อ** *Mycoplasma pneumoniae*

1. เตรียม serum ที่จำทำการทดสอบหา antibody โดยเจือจาง serum เป็น 1:100 โดยใช้ IgM sample diluent 1000 ul และ serum 10 ul ปั่นด้วย vortex tube mixer
2. นำ microtiter stripsที่ coated ด้วย *Mycoplasma pneumonae* antigen ออกมาใช้ตามจำนวน sample ที่ต้องการจะทำ
3. สำหรับ controls ต่างๆ ให้เรียงตามลำดับดังนี้

   1 well (เช่น A1) สำหรับ substrate blank

   1 well (เช่น B1) สำหรับ negative control

   2 wells (เช่น C1 + D1) สำหรับ cut-off control

   1 well (เช่น E1) สำหรับ positive control
4. ทำตารางเขียนตำแหน่ง control และ samples ที่ต้องการทำ
5. ใส่ 100 ul ของ control + diluted samples ลงในแต่ละหลุมจนครบ และปิดด้วย foil
6. Incubate ที่ 37$\pm$1 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง $\pm$ 5 นาที
7. เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วเอา foil ที่ปิดออก แล้วทิ้งสารในแต่ละหลุมออกให้หมด ในแต่ละหลุมล้างด้วย washing solution 300 ul 3 ครั้ง เสร็จแล้วเคาะให้แห้งบนกระดาษทิชชู
8. ใส่ 100 ul *Mycoplasma penumoniae* anti-IgM conjugate ลงในหลุมทุกหลุมยกเว้นหลุมที่เป็นว่าง (A1) แล้วปิดด้วย foil แล้ว incubate ประมาณ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ห้ามโดนแสง
9. เมื่อครบ 30 นาทีแล้ว เอา foil ออกแล้วล้างในแต่ละหลุมเหมือนข้อ 8
10. ใส่ 100 ul TMB substrate solution ลงในทุกหลุม incubate 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องในที่มืด
14. เมื่อครบ 15 นาที ใส่ 100 ul ของ stop solution ลงในทุกหลุม จะพบการเปลี่ยนสีจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง
15. อ่านผลโดยใช้ spectrophotometer wave length 450/620 nanometer ภายใน 30 นาที

Protocol : **การวินิจฉัยแบคทีเรีย** *Chlamydia pneumoniae* **โดยการหา** antibody **ด้วยวิธี** Micro-Immunofluororescence test (MIF)

Method : Indirect immunofluorescent assay for detecting human serum IgM antibodies (MIF test product code IF1250M)

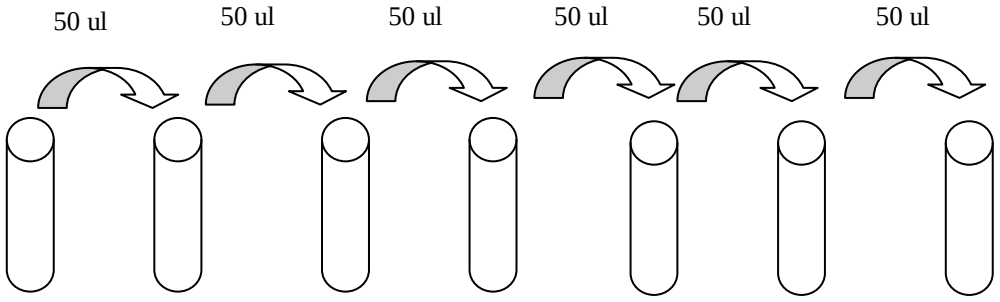
วิธีการตรวจหา antibody IgM **ต่อเชื้อ** *C. pneumoniae*

1. นำสไลด์ที่จุด antigen ไว้แล้วจากตู้แช่แข็ง -20 °C มาตากให้แห้งประมาณ 30 นาที
2. เตรียม serum ที่จะทดสอบหา antibody โดยทำเจือจาง serum ด้วย IgM Pretreatment Diluent 70 ul และ serum 10 ul เป็นความเจือจาง 1:8 ปั่นด้วยเครื่อง vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วิธีนี้เป็นการ absorb rheumatoid factor ใน serum
3. นำไปปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. ทำเจือจาง serum ที่ treat เสร็จด้วย PBS pH 7.2

   Dilute 1:16, 1:32, 1:64, 1:128…..

   Dilute 1:16 ใช้ serum ที่ absorb แล้ว 50 ul + PBS 50 ul

   <u>วิธีทำเจือจาง serum</u>



PBS ที่ absorb แล้ว	PBS 50 ul	PBS 50 ul	PBS 50 ul	PBS 50 ul	PBS 50 ul	PBS 50 ul
1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512

5. เมื่อเจือจาง serum เสร็จแล้วหยด serum ที่ dilution ต่างๆ ลงบนสไลด์ที่มี antigen โดยสไลด์ 1 แผ่นทดสอบได้ 10 ตัวอย่าง
6. นำไปอบใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 90<u>+</u>2 นาที

7. นำสไลด์ออกมาล้างด้วย PBS pH 7.2 และปั่นล้างโดยใช้ magnetic stirrer นานประมาณ 10 นาที
8. ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับใต้สไลด์ให้แห้งแล้วเป่าด้วยพัดลมให้แห้งประมาณ 30 นาที
9. หยด IgM Conjugate ลงไปบนแผ่นสไลด์
10. นำไปอบใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20±2 นาที
11. นำสไลด์ออกมาล้างด้วย PBS pH 7.2 และปั่นล้างโดยใช้ magnetic stirrer นานประมาณ 10 นาที
12. ล้างด้วยน้ำกลั่น ซับใต้สไลด์ให้แห้งแล้วเป่าด้วยพัดลมให้แห้งประมาณ 30 นาที
13. ทำ wet mount ด้วย mouting fluid ปิดทับด้วย cover slip ขนาด 22x50 mm
14. นำไปดูผลการเรืองแสงภายใต้กล้อง fluorescence กำลังขยาย 40x

วิธีการตรวจหา antibody IgG ต่อเชื้อ *C. pneumoniae*

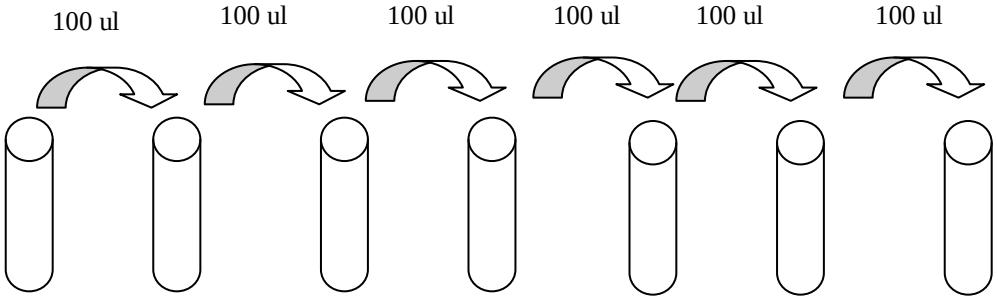
1. เตรียม serum ที่จะวิเคราะห์หา antibody โดยเจือจางด้วยสารละลาย PBS pH 7.2 ทำ two-fold dilution ดังนี้ 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128

การทำเจือจาง 1:8 ใช้ serum 1 ส่วน = 25 ul

PBS 7 ส่วน = 175 ul

รวม 8 ส่วน = 200 ul

<u>วิธีทำเจือจาง serum</u>



PBS 350 ul + serum 50 ul	PBS 100 ul	PBS 100 ul	PBS 100 ul	PBS 100 ul	PBS 100 ul	PBS 100 ul
1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512

2. เมื่อเจือจาง serum ผู้ป่วย, positive control, negative control เรียบร้อยแล้วให้หยดลงบนสไลด์ที่มี antigen โดยสไลด์ 1 แผ่นทดสอบได้ 5 ตัวอย่าง
3. นำไปอบใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที
4. นำสไลด์ออกมาล้างด้วย PBS pH 7.2 และปั่นโดยใช้ magnetic stirrer นาน 10 นาที
5. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น ซับใต้สไลด์ให้แห้งแล้วเป่าด้วยพัดลมให้แห้งประมาณ 30 นาที
6. หยด IgG conjugate
7. นำไปอบใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที
8. นำสไลด์ออกมาล้างด้วย PBS pH 7.2 และปั่นโดยใช้ magnetic stirrer นาน 10 นาที
9. ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับใต้สไลด์ให้แห้งแล้วเป่าด้วยพัดลมให้แห้ง
10. ทำ wet mount ด้วย mouting fluid ปิดทับด้วย cover slip ขนาด 22x50 mm
11. นำไปดูผลการเรืองแสงภายใต้กล้อง fluorescence กำลังขยาย 40x

วิธีการคำนวณและการแปลผลการวิเคราะห์

ดูผลบวกจากความเข้มข้นของแสง fluorescence ดังนี้

2^+ - 3^+	=	EB มีการเรืองแสงเห็นเป็น brigh apple-green
1^+	=	EB มีการเรืองแสงเล็กน้อย
Neg	=	ไม่มีการเรืองแสงของ EB เลย

ถ้าผลบวกแสดงว่าใน serum ของผู้ป่วยมี antibody ต่อเชื้อ *Chlamydia*

ถ้าผลลบแสดงว่าใน serum ของผู้ป่วยไม่มี antibody ต่อเชื้อ *Chlamydia*

การรายงานผล

ให้รายงานผลบวกโดยดูจาก titer ของ serum ผู้ป่วยที่เรืองแสง fluorescence เป็น titer สุดท้าย และบอกชนิดของ antibody ว่าเป็น IgM หรือ IgG

เลขที่ ID……

<u>แบบบันทึกข้อมูล</u>

เรื่อง ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

(Prevalence of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* in Adult with Prolonged Cough)

1) เพศ ☐ 1. ชาย ☐ 2. หญิง
2) อายุ.....ปี
3) อาชีพ .....
4) โรคประจำตัว 0. ไม่มี.....☐ 1. มี.....
5) ระยะเวลาของอาการป่วย ……วัน
6) อาการร่วม
   - น้ำหนักลด (weight loss) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - เสียงแหบ (hoarseness) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - ปวดศีรษะ (headache) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - การนอนหลับผิดปกติ (sleep disturbance) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - หายใจลำบาก (whooping cough) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - น้ำมูกไหล ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ (Influenza-like symptoms) ☐ 0 มี 1 ไม่มี
   - จามเป็นชุดๆ (sneezing attack) ☐ 0 มี ☐ 1 ไม่มี
   - อาการอื่นๆ ☐ 0 มี รายละเอียด…… … 1 ไม่มี
7) การวินิจฉัยที่ได้รับมาก่อนหน้าเข้าร่วมวิจัย ที่เกี่ยวกับสาเหตุของอาการไอเรื้อรัง
   - ☐ 1 ภูมิแพ้ (allergy)
   - ☐ 2 โรคกรดไหลย้อน (GERD)
   - ☐ 3 หลอดลมอักเสบ (bronchitis)
   - ☐ 4 หอบหืด (asthma)
   - ☐ 5 อาการไอตามหลังการติดเชื้อ (post-infectious cough)
   - ☐ 6 ไม่ทราบสาเหตุ (unknown)
   - ☐ 7 โรคถุงลมโป่งพอง
   - ☐ 8 อื่นๆ (others) .....

8) การรักษาหรือยาที่ได้รับมาก่อน (previous treatment)

- ☐ 0 ไม่ได้รับยา
- ☐ 1ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) รายละเอียด .....
- ☐ 2 ยารักษาตามอาการ (supportive treatment) รายละเอียด…….

9) ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้น

- ☐ 0 ไม่มี
- ☐ 1 กลั้นปัสสาวะไม่ได้ (urinary incontinence)
- ☐ 2 กระดูกซี่โครงหัก (rib fracture)
- ☐ 3 ลมรั่วในเยื่อหุ้มปอด (pneumothorax)
- ☐ 4 ไส้เลื่อน (inguinal hernia)
- ☐ 5 ชัก (seizure)
- ☐ 6 หูอักเสบ หรือ การได้ยินลดลง (otitis media or hearing loss)
- ☐ 7 carotid artery dissection
- ☐ 8 อื่นๆ (others) ……..

10) เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นปอดอักเสบหรือไม่ ☐ 0 เป็น 1 ไม่เป็น

11) เงินที่สูญเสียไป ตั้งแต่เริ่มเจ็บป่วย .....บาท

12) ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Nasopharyngeal swab for *M. pneumoniae* ☐ 0 ลบ ☐ 1 บวก

Nasopharyngeal swab for *C. pneumoniae* ☐ 0 ลบ ☐ 1 บวก

serum sample for Antibodies to *M. pneumoniae* ☐ 0 ลบ ☐ 1 บวก

serum sample for Antibodies to *C. pneumoniae* ☐ 0 ลบ ☐ 1 บวก

{ให้ผลบวก คือ four-fold rising in acute and convalescent phase (paired serum) หรือ agglutinin titer ≥ 3SD (single serum)}

13) การวินิจฉัยสุดท้าย

☐ 1. ติดเชื้อ *M. pneumoniae* (อธิบาย……...)

☐ 2. ไม่ได้ติดเชื้อ *M. pneumoniae* (อธิบาย……)

☐ 1. ติดเชื้อ *C. pneumoniae* (อธิบาย……)

☐ 2. ไม่ได้ติดเชื้อ *M. pneumoniae* (อธิบาย……)

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย** (Information sheet for research participant)

ชื่อโครงการวิจัย ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

แพทย์ผู้ทำวิจัยหลัก

แพทย์หญิง พรวิมล ลี้ทอง

ที่อยู่ หน่วยโรคติดเชื้อ ตึกอายุรศาสตร์ชั้น 1 รพ.จุฬาลงกรณ์ เบอร์โทรศัพท์ 081-7782578

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

ศาสตราจารย์นายแพทย์ ธีระพงษ์ ตัณฑวิเชียร

ที่อยู่ หน่วยโรคติดเชื้อ ตึกอายุรศาสตร์ชั้น 1 รพ.จุฬาลงกรณ์ เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4578

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

ท่านได้รับเชิญให้เข้าร่วมโครงการวิจัยเรื่อง “ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง” เนื่องจากท่านมาพบแพทย์ด้วยอาการไอเรื้อรัง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตามก่อนที่ท่านตกลงเข้าร่วมการศึกษาดังกล่าว ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียด เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ หากท่านมีข้อสงสัยใด ๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้ ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารฉบับนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักจากการศึกษาในครั้งนี้คือการตรวจหาความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ โดยนำข้อมูลจากการตรวจพบมาวิเคราะห์ เพื่อเป็นข้อมูลเชิงระบาดวิทยา เพื่อนำไปสู่การป้องกัน การวินิจฉัย และการรักษาที่รวดเร็วขึ้น เพื่อลดภาวะ แทรกซ้อน และผลกระทบของความเจ็บป่วยต่อผู้ป่วย ครอบครัว เศรษฐกิจและสังคม

จำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย คือ 100 คน

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้เข้าร่วมในการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่มีอายุ มากกว่า 18 ปี
2. ผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรัง มากกว่า 2 สัปดาห์

เกณฑ์การไม่รับผู้เข้าร่วมในการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี, ผู้ที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายไขกระดูกหรือได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ, ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน
2. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นปอดอักเสบติดเชื้อ วัณโรค หรือโรคเกี่ยวกับหลอดลม ที่ได้รับการรักษาอยู่หรือ รูปแบบการไอไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจาก 1 เดือนที่ผ่านมา
3. ผู้ป่วยที่ได้รับยาที่เป็นสาเหตุของการไอ เช่น ยาลดความดันโลหิตกลุ่ม ACEI
4. ผู้ป่วยที่พบมีความผิดปกติของรังสีวิทยาทรวงอก

หากท่านมีคุณสมบัติที่เหมาะสมและยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ สิ่งส่งตรวจที่ใคร่ขอความอนุเคราะห์จากท่านคือ

1. สิ่งส่งตรวจจากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูก (nasopharygeal swab) สำหรับการตรวจหาเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิ (*C. pneumoniae*) และเชื้อมัยโคพลาสมานิวโมนิอิ (*M. pneumoniae)*
2. เลือดปริมาณ 5 ซีซี (1 ช้อนชา) และตรวจเลือดอีกครั้งปริมาณเท่าเดิม (ประมาณ 2 สัปดาห์หลังจากครั้งแรก)

ความเสี่ยงที่ได้รับจากการเจาะเลือด

ท่านมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ เลือดออก อาการช้ำจากการเจาะเลือด อาการบวมบริเวณที่เจาะเลือดหรือหน้ามืดเป็นลม และโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อบริเวณที่เจาะเลือดพบได้น้อยมาก หากท่านมีภาวะแทรกซ้อนต่างๆเกิดขึ้น ท่านจะได้รับการดูแล ปฐมพยาบาลเบื้องต้นอย่างถูกต้องและใกล้ชิดอย่างทันทีโดยแพทย์ผู้ทำการวิจัยและท่านจะได้รับการดูแลต่อเนื่องจนกว่าจะหายจากการบาดเจ็บ และค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นจากการที่ท่านได้รับบาดเจ็บจากการวิจัยนี้ แพทย์ผู้ทำการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

ประโยชน์ที่อาจได้รับ

ท่านจะได้รับการตรวจหาการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิ ซึ่งอาจพบได้ในผู้ป่วยที่มีอาการไอเรื้อรัง ซึ่งการติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถรักษาหายได้ โดยวินิจฉัยจากการตรวจหาเชื้อจากสารคัดหลั่งหลังโพรงจมูกและตรวจเลือดเพื่อหาระดับภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ และในการศึกษานี้ไม่มีค่าชดเชยจากการเดินทางและค่าเสียเวลาแก่อาสาสมัคร แต่คาดว่าผู้ป่วยจะได้ประโยชน์จากโอกาสที่จะตรวจพบเชื้อจากอาการไอเรื้อรัง และถ้าผู้วิจัยพบความผิดปกติจากการตควจดังกล่าวท่านจะได้รับการรักษาและดูแลต่อเนื่องโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคติดเชื้ออย่างสม่ำเสมอ และถ้าพบความผิดปกติอื่นนอกเหนือจากนี้ท่านจะได้รับการปรึกษาจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านอย่างทันที

ข้อปฏิบัติของท่านขณะที่ร่วมโครงการวิจัย

- ท่านต้องให้ข้อมูลทางการแพทย์ของท่านทั้งในอดีต และปัจจุบัน แก่แพทย์ผู้ทำวิจัยด้วยความสัตย์จริง

- ท่านต้องแจ้งให้แพทย์ผู้ทำวิจัยทราบถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นระหว่างที่ท่านร่วมในโครงการวิจัย

การเซ็นชื่อในเอกสารฉบับนี้ไม่ได้หมายความว่าท่านได้สละสิทธิ์ทางกฎหมาย ตามปกติที่ท่านพึงมีในกรณีที่ท่านได้รับอันตรายใดๆ หรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัย ท่านสามารถติดต่อกับผู้ทำวิจัย ได้ตลอด 24 ชั่วโมง เบอร์โทรติดต่อ 081-7782578

ค่าใช้จ่ายสำหรับอาสาสมัครที่จะเข้าร่วมในการวิจัย

ท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายใด ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการส่งตรวจ nasopharyngeal swab for *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* และการส่งตรวจเลือดหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *M. pneumoniae* และ *C. pneumoniae* จากการศึกษาวิจัยนี้ ค่าวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการผู้สนับสนุนการวิจัยจะเป็นผู้รับผิดชอบทั้งหมด

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ ระยะเวลาที่อาสาสมัครแต่ละคนต้องอยู่ในโครงการเป็นระยะเวลา 2-4 สัปดาห์ โดยท่านต้องมาพบผู้วิจัย 2 ครั้ง ครั้งแรกคือวันที่ท่านยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยและแพทย์ผู้วิจัยจะนัดมาตรวจเลือดซ้ำอีกครั้ง โดยห่างจากครั้งแรกอย่างน้อย 2 สัปดาห์แต่ไม่เกิน 4 สัปดาห์ โดยระยะเวลาที่ใช้ในการร่วมโครงการแต่ละครั้งประมาณ

1 ชั่วโมง และหากท่านไม่สมัครใจจะเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของท่านแต่อย่างใด

การปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลที่อาจนำไปสู่การเปิดเผยตัวของท่าน จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณะชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของท่านจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของท่าน

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัย และผู้สนับสนุนการวิจัยมีสิทธิ์สามารถเข้าไปตรวจสอบข้อมูลทางการแพทย์ของท่านได้ตลอดเวลาแม้จะสิ้นสุดโครงการวิจัยแล้วก็ตาม หากท่านต้องการยกเลิกการให้สิทธิ์ดังกล่าว ท่านสามารถเขียนบันทึกขอยกเลิกการให้คำยินยอม โดยส่งไปที่ แพทย์หญิงพรวิมล ลี้ทอง หน่วยโรคติดเชื้อ ตึกอายุรศาสตร์ชั้น 1 รพ.จุฬาลงกรณ์

หากท่านขอยกเลิกการให้คำยินยอมหลังจากที่ท่านได้เข้าร่วมโครงการวิจัยแล้ว ข้อมูลส่วนตัวของท่านจะไม่ถูกตรวจสอบเพิ่มเติม อย่างไรก็ตามข้อมูลอื่น ๆ ของท่านอาจถูกนำมาใช้เพื่อประเมินผลการวิจัย

จากการลงนามยินยอมของท่านแพทย์ผู้ทำวิจัยสามารถบอกรายละเอียดของท่านที่เกี่ยวกับการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ให้แก่แพทย์ผู้รักษาท่านได้

สิทธิ์ของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้ร่วมในโครงการวิจัย ท่านจะมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับระเบียบวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่จะได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่ท่านอาจจะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้
7. โดยผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถขอถอนตัวจากโครงการโดยไม่ได้รับผลเสียใดๆ ทั้งสิ้น
8. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารใบยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
9. ท่านมีสิทธิ์ในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับ ข่มขู่ หรือการหลอกลวง

หากท่านมีข้อสงสัยต้องการสอบถามเกี่ยวกับสิทธิของท่าน หรือผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่เขียนไว้ในเอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมในการวิจัย ท่านสามารถติดต่อ หรือร้องเรียนได้ที่ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึกอานันทมหิดล ชั้น 3 หรือที่หมายเลขโทรศัพท์ 0-2256-4455 หรือ 0-2256-4493 ต่อ 13 หรือ 14 ในเวลาราชการ

ขอขอบคุณในการร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	**เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย**

การวิจัยเรื่อง ความชุกของการติดเชื้อคลามิเดียนิวโมนิอิและมัยโคพลาสมานิวโมนิอิในผู้ใหญ่ที่มีอาการไอเรื้อรัง

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ. ……

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว..... อายุ .....ปี HN……..... ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาและข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและ วันที่ พร้อมด้วยเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายที่อาจเกิดขึ้น รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย และแนวทางการรักษาอย่างละเอียด ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความเต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลและการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยหรือผู้ได้รับอำนาจมอบหมายให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัย เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าและสามารถเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัย รวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ในอนาคตเท่านั้น

ข้าพเจ้ายินดีลงนามในเอกสารยินยอมนี้เพื่อเข้าร่วมการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ยินยอม

(.....) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ……. หมายเลขโทรศัพท์…….

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัยตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

..... ลงนามผู้ทำวิจัย ..... ลงนามพยาน

(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย (.....) ชื่อพยานตัวบรรจง

วันที่ ..... เดือน..... พ.ศ…….. วันที่ ..... เดือน..... พ.ศ……

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ แพทย์หญิง พรวิมล ลี้ทอง

วัน เดือน ปี เกิด 28 ธันวาคม พ.ศ. 2518 จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

นิสิตคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2536-2539
นิสิตคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2541-2546
แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชสระแก้ว	2546-2547
แพทย์ใช้ทุน โรงพยาบาลวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว	2547-2549
แพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2549-2552
นายแพทย์ชำนาญการ แผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลสมุทรปราการ	2552-2553
แพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขาวิชาโรคติดเชื้อ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2553-ปัจจุบัน

ปริญญาและประกาศนียบัตร

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2540
แพทยศาสตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2546
ประกาศนียบัตรบัณฑิต วิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2550
วุฒิบัตรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญสาขาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์	2552

สมาชิกสมาคมวิชาชีพ

สมาชิกราชวิทยาลัยอายุรแพทย์แห่งประเทศไทย

สมาชิกแพทยสภา

สมาชิกสมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย