

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความไวของการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง และความไวของการตรวจจาก
น้ำล้างปอดโดยการย้อมสีวิธีต่าง ๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และพีซีอาร์
เพื่อการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซีในผู้ป่วยเอดส์




นางสาว ฌัษฎิภา กองพลพรหม

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON STUDY BETWEEN SENSITIVITY OF DIFFERENT STAINING METHODS AND
IMMUNOFLUORESCENT STAINING AND PCR OF THREE INDUCED SPUTUM EXAM AND
BAL FOR DIAGNOSIS OF PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA IN AIDS



Miss Napplika Kongpolprom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความไวของการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง
และความไวของการตรวจจากน้ำล้างปอด โดยการย้อมสีวิธีต่าง ๆ
อิมมูโนฟลูออเรสเซนและพีซีอาร์ เพื่อการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติส
ซิโรเวคซีในผู้ป่วยเอดส์

โดย นางสาว ณัฏผลิกา กองพลพรหม

สาขาวิชา อายุรศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กมล แก้วกิตติณรงค์

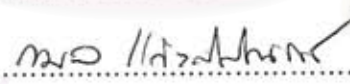
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์

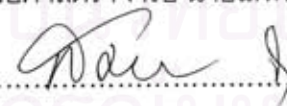
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักศึกษานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

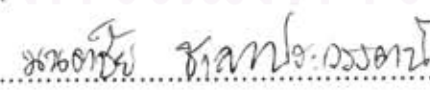

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

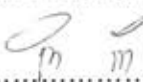
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อานินทร์ อินทรกำธรชัย)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ กมล แก้วกิตติณรงค์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์ชัย ชลาประวรัตน์)


..... กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล)

ณัฏผลิกา กองพลพรหม : การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความไวของการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง และความไวของการตรวจจากน้ำล้างปอด โดยการย้อมสีวิธีต่าง ๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และพีซีอาร์ เพื่อการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์ (COMPARISON STUDY BETWEEN SENSITIVITY OF DIFFERENT STAINING METHODS AND IMMUNOFLUORESCENT STAINING AND PCR OF THREE INDUCED SPUTUM EXAM AND BAL FOR DIAGNOSIS OF PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA IN AIDS) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.นพ. กมล แก้วกิติณรงค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.นพ. สมชาย จงวุฒิเวศย์, 76 หน้า.

ที่มา ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีเป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยและการตายที่สำคัญในผู้ป่วยเอดส์ การวินิจฉัยปอดติดเชื้อนี้ขึ้นกับอาการทางคลินิก การตรวจร่างกาย ผลภาพรังสีของปอด และผลตรวจเชื้อจากเสมหะหรือน้ำล้างปอด การตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอดเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการวินิจฉัย แต่เป็นวิธีการที่ invasive การตรวจเชื้อจากเสมหะเป็นวิธี noninvasive ใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่ได้ผลดีเช่นกัน ซึ่งก่อนหน้านี้นี้มีเพียงการศึกษาเดียว ที่ศึกษาบทบาทการส่งเสมหะย้อมสีหลายๆ ครั้งเพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัย แต่ไม่มีการเปรียบเทียบความไวที่ได้กับการตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความไวของการตรวจเชื้อจากเสมหะและจากน้ำล้างปอด โดยการย้อมสี ยิมซา โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูอิดินบลูโอ วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซน และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (พีซีอาร์)
2. เพื่อศึกษาการเพิ่มความไว ในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยการส่งตรวจเสมหะ 3 ครั้ง โดยการย้อมสี และวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซน และพีซีอาร์ เปรียบเทียบกับการส่งตรวจเสมหะ 1 ครั้ง
3. เพื่อเปรียบเทียบความไวการส่งตรวจเสมหะ 3 ครั้งกับความไวการตรวจเชื้อจาก น้ำล้างปอด

วิธีการศึกษา เป็นการศึกษาแบบไปข้างหน้า ในผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางคลินิกและภาพรังสีปอดเข้าได้กับการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยตรวจหาเชื้อจากเสมหะ 3 ครั้ง และ ส่งกล้องเพื่อตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอด นำมาย้อมสีชนิดต่างๆ การตรวจด้วยวิธีอิมมูโน ฟลูออเรสเซน และวิธีพีซีอาร์ เก็บข้อมูลความไวของการตรวจแต่ละวิธี นำผลที่ตรวจได้มาเปรียบเทียบกัน

ผลการศึกษา การตรวจเสมหะด้วยวิธีพีซีอาร์ มีความไวมากกว่า อิมมูโนฟลูออเรสเซน โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูอิดินบลูโอและ ยิมซา ตามลำดับ การตรวจเสมหะ 3 ครั้ง มีความไวเพิ่มขึ้นมากกว่าการตรวจครั้งเดียว โดยการย้อมยิมซาเพิ่มความไวจากร้อยละ 22.9 เป็น 40 โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ ร้อยละ 60 เป็น 77.1 โทลูอิดินบลูโอ ร้อยละ 51.4 เป็น 62.9 อิมมูโนฟลูออเรสเซน ร้อยละ 77.1 เป็น 88.6 และ พีซีอาร์ ร้อยละ 88.6 เป็น 91.4 การตรวจเชื้อจากเสมหะโดยใช้หลายวิธีมีความไวมากกว่าวิธีเดียว และถ้าตรวจหลายวิธี 3 ครั้งจะมีความไวใกล้เคียงกับการตรวจจากน้ำล้างปอด โดยถ้าตรวจ 2 วิธี การตรวจโกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์กับโทลูอิดินบลูโอจะมีความไวมากที่สุด ร้อยละ 74.3 การตรวจหาเชื้อจากน้ำล้างปอดมีความไวสูง และไม่แตกต่างกันในแต่ละวิธีโดยมีความไวร้อยละ 94-97.1

ภาควิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต	<i>ณัฏผลิกา กองพลพรหม</i>
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	<i>ดร. กมล แก้วกิติณรงค์</i>
ปีการศึกษา	2549	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	<i>สมชาย จงวุฒิเวศย์</i>

4874729030 : MAJOR MEDICINE (PULMONARY)

KEYWORD : PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA / SPUTUM INDUCTION / BRONCHOALVEOLAR LARVAGE /CYTOCHEMICAL STAIN /IMMUNOFLORESCENT ASSAY /POLYMERASE CHAIN REACTION

NAPPLIKA KONGPOLPROM : COMPARISON STUDY BETWEEN SENSITIVITY OF DIFFERENT STAINING METHODS AND IMMUNOFLORESCENT STAINING AND PCR OF THREE INDUCED SPUTUM EXAM AND BAL FOR DIAGNOSIS OF PNEUMOCYSTIS PNEUMONIA IN AIDS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KAMON KAWKITINARONG, M.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMCHAI JONGWUTIWES. 76 pp.

Background. PCP remains an important cause of morbidity and mortality in AIDS. Bronchoscopy with BAL is gold standard procedure for PCP diagnosis. Sputum induction has been proposed as noninvasive procedure but less sensitivity than BAL . A variety of staining methods and PCR have been used to detect P. carinii. Multiple induced sputa could increase diagnostic yield and may be comparable to BAL fluid .

Objectives.

1. To compare the sensitivity of cytochemical stains with immunofluorescent stain and PCR in detecting P.carinii.
2. To compare the sensitivity of PCP detection using one induced sputum and three induced sputa.
3. To compare the sensitivity of PCP detection using BAL fluid and three induced sputa.

Design. Descriptive study

Methods. A prospective study was conducted in thirty five patients with HIV infection who suspected PCP at King Chulalongkorn Memorial hospital from March to November ,2006. PCP was diagnosed by finding organism plus symptoms, chest radiography consistent with PCP and clinical response to standard treatment. Three times of sputum induction and then bronchoscopy were performed in each patients to collect sputa and BAL fluid. The specimens were stained with Giemsa , GMS, Toluidine blue O , IFA and PCR to identify the causative organism.

Results. PCR staining had highest sensitivity (88.6%) whereas Giemsa stain showed lowest sensitivity (22.9%). Higher diagnostic yields can be achieved by multiple sputa and multiple staining methods were used. Sensitivities of 4 different staining methods and PCR of BAL fluid were high and not different. When multiple sputa were stained at least 2 methods ,sensitivities was increased and comparable outcome to BAL fluid. No serious adverse event was observed in sputum induction ,confirming that this procedure was a very well-tolerated . One case developed respiratory failure during bronchoscopy . Additionally, sputum induction exerted lower costs.

Conclusions. Compared with bronchoscopy, 3 induced sputa offered many advantages in terms of diagnostic yield , safety and cost. Sputum induction provides an alternative procedure to bronchoscopy with BAL in the diagnosis of PCP.

Department Medicine Student's signature Naplika Kongpolprom
 Field of study Medicine Advisor's signature Kamon Kawkitinarong
 Academic year 2006 Co-advisor's signature Somchai Jongwutiwes

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามดังต่อไปนี้ที่ได้ให้ความช่วยเหลือแก่ผู้วิจัยจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์กมล แก้วกิติณรงค์ และคณาจารย์ในสาขาวิชาโรคระบบการหายใจและภาวะวิกฤติระบบหายใจ ภาควิชาอายุรศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ ติดตาม ผลการวิจัยมาโดยตลอด และ ตรวจทานแก้ไขบทความตลอดมา

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ สมชาย จงวุฒิเวศย์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ความรู้ และติดตาม ผลการวิจัยมาโดยตลอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดอกเตอร์จตุรงค์ พุทธิพรทิพย์ ที่ได้ให้ความรู้ ทักษะ ทางด้านการใช้ เทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมดีเอ็นเอของเชื้อนิวโมซิสติดิส จีโรเวซี

คุณทวีศักดิ์ แซ่เตีย ช่วยตรวจเชื้อโดยการย้อมสี ตรวจ IFA และพีซีอาร์ในงานวิจัยนี้

คุณदारรุ่ง ศิลาจรรย์ และเจ้าหน้าที่ในหน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ทุกท่าน ช่วยในการจัดเตรียมการเก็บส่งตรวจทั้งหมด

คุณรวีรัตน์ พัฒราภรณ์ ช่วยในการกระตุ้นเตือน ประสานงาน และจัดพิมพ์รูปแบบของวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง

ภาควิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาปรสิตวิทยา

ผู้ช่วยในการศึกษานี้ทุกท่าน

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ สนับสนุนทุนวิจัยส่วนใหญ่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ฅ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale).....	1
คำถามการวิจัย (Research Question)	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)	2
สมมติฐาน (Hypothesis)	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
กรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)	4
ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)	4
ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)	5
ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and Application)	5
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve The Problems)	5
2 ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี.....	6
ประวัติความเป็นมาของเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี	6
วงจรชีวิตของเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี	8
ระบาดวิทยาของเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี	9
อาการทางคลินิก.....	9
วิธีตรวจเชื้อเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี.....	12

บทที่	หน้า
3. ทบทวนวรรณกรรมการตรวจเชื้อ นิวโมซิสติดิสซิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์.....	14
4. ความรู้พื้นฐานทาง Phylogenetics และ Molecular typing ของเชื้อนิวโมซิสติดิสซิโรเวคซี.....	20
5. วิธีดำเนินการวิจัย	26
รูปแบบการวิจัย (Research Design)	26
ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)	26
การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	38
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)	38
ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)	38
6. ผลการศึกษา	39
7. การอภิปรายผลการศึกษา	47
8. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	54
รายการอ้างอิง	58
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก ที่มาของข้อตกลงเบื้องต้นของผู้ป่วยที่มีอาการ สงสัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิสซิโรเวคซี	69
ภาคผนวก ข แบบฟอร์มการบันทึกข้อมูลผู้ป่วย.....	71
ภาคผนวก ค แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม	73
ประวัติผู้ทำวิทยานิพนธ์	76

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงข้อแตกต่างของการตรวจแต่ละวิธีสำหรับการตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี.....	13
2 การศึกษาโดยการส่องกล้องเพื่อตัดเนื้อเยื่อปอด(TBB) Brush BAL(ล้างปอด) เพื่อตรวจเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี	15
3 การศึกษาการตรวจเชื้อ นิวโมซิสติสจิโรเวคซี จากเสมหะ และ น้ำล้างปอด.....	16
4 ประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากตัวอย่างน้ำล้างปอด.....	18
5 ประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จากตัวอย่างเสมหะ.....	19
6 genetic divergence ของเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี ที่ก่อโรคใน.....	22
7 แสดงITS1 และ ITS 2.....	23
8 แสดงจำนวนผู้ป่วยและจำนวนครั้งที่เก็บเสมหะหรือน้ำล้างปอดได้.....	41
9 แสดงระยะเวลาที่ส่งตรวจ specimen (จำนวนวัน) หลังให้ยารักษา PCP.....	42
10 แสดงความไวการตรวจเสมหะและน้ำล้างปอดด้วยการย้อมสีชนิดต่างๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (n=35).....	42
11 แสดงความไวการตรวจเสมหะและน้ำล้างปอดด้วยการย้อมสี ชนิดต่างๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะหรือน้ำล้างปอดที่เก็บได้เท่านั้น.....	43
12 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะหรือเมื่อส่องกล้องตรวจน้ำล้างปอด.....	44
13 เปรียบเทียบความไวการตรวจเสมหะ 3 ครั้งในแต่ละวิธี กับการตรวจน้ำล้างปอด.....	44
14 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะ โดยการย้อมสี 2-4 วิธี และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (n=35).....	45
15 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะ โดยการย้อมสี 2-4 วิธี และ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะที่เก็บได้เท่านั้น.....	45
16 เปรียบเทียบความไวที่เพิ่มขึ้นจากการย้อมด้วยอิมมูโนฟลูออเรสเซน และการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (n=35)	46

17	แสดงรายงานการศึกษาถึงการสัมผัสผู้ป่วยที่เป็น PCP มาก่อน และติดเชื้อ PCP ตามมาภายหลัง.....	50
----	--	----



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	Chagas evolutive cycle scheme of Trypanosoma	7
2	วงจรชีวิตเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	8
3	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	10
4	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	10
5	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	10
6	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	11
7	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	11
8	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	11
9	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	11
10	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	12
11	ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี.....	12
12	แผนภูมิแท่งแสดง genotype ของเชื้อนิวโมซิสติสจิริโรเวคซี ในประเทศไทย	21
13	A การผ่าเหล่าในยีน DHPS(dihydropteroate synthase) กับความสัมพันธ์ ของการดื้อยา sulfonamide.....	21
	B ตำแหน่งเบสที่พบการผ่าเหล่าในยีน DHPS (dihydropteroate synthase)	21
	C ความสัมพันธ์ของผลการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสกับ การผ่าเหล่าในยีน DHPS.....	21
14	แสดงความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ PCP เปรียบเทียบ ระหว่าง wild type กับ DHPS mutation	25
15	Ultrasonic nebulizer	29
16	วิธี Cytoentrifuge	30
17	Bronchoscope.....	30
18	การย้อมสีอีมีซา.....	31
19	การย้อมโกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์	32
20	การย้อมโทลูอิดินบลูโอ	33
21	อิมมูโนฟลูออเรสเซน	34
22	การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	38

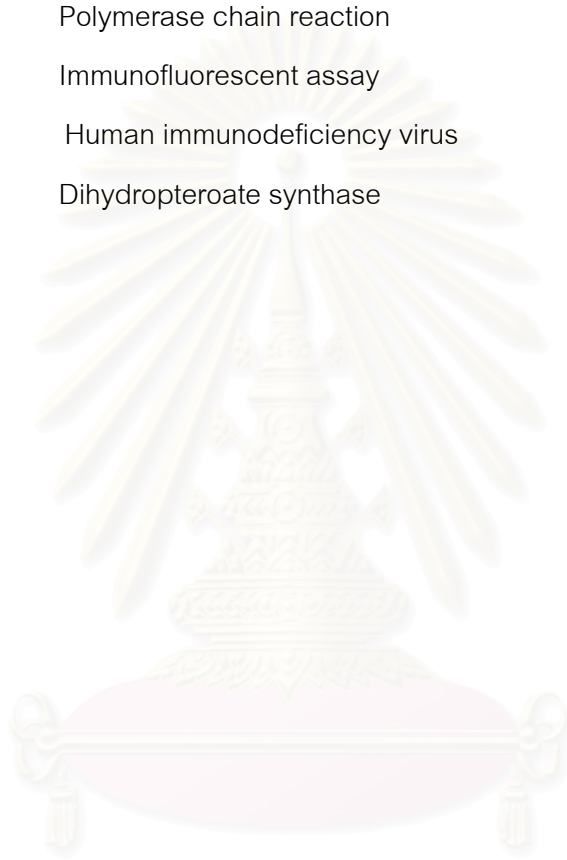
รูปที่	หน้า
23	แสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มอาการตามเกณฑ์ข้อตกลงการวินิจฉัย ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี.....41
24	แสดงราคาการส่งตรวจเสมหะ การส่องกล้อง และการตรวจเชื้อโดยวิธีต่างๆ ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์53
25	ขั้นตอนการวินิจฉัยการติดเชื้อ PCP.....57
26	แผนภูมิรูปภาพแสดงจำนวนผู้ป่วย (%) ที่มีอาการต่างๆ ของปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรเวคซี.....69
27	แผนภูมิแท่งแสดงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มมีอาการจนได้รับการวินิจฉัยของผู้ป่วยแต่ละราย...70



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PCP	Pneumocystis carinii pneumonia
PJP	Pneumocystis jiroveci pneumonia
GMS	Gomori methenamine silver
PCR	Polymerase chain reaction
IFA	Immunofluorescent assay
HIV	Human immunodeficiency virus
DHPS	Dihydropteroate synthase



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีเป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยและการตายที่สำคัญในผู้ป่วยเอดส์[1,2] ถึงแม้ว่าในยุคปัจจุบันซึ่งมีการใช้ยาต้านไวรัสหลายขนานที่มีประสิทธิภาพสูง (Highly active retroviral therapy, HAART Era) ทำให้อุบัติการณ์การติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีลดลงก็ตาม แต่ยังคงเป็นปัญหาการติดเชื้อที่สำคัญของผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย โดยความชุกของปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีในประเทศไทยพบประมาณร้อยละ 27-40

การวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีต้องอาศัยอาการทางคลินิก การตรวจร่างกาย ผลภาพรังสีวิทยาของปอด และผลการตรวจเสมหะหรือน้ำล้างปอด ถึงแม้ว่าผู้ป่วยโรคเอดส์ที่สงสัยปอดติดเชื้อนี้ จะได้รับยารักษาทันทีที่ได้รับการวินิจฉัย โดยไม่ต้องรอผลการตรวจเสมหะหรือน้ำล้างปอดก็ตาม แต่การตรวจเสมหะหรือน้ำล้างปอด นับว่ามีความสำคัญ โดยจะช่วยยืนยันการวินิจฉัยเพื่อช่วยตัดสินใจในการรักษาปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในกรณีที่ผู้ป่วยมีการตอบสนองต่อการรักษาช้าหรือมีอาการรุนแรง

เนื่องจากเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีไม่สามารถทำการเพาะเชื้อได้ การตรวจเชื้อโดยการย้อมสีชนิดต่างๆ หรืออิมมูโนฟลูออเรสเซน ตลอดจนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) จากน้ำล้างปอด จึงเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการส่งตรวจเชื้อเพื่อวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี แต่เป็นวิธีการที่ invasive การตรวจเชื้อจากเสมหะเป็นวิธี noninvasive ที่ใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่ได้ผลดีเช่นกัน ความไวของการตรวจเชื้อจากเสมหะ โดยการย้อมสี ยิมซา(Giemsa) และ โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ (Gomori methenamine silver, GMS) และโทลูอิดินบลูโอ (Toluidine blue O) กับอิมมูโนฟลูออเรสเซน(Immunofluorescent, IFA) และปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) แตกต่างกันตามการศึกษา [3-22] นอกจากนี้การส่งเสมหะตรวจเชื้อหลายๆครั้งอาจเพิ่มความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อนี้ และอาจสามารถทดแทนการตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอดได้

ซึ่งก่อนหน้านี้นี้มีการศึกษาของ Narasimha PD และคณะ เพียงการศึกษาเดียว ที่ศึกษาบทบาทการส่งเสมหะย้อมสีหลายๆ ครั้ง เพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยการย้อมเสมหะด้วยโทลูอิดินบลูโอ 3 ครั้งมีความไวในการวินิจฉัยร้อยละ 70 โดยความไว

จากการข้อมลเสมหะครั้งที่ 1 ร้อยละ 21.4 ครั้งที่ 2 ร้อยละ 47.1 และครั้งที่ 3 ร้อยละ 31.4 [11] แต่ไม่มีการเปรียบเทียบความไวที่ได้กับการข้อมลจากน้ำล้างปอด และยังไม่มีการศึกษาการข้อมลภูมิโนฟลูโอเรสเซนจากเสมหะหลายๆครั้งเพื่อเพิ่มความไวในการวินิจฉัย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้จึงเป็นการเปรียบเทียบความไวในการตรวจวินิจฉัยโดยการข้อมลสียิมซ่า โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ กับภูมิโนฟลูโอเรสเซน และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส ตลอดจนทำการเปรียบเทียบความไวของการข้อมลแต่ละชนิด และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส เปรียบเทียบความไวระหว่างการข้อมลและปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรสจาก เสมหะ 1 ครั้ง กับเสมหะ 3 ครั้ง และน้ำล้างปอดกับเสมหะ 3 ครั้ง โดยถ้าการตรวจเสมหะ 3 ครั้งมีความไวมากกว่าหรือเท่ากับน้ำล้างปอด ก็จะสามารถใช้เป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซีในผู้ป่วยเอดส์ต่อไป

คำถามการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary Research Question)

การส่งเสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี 3 ครั้ง โดยการข้อมลสียิมซ่า โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ ภูมิโนฟลูโอเรสเซน และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส มีความไวมากกว่าหรือเท่ากับการตรวจ เชื้อจาก น้ำล้างปอดหรือไม่

คำถามรอง (Secondary Research Question)

การส่งเสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี 3 ครั้ง โดยการข้อมลสียิมซ่า โกโมไร มิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ ภูมิโนฟลูโอเรสเซน และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส จะสามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มากกว่าการส่งเสมหะตรวจ 1 ครั้ง ได้หรือไม่

การข้อมลสียิมซ่า โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ กับ ภูมิโนฟลูโอเรสเซน และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส มีความไวในการวินิจฉัยการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี แตกต่างกันหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความไวของการตรวจเชื้อจากเสมหะและจากน้ำล้างปอด โดยการข้อมลสียิมซ่า โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ กับ ภูมิโนฟลูโอเรสเซน และปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอร์เรส
2. เพื่อศึกษาการเพิ่มความไว ในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยการส่งตรวจเสมหะ 3 ครั้ง โดยการข้อมลสียิมซ่า โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูดีนบลูโอ กับ

อิมมูโน ฟลูออเรสเซน และปฏิกิริยาภูมิต้านทานเชื้อไวรัส เปรียบเทียบกับการส่งตรวจ
เสมหะ 1 ครั้ง

3. เพื่อเปรียบเทียบความไวการส่งตรวจเสมหะ 3 ครั้งกับความไวการตรวจเชื้อจาก น้ำล้าง
ปอด

สมมติฐาน (Hypothesis)

การส่งเสมหะตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี 3 ครั้ง จะสามารถเพิ่มความไวในการวินิจฉัย
การติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ได้มากกว่าหรือเท่ากับการตรวจหา เชื้อจากน้ำล้างปอด

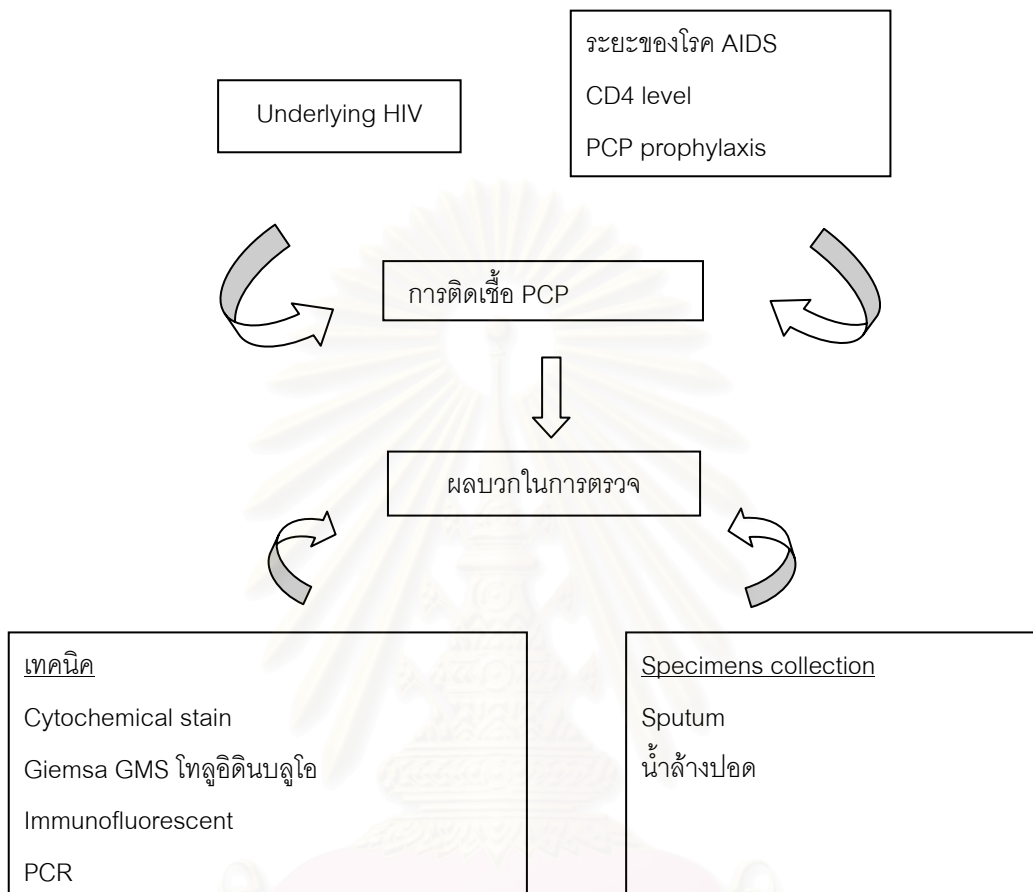
ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ทุกรายที่เข้ารับการรักษาในรพ.จุฬาลงกรณ์ ที่มีอาการ
ทางคลินิก และภาพรังสีปอดเข้าได้กับปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในช่วงเดือนมีนาคม 2549 ถึง
เดือนพฤศจิกายน 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

การคัดเลือกผู้ป่วยที่วินิจฉัยว่ามีอาการปอดติดเชื้อจากเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี อาศัยอาการทางคลินิกและความผิดปกติของภาพรังสีปอดซึ่งมีข้อกำหนดดังนี้

1. อาการทางคลินิกที่เข้าข่ายภาวะปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ต้องมีอย่างน้อย 3 ใน 5 ข้อ ต่อไปนี้

- 1.1 ใช้ 3 วัน ถึง 3 สัปดาห์
- 1.2 อาการเหนื่อยที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ
- 1.3 ไอ
- 1.4 ภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ
- 1.5 ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษา PCP ได้แก่ trimethoprim-sulfamethoxazole หรือ clindamycin กับ primaquine

2. ภาพรังสีปอด ของโรคปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีอาจมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนี้

- 2.1 ปกติ
- 2.2 diffuse infiltration
- 2.3 perihilar infiltration

ข้อจำกัดของการวิจัย (Limitation)

เชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีไม่สามารถเพาะเชื้อได้ จึงต้องใช้การย้อมเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัย

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and Application)

ถ้าการส่งเสมหะตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี หลายๆครั้งมีความไวในการวินิจฉัยปอด ติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีสูง และเทียบได้กับความไวจากการตรวจน้ำล้างปอด จะสามารถหลีกเลี่ยงการส่องกล้อง(bronchoscopy) ซึ่งเป็นหัตถการที่ invasive เพื่อใช้วินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซีได้

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve The Problems)

1. ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างส่งตรวจอาจมีการปนเปื้อนหรือล่าช้า ซึ่งอาจแก้ไขโดยการทำความสะอาด และส่งตัวอย่างไปที่ห้องปฏิบัติการด้วยตนเองของผู้วิจัย
2. การเก็บเสมหะอาจได้ปริมาณเสมหะไม่มากพอ ซึ่งอาจแก้ไขโดยการเก็บเสมหะตามขั้นตอน (protocol) ที่ตั้งไว้

บทที่ 2

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับ เชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี

เชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี ค้นพบครั้งแรกโดย Carlos Chagas [22] ตั้งแต่ต้นศตวรรษที่ 20 ในปี ค.ศ. 1909 จากการศึกษาการติดเชื้อของคนงานทำวางรถไฟในรัฐ Minas Gerais สหพันธ์สาธารณรัฐบราซิล โดยสังเกตพบ multinuclear cystic bodies ในปอดหนู guinea pig ที่ได้รับการฉีด (inoculate) เชื้อจากเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Trypanosoma cruzi* และยังพบเชื้อนี้จากการ autopsy ในปอดผู้ป่วยชาวอเมริกาที่เสียชีวิตจากโรค trypanosomiasis และตั้งชื่อชนิดใหม่ชื่อว่า *Schizotrypanum cruzi* และค้นพบต่อมาโดย Antonio Carinii [23] ใน ค.ศ. 1910 โดยพบซิสต์ ในปอดหนู (rat) ที่ติดเชื้อ *Trypanosoma lewisi* แต่สงสัยว่า ซิสต์นี้อาจเป็นเชื้ออื่น จึงได้ส่งไปตรวจเพิ่มเติมที่ Pasteur institute of Paris หลังจากนั้น ใน ค.ศ. 1912 Delanoes [24] ได้พบว่าเป็นเชื้อใหม่ โดยการฉีด (inoculate) ซิสต์ในหนูที่ไม่ได้ติดเชื้อ และพบว่า ซิสต์นี้ไม่ได้เจริญตามวงจรชีวิตของ Trypanosome ให้ชื่อว่าเชื้อใหม่นี้ว่า *Pneumocystis carinii* โดยจัดเป็นกลุ่ม โปรโตซัว (Protozoa) (รูปที่ 1)

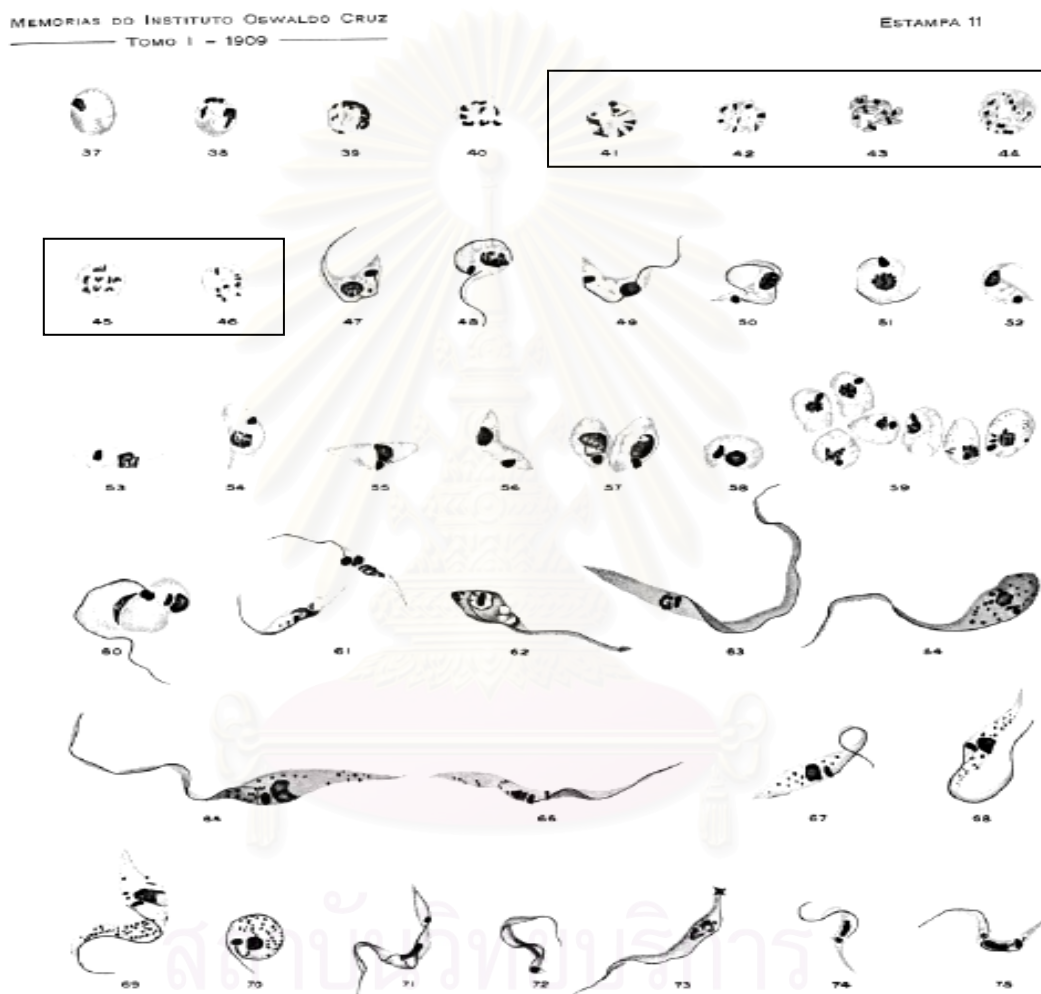
ต่อมาในปี ค.ศ. 1988 มีการศึกษาหลายการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อ และได้วิเคราะห์พบ ribosomal RNA, mitochondrial genomic gene sequences, amino acid sequences และโปรตีนของเชื้อ และพบว่ามีความเชื่อมโยงของสายใยพันธุกรรม (phylogenetic linkage) กับเชื้อรามากกว่าโปรโตซัว ดังนั้นจึงจัดนิวโมซิสติสใหม่ให้อยู่ในกลุ่มรา Ascomycetous fungi แทน [26]

จากการศึกษาต่อมาพบว่า เชื้อนิวโมซิสติสมี host specificity กล่าวคือเชื้อที่ก่อโรคในคนจะไม่ก่อโรคในสัตว์อื่น ๆ จึงตั้งชื่อใหม่เป็น นิวโมซิสติสจิโรเวคซี (*Pneumocystis jirovecii*)

เชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี ไม่สามารถเพาะเชื้อได้นอกปอดของโฮสต์ (host) มีการใช้สารเลี้ยงเชื้อเป็น cell free system media, tissue culture system media และ supplement media ที่เติม surfactant, lung homogenates และสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสิ่งแวดล้อมในปอด (intraalveolar environment) แต่ไม่สามารถเพาะเชื้อสำเร็จ แต่เพาะเชื้อได้เฉพาะในสัตว์ทดลองเท่านั้น

เชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี เป็นเชื้อในปอด (alveolar pathogen) ที่ไม่ลุกลามเข้าเซลล์ของโฮสต์ ทั้งนี้วงจรชีวิตของเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี นั้นซับซ้อน พบได้ทั้งซิสต์ (cyst form) และ โทรโฟซอยต์ (trophic form, trophozoites) โดยโทรโฟซอยต์เปลี่ยนแปลงมาจากซิสต์ที่โตเต็มวัย (mature

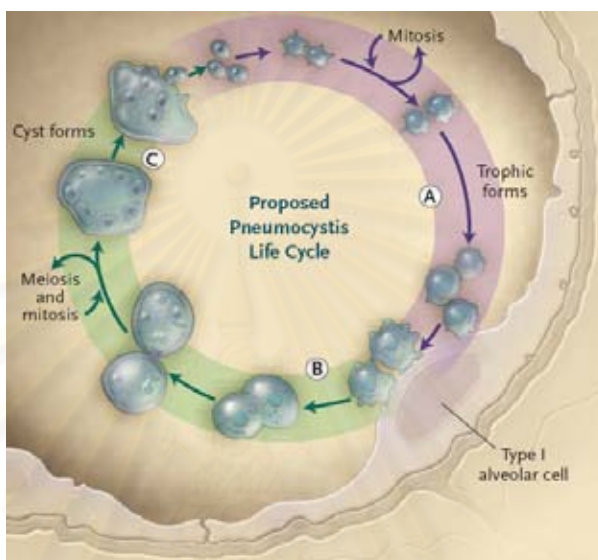
cyst) โดยตรง ในแต่ละซิสต์ที่โตเต็มวัย จะประกอบด้วย 8 intracystic bodies ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น 8 ไทรโฟซอइट โดยแต่ละไทรโฟซอइटจะแบ่งตัวแบบ binary fission ไทรโฟซอइट 2 ตัว จะรวมตัวกันเป็น 1 diploid cell และมีการแบ่งตัวแบบ mitosis และ meiosis ตามลำดับ เพื่อเจริญต่อไปเป็นซิสต์ (รูปที่ 2) โดยการติดเชื้อในปอดจะพบไทรโฟซอइटมากกว่า ในอัตรา ไทรโฟซอइट ต่อ ซิสต์ คือ 9:1



รูปที่ 1 Chagas evolutive cycle scheme of Trypanosoma ที่เดิมคิดว่า Pneumocystis carinii อยู่ใน scheme นี้ cyst และ precyst ของ Pneumocystis carinii อยู่ในลำดับที่ 40-46 [25]

ผนังซิสต์ (cyst wall) ประกอบด้วยไคติน (chitin) และ complex polymer เช่น กลูแคน (glucan) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory response) ในปอดของผู้ที่ติดเชื้อ (infected host)

โทรโฟซอइट จะเกาะติดกับเซลล์บุผนังปอด (pneumocyte type 1) และจะกระตุ้นเชื้อ (specific signal pathway ในตัวเชื้อ) ทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนในปอดมากขึ้น โดยการจับกับเซลล์ เยื่อบุผนังปอดนี้ไม่ทำให้กลไกการป้องกันการติดเชื้อ(barrier function) สูญเสียการทำงานไป แต่ทำให้กลไกการซ่อมแซมเซลล์เยื่อบุผนังปอดลดลง



รูปที่ 2 วงจรชีวิตเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี [27]

การตอบสนองของโฮสต์เมื่อมีการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี

ปฏิกิริยาการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน (inflammatory response) เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ แต่ทำให้มีการอักเสบของปอดเพิ่มมากขึ้น ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อรุนแรง จะพบ การอักเสบจากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล (neutrophilic inflammation) ซึ่งเป็นผลทำให้เกิด การทำลายเนื้อเยื่อปอด (diffuse alveolar damage) การแลกเปลี่ยนก๊าซผิดปกติ และเกิดภาวะหายใจ ล้มเหลว ความรุนแรงของการติดเชื้อ และการตายจากการติดเชื้อ มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากกว่าปริมาณเชื้อที่พบในปอด โดยพบว่าปริมาณ interleukin-8 (IL -8) และจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการติดเชื้อ

กลไกการตอบสนองต่อเชื้อมีทั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด innate immunity และ adaptive immunity ผู้ป่วยเอดส์มีความบกพร่องในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้ง 2 ชนิด (innate และ adaptive immunity) คือมีความบกพร่องของ phagocytosis respiratory burst และ ปฏิกิริยา การกระตุ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (macrophage) ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ

ไม่สามารถเก็บกินเชื้อนิวโมซิสติสได้ การสูญเสียการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ ทำให้มีการสะสมของ glycoprotein เช่น fibronectin vitronectin ในถุงลมปอด (alveolar space) และมีการเปลี่ยนแปลง surfactant เกิดขึ้น

ระบาดวิทยาของการติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี

ในค.ศ. 1980 มีผู้ป่วยเอดส์ (Acquired immunodeficiency syndrome defined illness) ติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซีถึง 2 ใน 3 มีการประเมินว่าร้อยละ 75 ของผู้ป่วยเอดส์จะป่วยจากภาวะปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซีในช่วงชีวิตที่เหลือ โดยมีการติดเชื้อนี้ 20 ราย ต่อ 100 รายในแต่ละรอบปี (person year) ของผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร แต่หลังจากปี ค.ศ. 1989 เริ่มมีการใช้ยาป้องกันการติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี และเริ่มมีการให้ ยาต้านไวรัสเอดส์ในปี ค.ศ. 1996 ทำให้อุบัติการณ์การติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซีลดลง ในปี ค.ศ. 1992-1995 ลดลงร้อยละ 3.4 ต่อปี ปีค.ศ.1996-1998 ลดลงร้อยละ 21.5 ต่อปี จากการศึกษา EuroSIDA พบว่าก่อนปี ค.ศ. 1995 อุตบัติการณ์ PCP 4.9 รายต่อ100 รายในแต่ละรอบปี และลดลงเหลือ 0.3 รายต่อ 100 รายในแต่ละรอบปีหลังจากปี ค.ศ. 1998

ในปัจจุบันแม้ว่าอุบัติการณ์การติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซีลดลงมากจากอดีต แต่โรค ติดเชื้อดังกล่าวจัดเป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้บ่อย เนื่องจากยังมีผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่ไม่ทราบว่าตนเองเป็นเอดส์ หรือทราบว่าตนเองเป็นเอดส์แต่ไม่ได้ติดตามการรักษา

สำหรับประเทศไทยความชุกของการติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซีอาจพบได้มากถึงร้อยละ

27-40

อาการทางคลินิกและการวินิจฉัย การติดเชื้อ นิวโมซิสติส ในผู้ป่วยเอดส์

การติดเชื้อนิวโมซิสติสจิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์พบบ่อยเมื่อ CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร โดยมีอาการไข้ต่ำๆ เหนื่อย ไอแห้ง โดยอาการค่อยเป็นค่อยไปอย่างช้าๆ (subacute course) การตรวจร่างกายไม่มีอาการแสดงทางปอดชัดเจน แต่มีภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ ภาพรังสีปอดที่พบบ่อย ได้แก่ bilateral diffuse symmetrical reticular หรือ granular opacity และมีภาพรังสีปอดปกติร้อยละ 10 อาจมี atypical pattern ประมาณร้อยละ 10 เช่นเดียวกัน ได้แก่ unilateral infiltration, lobar consolidation, miliary infiltration, nodular infiltration หรือ pleural effusion ได้ และอาจพบ cystic change ซึ่งเกิดจากลมค้างในถุงลมปอด (checked valve mechanism) ซึ่งอาจเกิดลมรั่วจากปอด (pneumothorax) ตามมาภายหลังได้[28-35]

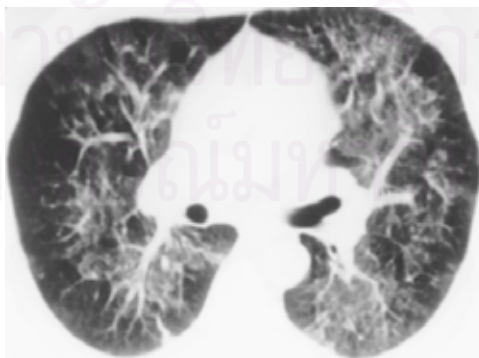
ตัวอย่างภาพรังสีปอดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มีดังต่อไปนี้[36-40]



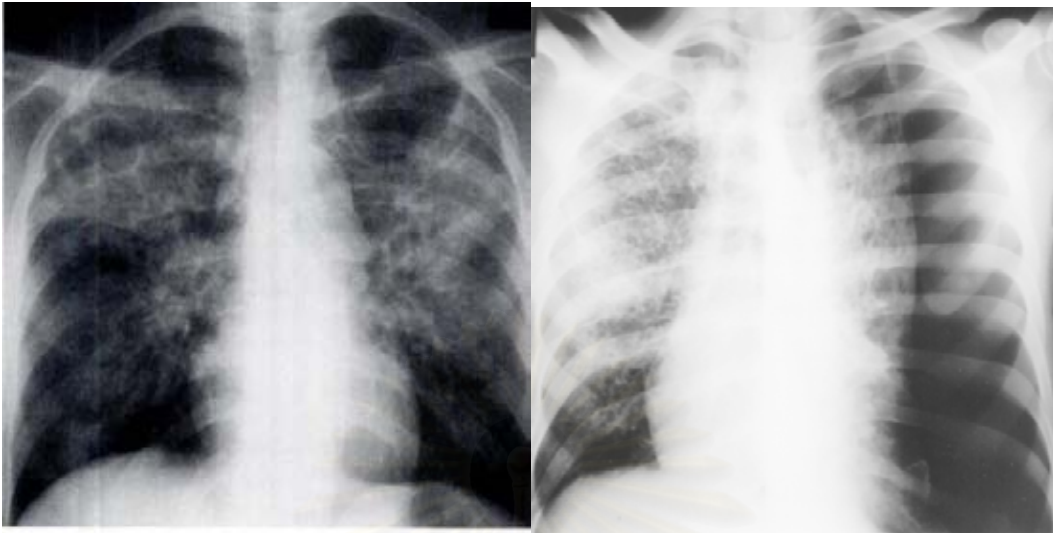
รูปที่ 3 ภาพรังสีปอดแสดง Bilateral perihilar pattern (finely reticular , groundglass)



รูปที่ 4 ภาพรังสีปอดแสดง Alveolar pattern

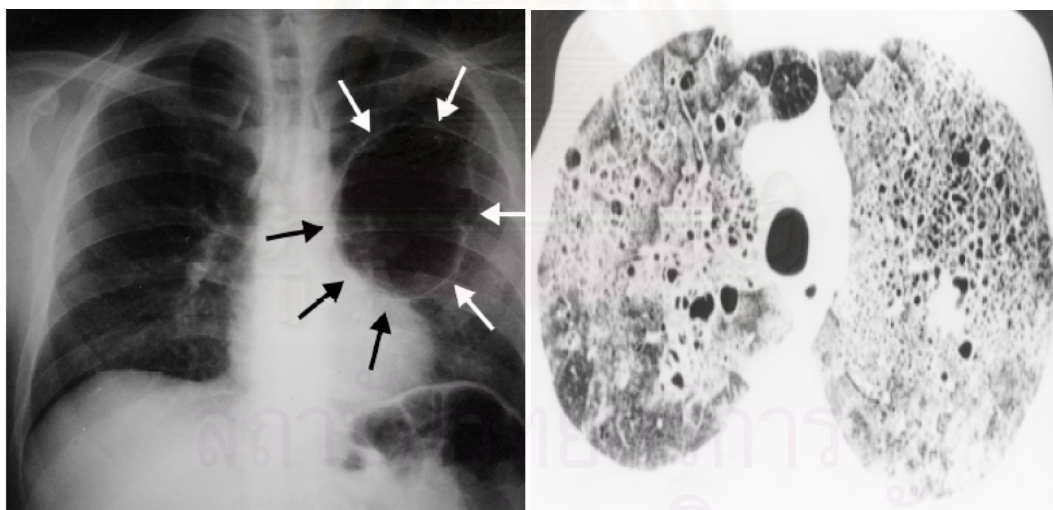


รูปที่ 5 ภาพรังสี HRCT แสดง Geographic pattern of groundglass attenuation in perihilar regions of both lung



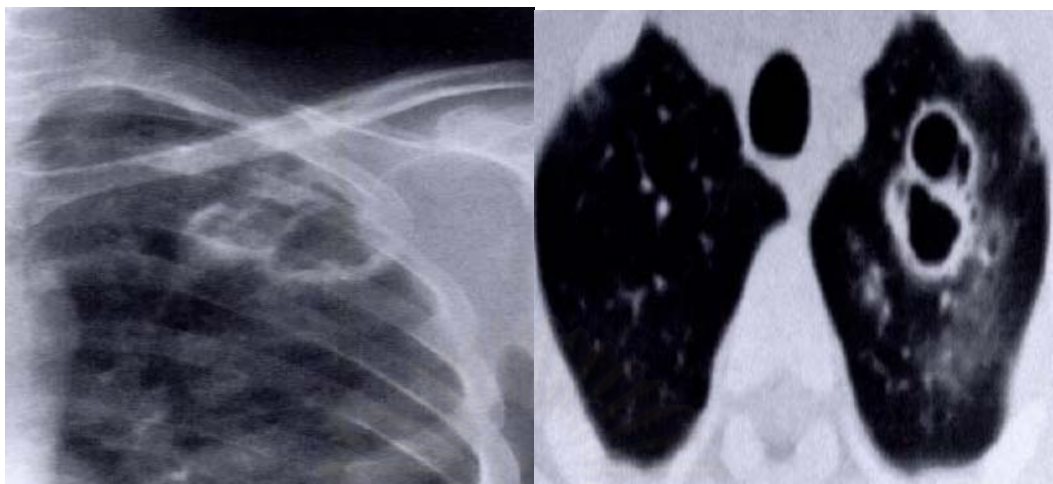
รูปที่ 6-7 6 (ซ้าย) ภาพรังสีปอดแสดง Multiple cystic lucency on reticular and groundglass background

7 (ขวา) ภาพรังสีปอดแสดง Numerous subtle cyst on reticular and groundglass background with left pneumothorax



รูปที่ 8-9 8 (ซ้าย) ภาพรังสีปอดแสดง Thin wall cyst at LUL (pneumatocele)

9 (ขวา) ภาพรังสี HRCT แสดง Multiple cystic lucency on reticular and groundglass background



รูปที่ 10-11 10 (ซ้าย) ภาพรังสีปอดแสดง cavities at LUL
11 (ขวา) ภาพรังสีHRCT แสดง cavities at LUL

อาการ อาการแสดง และภาพรังสีปอด ไม่มีความจำเพาะ ระดับ LDH ในเลือดสูงขึ้นได้[41] DLCO ลดลงต่ำกว่าร้อยละ 80 ซึ่งการตรวจดังกล่าวมีความไวในการวินิจฉัยสูงมาก แต่มีความจำเพาะต่ำ

Selwyn และคณะ[42] ศึกษาการวินิจฉัยแยกโรคระหว่าง ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ปอดติดเชื้อแบคทีเรีย และปอดติดเชื้อวัณโรค พบว่า ถ้าประเมินจากอาการเหนื่อยเวลาออกแรง ร่วมกับภาพรังสีปอด interstitial pattern มีความไวในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ร้อยละ 58 ความจำเพาะร้อยละ 92 odd ratio 16.3 ถ้าประเมินจากอาการไข้ภายในเวลา 7 วัน ร่วมกับภาพรังสีปอด lobar consolidation pattern มีความไวในการวินิจฉัยปอดติดเชื้อแบคทีเรีย ร้อยละ 48 ความจำเพาะร้อยละ 94 odd ratio 14.6

ปัจจุบัน การวินิจฉัย ต้องตรวจเชื้อจากเสมหะหรือน้ำล้างปอด โดยการตรวจจาก น้ำล้างปอด เป็นวิธีมาตรฐาน การตรวจเชื้อจากเสมหะเป็นวิธีที่ได้ผลดีเช่นเดียวกัน และสามารถลดความจำเป็นของการส่องกล้องเพื่อวินิจฉัยได้

วิธีการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี [43,44]

การตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี จากเสมหะโดยการย้อมสีมีความไวร้อยละ 50-90 [3-6] การตรวจเชื้อจาก น้ำล้างปอดเพิ่มความไวมากขึ้นเป็นร้อยละ 90

การย้อมสียิมซาจะใช้ตรวจซิสต์และโทรโฟซอยต์ได้ ใช้เวลาในการย้อมสีสั้น ราคาถูก แต่เนื่องจากโทรโฟซอยต์มีขนาดเล็ก และมักแยกจากการติดสีที่พื้นหลังได้ยาก ดังนั้นจึงต้องใช้เวลาใน

การตรวจหาทางกล้องจุลทรรศน์นาน และผู้ตรวจต้องมีความชำนาญสูง จึงมีโอกาส ตรวจผิดพลาดสูง (false negative)

การย้อมสีโกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ นั้นตรวจซิสต์ได้เท่านั้นจึงมีความไวไม่มาก ใช้เวลาในการย้อมสีนาน มักแยกจากการติดสีที่พื้นหลังได้ยากเช่นเดียวกัน ผู้ตรวจต้องมีความชำนาญ

การย้อมสีโทลูอิดีนบลูโอ ตรวจซิสต์ได้เท่านั้น แต่ย้อมได้เร็วกว่าการย้อมสีโกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ แต่ไม่สามารถแยกซิสต์จากราชนิดอื่นได้

การตรวจเชื้อโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซน มีความไว และความจำเพาะในการวินิจฉัยมากกว่าการย้อมสี เนื่องจากสามารถตรวจได้ทั้งซิสต์และโทรโฟซอยต์ ตรวจพบเชื้อได้ง่าย ไม่ถูกรบกวนโดยการติดสีที่พื้นหลัง สามารถแยกซิสต์จากราชนิดอื่นที่มีขนาดและรูปร่างเดียวกันได้ ไม่มี cross reactivity กับเชื้อ *Candida spp.*, *Cryptococcus neoforman*, *Toxoplasma gondii*, *Coccidioides immitis* endospore, *Blastomyces dermatitidis*, เชลล์ติดเชื้อ Cytomegalovirus และ Herpes simplex virus และ normal human lung homogenates

ส่วนปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เป็นเทคนิคที่ตรวจ DNA ของเชื้อ พัฒนามาในช่วงเวลาเดียวกันกับอิมมูโนฟลูออเรสเซน เป็นการตรวจที่มีความไวสูงเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 1 แสดงข้อแตกต่างของการตรวจแต่ละวิธีสำหรับการตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี

วิธีการตรวจ	ยิมซา	โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์	โทลูอิดีนบลูโอ	อิมมูโนฟลูออเรสเซน	ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส
Stage ของเชื้อที่ตรวจได้	ซิสต์และโทรโฟซอยต์	ซิสต์	ซิสต์	ซิสต์และโทรโฟซอยต์	ซิสต์และโทรโฟซอยต์
วิธีการย้อม	ง่าย	ซับซ้อน	ง่าย	ซับซ้อน	ซับซ้อน
ระยะเวลาที่ใช้ย้อม	25 นาที	20 นาที	30 นาที	45 นาที	3 ชั่วโมง
ระยะเวลาที่ใช้อ่านผล	20-30 นาที	10 นาที	10 นาที	5-10 นาที	1 นาที
ความเชี่ยวชาญ	+	+	+	-	+
ราคา	ถูก	ถูก	ถูก	แพง	แพง

บทที่ 3

บทบาทวรรณกรรมการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์

การตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์ จากสารคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจ มีความไวในการวินิจฉัย (diagnostic yield) สูงกว่าผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องจากสาเหตุอื่น Walzer PD และคณะ [45] ศึกษาผู้ป่วยติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีที่ไม่เป็นเอดส์แบบย้อนหลัง (retrospective) ตั้งแต่ ค.ศ. 1969-1972 จำนวน 194 ราย พบมีความไวในการวินิจฉัยจากการตรวจเสมหะเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น Limper และคณะ [46] พบว่าผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ มีปริมาณเชื้อ มากกว่าผู้ป่วยติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีที่ไม่เป็นเอดส์ จึงมีความไวในการตรวจสูงกว่า และสามารถตรวจได้จากเสมหะปริมาณน้อยกว่า

ในการศึกษาเริ่มแรก การตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ต้องตรวจจากเนื้อเยื่อปอด ซึ่งผู้ป่วย ต้องทำการผ่าตัด open lung biopsy หรือส่องกล้องเพื่อทำ transbronchial biopsy (TBB) ซึ่งเป็นวิธีการ invasive และมีภาวะแทรกซ้อนสูง ในปี ค.ศ.1986 Pitchenick และคณะ[4] ได้ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจเชื้อจากเสมหะ น้ำล้างปอด และTBB โดยใช้สีย้อมโกโมโรไมเทนนามินซิลเวอร์ ในผู้ป่วยเอดส์ที่สงสัย PCP 43 ราย ตรวจพบเชื้อ 20 ราย โดยพบเชื้อจากเสมหะ 11 ใน 20 ราย (ร้อยละ 55) น้ำล้างปอด 11 ใน 14 ราย (ร้อยละ 79) และ TBB 18 ใน 20 ราย (ร้อยละ 90) ซึ่งพบว่าการตรวจเสมหะและน้ำล้างปอดมีความไวในการวินิจฉัยเชื้อนี้ โดยไม่ต้องทำหัตถการที่ invasive มาก ต่อมาหลายการศึกษาที่ยืนยันการตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอด โดยย้อมสีด้วยวิธีต่างๆพบว่าได้ผลดี (ตารางที่ 2) โดยมีความไวมากกว่าร้อยละ 90 การตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอดจึงเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัย

อย่างไรก็ตามการตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอดยังเป็นวิธี invasive และเริ่มมีการศึกษาการตรวจเชื้อจากเสมหะเพิ่มมากขึ้น Bigby และคณะ พบว่าการตรวจเสมหะโดยการย้อมสีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ มีความไว ร้อยละ 56 มี negative predictive value ร้อยละ 39 ต่อมามีการพัฒนาวิธีการตรวจเสมหะมากขึ้น โดย Leigh และคณะ ได้พัฒนากระบวนการเก็บเสมหะ โดยให้แปรงเยื่อในช่องปากก่อนเก็บ เสมหะ ย้อมเสมหะด้วยวิธีโมดิฟายด์โกโมโรไมเทนนามินซิลเวอร์ พบว่ามีความไวร้อยละ 94 และมี negative predictive value ร้อยละ 96 จึงเริ่มมีการใช้เสมหะมาตรวจ เชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยผล การศึกษาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การศึกษาโดยการส่องกล้องเพื่อตัดเนื้อเยื่อปอด(TBB) Brush BAL(ล้างปอด) เพื่อตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี

ปี ค.ศ. ที่ศึกษา สารคัดหลั่ง ความไว วิธียอม จากระบบ (ร้อยละ) ทางเดินหายใจ				
Coleman [12]	1983	น้ำล้างปอด	55	ไม่ได้ระบุ
		Brush	39	
		Touch	78	
		preparation	79	
		Biopsyเนื้อเยื่อปอด		
OgnibeneF.P.[13]	1986	น้ำล้างปอด	89	โกโมโรมิเทนามินซิลเวอร์ หรือ ยิมซา หรือ โทลูอิดีนบลูโอ
		Brush	35	
		Touch	63	
		preparation		
Golden J. A. [14]	1986	น้ำล้างปอด	97	โกโมโรมิเทนามินซิลเวอร์
Pitchenic AE. [4]	1986	น้ำล้างปอด	79	โกโมโรมิเทนามินซิลเวอร์
		Brush	53	
		Biopsyเนื้อเยื่อปอด	90	
Ambruster C. [19]	1995	น้ำล้างปอด	59	อิมมูโนฟลูออเรสเซน ยิมซา ปฏิกิริยาภูมิต้านทาน โพลิเมอร์เรส
		น้ำล้างปอด	84	
		น้ำล้างปอด	65	

ตารางที่ 3 การศึกษาการตรวจเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี จากเสมหะ และ น้ำล้างปอด

ปีค.ศ.ที่ศึกษา	สารคัดหลั่ง ทางเดินหายใจ	วิธีย้อม	ความไว (ร้อยละ)	
Parrillo E. [15]	1988	เสมหะ	ยิมซา	76
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	92
			เมดิฟายด์โทลูอิดีนบลูโอ	80
Wolfson S. [16]	1990	เสมหะ	ยิมซา	14.8
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	25.9
		น้ำล้างปอด	ยิมซา	41
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	54.2
NG.L. [17]	1990	เสมหะ	ยิมซา	70
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	72
		น้ำล้างปอด	ยิมซา	92
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	100
Kovacks J. [10]	1990	เสมหะ	ยิมซา	76
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	92
			โทลูอิดีนบลูโอ	80
Cregan P. [8]	1990	เสมหะ	ยิมซา	92
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	97
			น้ำล้างปอด	ยิมซา
Pinlaor S. [18]	2004	เสมหะ	ยิมซา	15
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	84
			โกโมโรมิเทนามินซิลเวอร์	61
			ปฏิกิริยาลูกโซไฟลีสเฮอร์เรส	84
		น้ำล้างปอด	ยิมซา	54
			คิมมูโนฟลูออเรสเซน	100
			โกโมโรมิเทนามินซิลเวอร์	63
			ปฏิกิริยาลูกโซไฟลีสเฮอร์เรส	100

การตรวจเชื้อจากเสมหะจึงเป็นวิธี noninvasive ที่ได้ผลดี และควรนำมาใช้เพื่อหลีกเลี่ยงการส่งกลิ่น ซึ่งมีภาวะแทรกซ้อนสูงกว่า

การวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เริ่มทำ การทดลองครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1990 โดย Wakefield และคณะ ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสมีการใช้หลายแบบ ทั้ง single round touchdown PCR nested PCR quantitative real time PCR โดยมีการใช้ gene target ที่แตกต่างกัน

การศึกษาการตรวจเชื้อด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มักให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน [66] เนื่องจากมีความแตกต่างของประชากรที่ทำการศึกษา ระเบียบวิธีรวมทั้งขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และระเบียบวิธีวิจัย ดังนี้

1. ความแตกต่างของประชากรที่ทำการศึกษา

- 1.1 ผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งพบว่ามีความไวในการวินิจฉัยสูงกว่าผู้ป่วยกลุ่มอื่น
- 1.2 การได้รับยาป้องกันปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มาก่อนเข้ารับการศึกษา
- 1.3 ผู้เป็นพาหะของเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ซึ่งพบในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่นๆ ที่ไม่เป็นเอดส์มากกว่าผู้ป่วยเอดส์
- 1.4 ผู้ป่วยโรคปอด เช่น ถุงลมโป่งพอง (COPD) มี ผู้เป็นพาหะของเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีเพิ่มขึ้น

2. ระเบียบวิธีรวมทั้งขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR method performance)

- 2.1 ปริมาณดีเอ็นเอ(DNA) ของเชื้อ พบในทางเดินหายใจส่วนล่างมากกว่าส่วนบน
- 2.2 Primer ที่แตกต่างกัน ทำให้มีความจำเพาะแตกต่างกัน
- 2.3 วิธีการเตรียมดีเอ็นเอที่ต่างกัน ทำให้มีความไวแตกต่างกัน
- 2.4 PCR inhibitor แตกต่างกันในแต่ละสิ่งส่งตรวจ
- 2.5 PCR target multicopy gene มีความไวสูงกว่า single copy gene
- 2.6 nested PCR มีความไวสูงกว่า single PCR

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การใช้วิธีมาตรฐาน(gold standard) ในการวินิจฉัย และให้คำจำกัดความ ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ที่แตกต่างกัน

สำหรับผลการศึกษาคความไวและความจำเพาะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีดังนี้

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากตัวอย่างน้ำล้างปอด

การศึกษา	ปีค.ศ.	จำนวนผู้ป่วย	เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)
Wakefield [47]	1991	51	Single	95	96.8
Cartwright [48]	1994	154	Single	100	99.3
Moonens [49]	1995	43	Single	100	96.7
Leibovitz [50]	1995	200	Single	85.3	96.8
Ribes [51]	1997	129	Single	100	79.3
HelwegLasen[52]	1998	61	Single	100	90.9
Caliendo [53]	1998	112	Single	100	97.9
Sing [54]	2000	259	Single	100	96.6
Takahashi [55]	2002	81	Single	100	80.7
Lipschik [56]	1992	113	Nested	84.2	92.6
Skoet [57]	1995	117	Nested	85	100
Moonens [49]	1995	18	Nested	100	83.3
Weig [58,59]	1996	46	Nested	100	72.2
Rabodonirina[60]	1997	127	Nested	100	77
Mathis [61]	1997	312	Nested	97.5	97.8
Torres [62]	2000	47	Nested	100	86.2
Agostoni [63]	2000	146	Nested	100	76
Sing [54]	2000	257	Nested	100	88.2
Olssan [64]	2001	32	Nested	87.5	58.3

การศึกษาส่วนใหญ่มีความไวและความจำเพาะการตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสในน้ำล้างปอด 90-100%

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อนิวโมซิสติสด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากตัวอย่าง
เสมหะ

การศึกษา	ปีค.ศ.	จำนวน ผู้ป่วย	เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอร์เรส	ความไว (ร้อยละ)	ความจำเพาะ (ร้อยละ)
Wakefield [47]	1991	37	Single	90	94.1
Cartwright [48]	1994	207	Single	100	97.6
Leibovitz [50]	1995	84	Single	75	92.1
Chouaid [65]	1995	49	Single	100	100
Sing [54]	2000	94	Single	100	98.9
Lipschik [56]	1992	71	Nested	100	92.6
Skoet [57]	1995	33	Nested	69.2	95
Weig [58,59]	1996	162	Nested	47.8	91.4
Mathis [61]	1997	403	Nested	91.7	98.3
Caleindo [53]	1998	120	Nested	95.5	93.9
Sing [54]	2000	159	Nested	100	94.8
Olsson [64]	2001	57	Nested	100	60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ความรู้พื้นฐานทาง Phylogenetics และ Molecular typing ของเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี

เชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มีความหลากหลายของลำดับเบสในยีน (gene) หลายชนิด เช่น mitochondrial large subunit ribosomal RNA, mitochondrial small subunit ribosomal RNA, thymidylate synthase, arom locus, beta tubulin และ dihydropteroate synthase ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างในลำดับเบสของยีนต่างๆ (genetic divergence) ระหว่างเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์พบว่า เชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มีการติดเชื้อที่จำเพาะกับโฮสต์

สำหรับเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีที่ก่อโรคในคน มีความแตกต่างในลำดับเบสของยีนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 [67]

เชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มี nuclear RNA transcripts 3 ชนิด คือ 18S 5.8S และ 26 S

18S	ITS1	5.8S	ITS2	26S
-----	------	------	------	-----

ระหว่าง 3 gene มี ITS (Internal transcribed spacer) คั่นอยู่ มีความหลากหลาย ของ ITS sequence โดย ITS1 มี 15 genotype ITS2 มี 14 genotype ดังแสดงในตารางที่ 7

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาลำดับเบสของ ITS1 และ ITS2 จะรวมกัน จะพบความหลากหลาย ในรูปของ combination type มากขึ้น ซึ่งรายงานจากทั่วโลก พบว่ามีถึง 65 genotype และพบ ITS sequence type ($B_2 a_1$) มากที่สุด genotype ที่แตกต่างกันดังกล่าวจึงมีประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ความแตกต่างของ genotype ดังกล่าวมีผลต่อความรุนแรงของโรคอีกด้วย type ($B_2 a_1$) มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อที่มีอาการรุนแรงน้อย type ($B_1 a_3$) และ ($A_2 c_1$) ความสัมพันธ์กับอาการรุนแรงปานกลางถึงมาก

การศึกษาในประเทศไทย พบว่ามี genotype ดังรูปที่ 12

การตรวจ PCR ของเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี มีประโยชน์ทางคลินิกหลายอย่าง

1. เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี

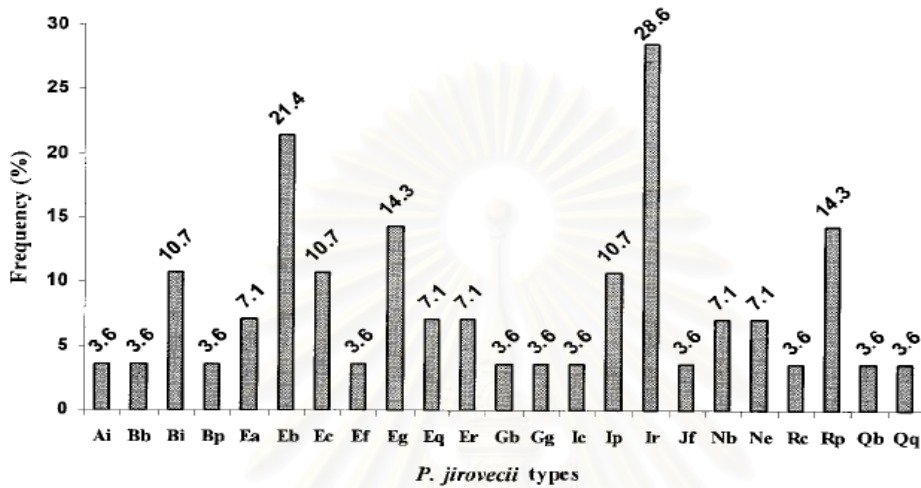
2. เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาซึ่งพบว่า

2.1 ผู้ป่วยมีการติดเชื้อได้มากกว่า 1 type

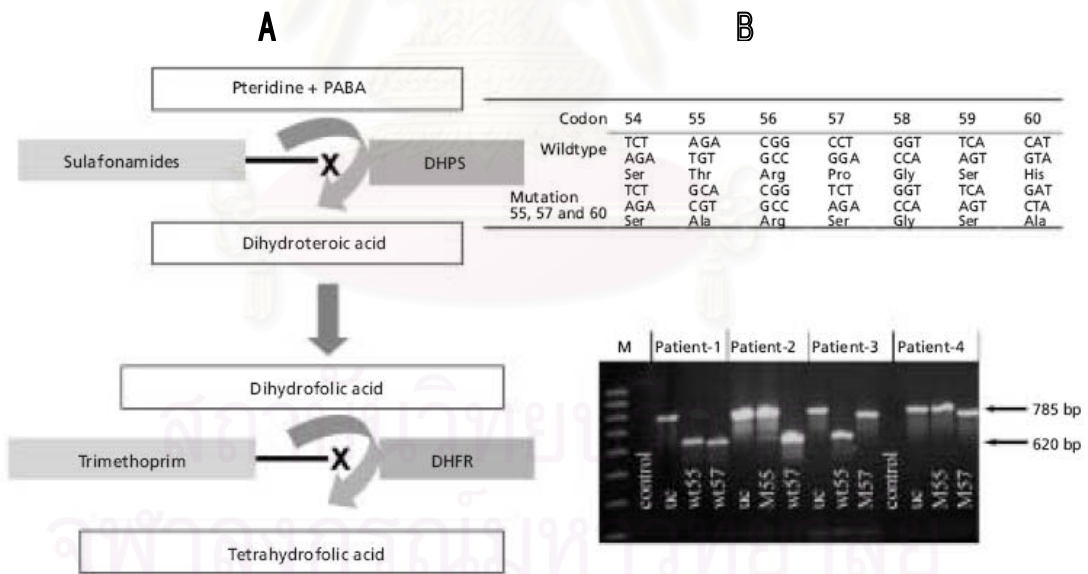
2.2 การติดเชื้อเกิดจากทั้ง reactivation และ person to person transmission

3. ใช้ตรวจการดื้อยาของเชื้อได้ โดยการตรวจ target gene DHPS (dihydropteroate synthase gene) โดยการเกิด mutation มีความสัมพันธ์กับการเกิดการดื้อยา กลุ่ม sulfa (รูปที่ 13)

4. ช่วยทำนายการดำเนินโรค (prognosis) โดยผู้ป่วยที่ติดเชื้อและมี DHPS mutation มีโอกาสเสียชีวิตมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวยังต้องมีการศึกษามากขึ้น เพื่อสรุปผลดังกล่าวให้ได้ชัดเจน (รูปที่14)



รูปที่12 แผนภูมิแท่งแสดง genotypeของเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี ในประเทศไทย[68]



รูปที่ 13 A การผ่าเหล่าในยีน DHPS(dihydropteroate synthase) กับความสัมพันธ์ของการดื้อยา sulfonamide

B ตำแหน่งเบสที่พบการผ่าเหล่าในยีน DHPS (dihydropteroate synthase)

C ความสัมพันธ์ของผลการตรวจโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสกับการผ่าเหล่าในยีน DHPS

ตารางที่ 6 genetic divergence ของเชื้อราโมซิสติสจิโรเวคซี ที่ก่อโรคในคน

Gene	Size (bp)	Number of different sequences type	Polymorphic nucleotide position	Nucleotide substitution
mitochondrial large subunit ribosomal RNA	356	5	81	C/T
			85	T/C/A
			248	C/T
mitochondrial small subunit rRNA	300	2	160	C/A
			196	T/G
5S rRNA	120	6	23	T/G
			63	A/T
			79	T/C
			82	A/G
			88	T/C
Arom	237	4	121	T/C
			208	A/G/C
ITS1	161	21	(ตารางที่ 7)	
ITS2	192	29		
ITS1+2combination		65	(ตารางที่ 7)	
DHPS	834	5	Wild type (รูปที่ 12)	
			Codon 55	
			Codon 57	
			Codon 60	
Cytochrome b	1038	7	279	C/T
			362	C/T
			369	G/T
			516	C/T
			1032	T/A
SSCP		35	Not applicable	Number of patterns
ITS1	204bp			3
26S	426bp			6
Mt26S	340bp			4
Beta tubulin	309bp			3
Tandem repeats in the MSG gene	123bp	5	6 tandem 10 nucleotide repeats	5 patterns: number of repeats from 2-6

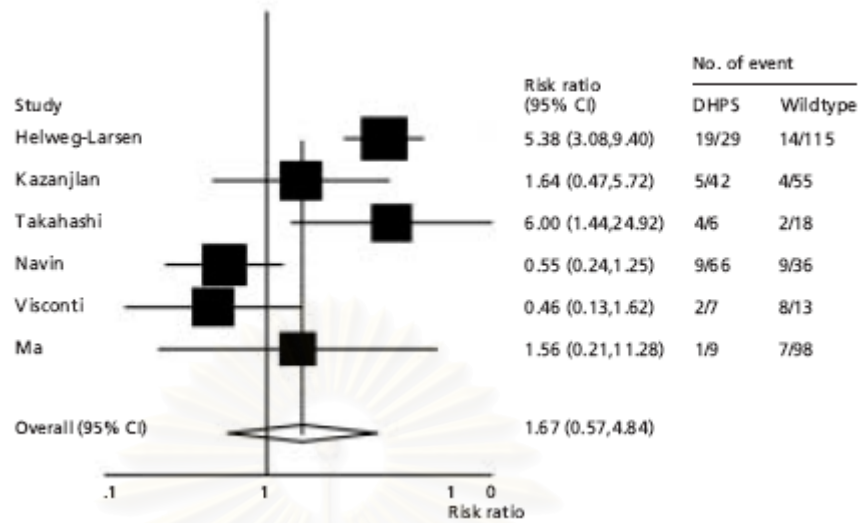
ตารางที่ 7 ITS1 และ ITS 2

ITS 1

ITS1 type Consensus	Nucleotide position(bp)										
		6	12	15	21	23-24	28	34	42	53-54	80-81
Lee	Wakefield	T	T	A	T	TT	T	T	T	AT	AG
A	A ₁	C	T	A	T	-	T	T	T	-	-
B	A ₂	C	-	A	T	-	T	T	T	-	-
C	B ₃	C	-	A	T	-	T	T	T	-	AG
D		C	T	A	T	-	T	T	T	-	AG
E	B ₁	T	-	A	T	-	T	T	T	-	AG
F	C	T	-	A	T	-	T	T	T	-	AG
G	A ₄	T	-	A	T	-	T	T	T	-	-
H		T	-	A	T	TT	C	T	T	-	AG
I		T	-	A	T	-	C	T	T	AT	AG
J		T	-	C	T	-	C	T	T	-	AG
K		T	-	C	T	-	C	T	T	-	AG
L		T	-	A	T	-	T	C	T	-	AG
M		T	-	A	T	-	T	T	C	-	AG
N	B ₂	T	-	A	A	-	T	T	T	-	AG
O		T	T	A	T	-	T	T	T	-	AG
	A ₃	T	-	A							-
	B ₄	T	-	G							AG
	B ₅	T	-	T							TG
	B ₆	T	A	T							AG

ITS2

ITS1 type	Consensus	Nucleotide position(bp)								
		52-57	61-65	68-74	76	122	160	166-171	173	177-183
Lee	Wakefield	TAATAA	AAATA	AATATTT	T	C	G	ATATAT	G	CAAATA
a	d ₁	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	-		ATATAT	G	----
b	b ₁	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	-		--ATAT	G	----
c	b ₂	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	C	T	--ATAT	G	----
d	b ₂	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	C		--ATAT	G	----
e	a ₁	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	-		---AT	G	----
f	a ₄	TAA--	AA-TA	AATATTT	T	-		---AT	A	----
g	a ₃	TAA--	AA-TA	AATAATT	-	-		---AT	A	----
h	a ₄	TAA--	AA-TA	AATATTT	-	-		---AT	A	----
i/l	c ₁	----	AAATA	----	-	-		---AT	A	----
j		----	----	AATAATT	-	-		--ATAT	G	----
k		----	----	AATAATT	-	-		---AT	A	CAAATA
m		TAATAA	AA-TA	AATAATT	-	-		---AT	A	----
n		TAA-AT	AA-TA		-	-		----	A	----
	a ₂	TAA--		AATAATT	-			---AT	G	----
	a ₅	TAA--		AATATAT	-			---AT	G	----
	a ₆	TAG--		AATATTT	-			---AT	A	----
	b ₃	TAA--		AATGTTT		C		--ATAT	G	----
	c ₂	-----	AAATA	-----		-		---AT	G	----
	d ₂	TAA--		AACATTT	-			ATATAT	G	----
	e ₁	TAATAA		AATAATT	-			---AT	A	CAAATA
	e ₂	TAA--		AATATTT	-			---AT	A	CAAATA
	e ₃	AAATAA		AATAATT	-			---AT	A	CAAATA
	f	TAA--		AATAATT	-			---AT	A	--ATA



รูปที่ 14 แสดงความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ PCP เปรียบเทียบระหว่าง wild type กับ DHPS mutation [67]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา (Descriptive study)

ระเบียบวิธีวิจัย (Research methodology)

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยเอดส์ทุกรายที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่มีอาการทางคลินิก และภาพรังสีปอดเข้าได้กับปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (Study population)

ประชากรเป้าหมายทุกคนที่ยินดีเข้าร่วมโครงการหลังจากได้รับการอธิบายรายละเอียดของโครงการแล้ว โดยผู้ป่วยทั้งหมดเป็นผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาแบบผู้ป่วยในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนมีนาคม 2549 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2549

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าการศึกษา (Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่อายุตั้งแต่ 15 ปีขึ้นไปทั้งหญิงและชาย
2. ผู้ป่วยเอดส์
3. มีอาการทางคลินิก 3 ใน 5 ข้อ และ ภาพรังสีปอดเข้าได้กับปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ซึ่งมีข้อกำหนดดังนี้

3.1 อาการทางคลินิกที่เข้าข่ายภาวะปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ต้องมีอย่างน้อย 3 ใน 5 ข้อ ต่อไปนี้

3.1.1 ไข้ 3 วัน ถึง 3 สัปดาห์

3.1.2 อาการเหนื่อยที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ

3.1.3 ไอ

3.1.4 ภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ

3.1.5 ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษา PCP ได้แก่ trimethoprim-sulfamethoxazole หรือ clindamycin กับ primaquine

3.2 ภาพรังสีปอด ของโรคปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีอาจมีลักษณะ
 อย่างไม่ค่อยอย่างหนึ่งดังนี้

3.2.1 ปกติ

3.2.2 diffuse infiltration

3.2.3 perihilar infiltration

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ไม่ยินยอมเข้าการศึกษาแม้ได้อธิบายแล้ว
2. ผู้ป่วยที่มีโรคอันเป็นข้อห้ามในการกระตุ้นเสมหะ หรือ ส่องกล้อง
3. ผู้ป่วยที่ตรวจพบเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุของปอดติดเชื้อโดยไม่พบเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี
4. ผู้ป่วยที่ไม่เข้าเกณฑ์การวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี ตามเกณฑ์ดังกล่าว

ข้างต้น

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$\begin{aligned} \text{จากสูตร} \quad n &= \frac{Z^2 \alpha P(1-P)}{d^2} \\ n &= \text{จำนวนผู้ป่วยที่เก็บตัวอย่างของเสมหะหรือน้ำล้างปอด} \\ Z \alpha &= Z_{0.1} = 1.64 \text{ (two tail) ที่ความเชื่อมั่น 90\%} \\ d &= \text{acceptable error} = 15\% \\ P &= \text{ค่าความคาดหวังความไวของการตรวจ ในที่นี้เท่ากับ 70\% [11]} \\ n &= \frac{1.64^2 * (0.7)(0.3)}{(0.15)^2} = 25 \end{aligned}$$

เนื่องจากค่าประมาณความชุกของปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี
 ภาพรังสีปอดผิดปกติเท่ากับ 80%

$$\text{ดังนั้นจะต้องใช้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด } 25 \times (100/80) = 32 \text{ ราย}$$

วิธีการศึกษา

1. ชักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจสอบถามที่รับประทานอยู่ และบันทึกข้อมูล
2. ถ่ายภาพรังสีปอด และ เจาะเลือดตรวจหาระดับ CD4 ในรายที่ไม่เคยตรวจมาก่อน
3. ผู้ป่วยที่ศึกษาทุกรายจะได้รับการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง โดยการกระตุ้นเสมหะ ด้วย

เทคนิคของ Zaman [6] โดยใช้ 3% saline ปริมาณ 100 มล. ฟันด้วย ultrasonic nebulizer flow
 10 ลิตรต่อนาที เป็นเวลา 15-30 นาที ให้ได้เสมหะอย่างน้อย 2 มล. เพื่อนำไปย้อมมิมซา

โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูอิดินบลูโอ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส โดยเสมหะที่ย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนมีปริมาณอย่างน้อย 0.5 มล.[69]

ผู้ป่วยที่มีภาวะหายใจล้มเหลว (respiratory failure) หรือกำลังจะเกิดภาวะหายใจล้มเหลว (impending respiratory failure) ซึ่งใส่ท่อช่วยหายใจ และเครื่องช่วยหายใจ จะเก็บเสมหะโดยพ่น 3% saline nebulizer ปริมาณ 5 มล. เป็นเวลา 5-10 นาที ให้ได้เสมหะอย่างน้อย 2 มล.

สำหรับการเก็บสิ่งส่งตรวจจากการส่องกล้อง (bronchoscopy) หรือ bronchoalveolar lavage (BAL) โดยใช้ 0.9% saline ปริมาณ 50- 150 มล. ล้างและดูดเสมหะที่ Right middle lobe bronchus หรือ Right lower lobe bronchus เพื่อให้ได้น้ำล้างปอด 25-30 มล. และนำส่งตรวจเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีด้วยการย้อมสีวิธีต่างๆ และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสเช่นเดียวกับเสมหะข้างต้น

4. ให้การรักษาตามอาการ และรักษาการติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี โดยทันที โดยใช้สูตรมาตรฐาน trimetoprim-sulfamethoxazole หรือ clindamycin ร่วมกับ primaquine และประเมินผลที่ 3 สัปดาห์หลังการรักษา

กระบวนการเก็บเสมหะและน้ำล้างปอด

เทคนิคการกระตุ้นเสมหะ (Sputum induction technique)

อุปกรณ์

1. Ultrasonic nebulizer
2. 3% saline 50-100 มล.
3. Face mask
4. กระปุกเก็บเสมหะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ultrasonic nebulizer



รูปที่ 15 Ultrasonic nebulizer

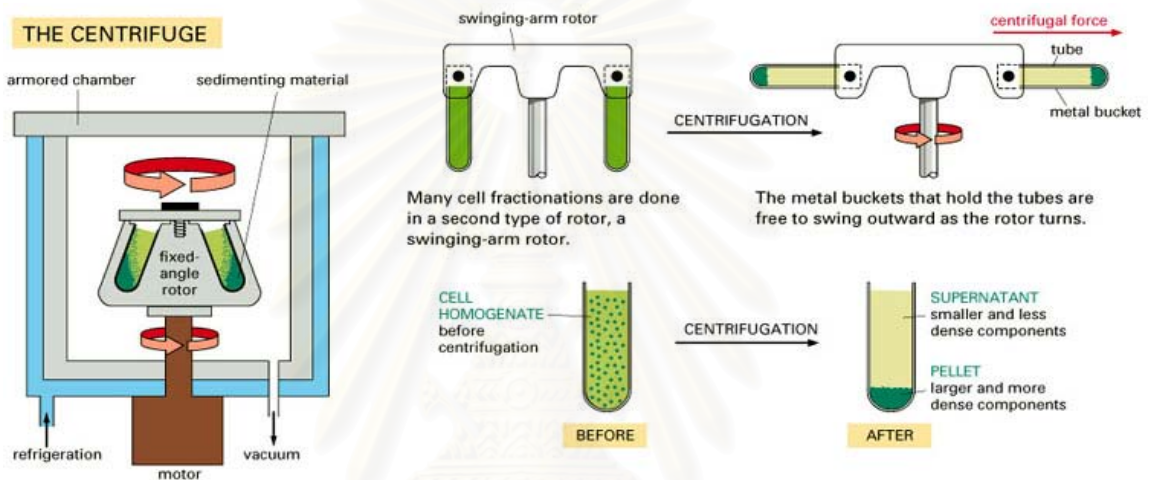
Ultrasonic nebulizer เป็นเครื่องมือที่ใช้ Piezoelectric crystal สร้างละอองฝอย (aerosol) โดย crystal transducer เปลี่ยนสัญญาณกระแสไฟฟ้า (electrical signal) เป็นการสั่นสะเทือนคลื่นเสียงความถี่สูง (high frequency acoustic vibration) ทำให้เกิด oscillation wave ที่ sterile buffer fluid ในกระบอกใส่น้ำ (water filled couplant reservoir) ผ่านไปสู่ solution chamber ทำให้เกิดละอองฝอย (aerosol particle) การใช้ Ultrasonic nebulizer จะทำให้เกิด mucocilliary clearance เพิ่มปริมาณสารน้ำบนผิวเซลล์เยื่อในหลอดลม กระตุ้น cough reflex

ขั้นตอนการกระตุ้นเสมหะ

1. อธิบายผู้ป่วยถึงวิธีการกระตุ้นเสมหะ
2. ให้ผู้ป่วยนั่ง
3. ให้ผู้ป่วยบ้วนปาก เพื่อลดการปนเปื้อนเสมหะ
4. เตรียมเครื่อง nebulizer ใส่ 3% saline 50-100 มล. ใน solution chamber และใส่น้ำ sterile water ใน water filled couplant reservoir
5. ใส่ mask ให้ขนาดเหมาะกับหน้าผู้ป่วย ต่อกับเครื่อง nebulizer
6. เปิดเครื่อง nebulizer จะมี aerosol ออกมา ให้ผู้ป่วยหายใจเข้าๆ ลึกๆ
7. เคาะปอด (manual chest percussion) พร้อมกับกระตุ้นเสมหะด้วย nebulizer
8. สังเกตอาการและภาวะแทรกซ้อนจากการกระตุ้นเสมหะ
9. ใช้เวลากระตุ้นเสมหะประมาณ 30 นาที ให้ผู้ป่วยพยายามไอ เก็บเสมหะในกล่องใส่อ่าง และนำส่งตรวจทันที

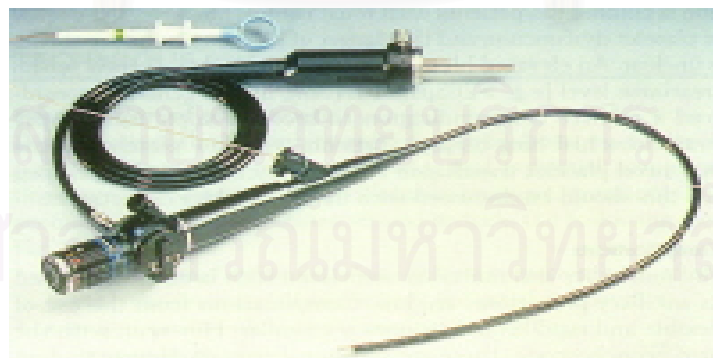
กระบวนการเตรียมเสมหะ

ใช้วิธี cytocentrifuge โดยให้ได้ปริมาณเสมหะอย่างน้อย 2 มล. ใส่ mucolytic reagent (0.3% dithiothreitol (DTT)) รวมกับเสมหะในปริมาณเท่ากับปริมาณเสมหะ และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมา ผสมใน vortex mixer ปั่น 1500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เท supernatant ที่ทิ้งให้เหลือ 1 มล. นำส่วน pellet มาเตรียมสไลด์



รูปที่ 16 วิธี cytocentrifuge

การส่องกล้อง



รูปที่ 17 Bronchoscope

ขั้นตอนการทำ

พ่นยาชาที่คอ (pharynx) เพื่อลด Gag reflex ที่อาจถูกกระตุ้นจากการส่องกล้อง ใต้อ่างกล้องทางปาก ผ่านสู่ vocal cord พ่นยาชาบริเวณ vocal cord ผ่านกล้องเข้าสู่หลอดลม ไปที่ Right middle lobe bronchus หรือ Right lower lobe bronchus ใช้ saline ปริมาณ 50- 150 มล. ล้างและดูดน้ำล้างปอดจาก alveoli เพื่อให้ได้น้ำล้างปอด 25-30 มล.

กระบวนการเตรียมน้ำล้างปอด

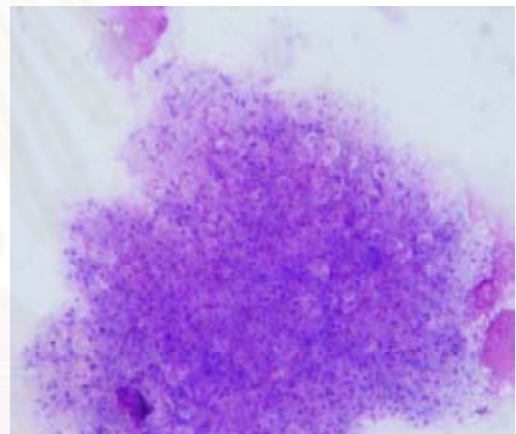
นำน้ำล้างปอด 25-30 มล.ปั่น 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เท supernatant ที่ให้เหลือ 1 มล. จะได้น้ำล้างปอดมาเตรียมสไลด์

กระบวนการย้อมสีชนิดต่างๆ

การย้อมสียิมซา [70]

สารละลาย

- ใช้น้ำยายิมซา
- Buffer pH 7.2
- Absolute methanol



วิธีการย้อม

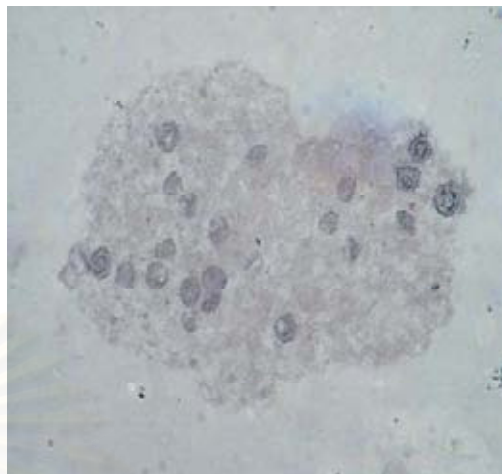
1. smear เสมหะ หรือ น้ำล้างปอดบนสไลด์
2. นำมาตรึงให้คงสภาพด้วย absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
3. เตรียมมสียิมซา ผสมกับ Buffer pH 7.2 ในอัตราส่วน 1:15 แล้วย้อม smear เป็นเวลา 15 นาที
4. ล้างน้ำออก 1-2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง

ผลการย้อม ไทรโฟซออยต์ (trophic form) ติดสีม่วงชัดเจน ส่วนผนังซิสต์จะไม่ติดสี ขนาด 4-6 ไมครอน

การย้อมสีโกโมไรมิเทนนามินซัลเฟอร์ [71-74]

สารละลาย

- 5% chromic acid
- 1% potassium metabisulfate
- 3% hexamethenamine
- 5% silver nitrate
- 0.2% gold chloride
- 2% sodium thiosulfate
- 0.02% light green
- DMSO (dimethylsulforide)



รูปที่ 19 การย้อมโกโมไรมิเทนนามินซัลเฟอร์

วิธีการย้อม

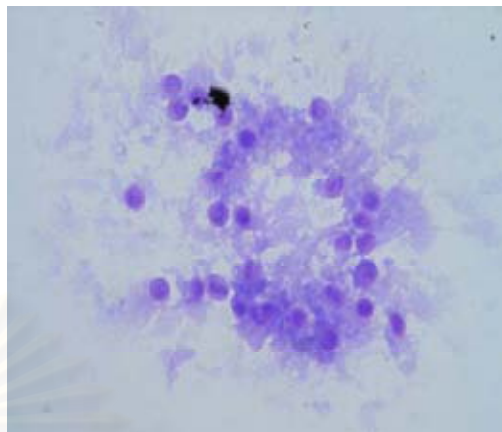
1. smear เสมหะ หรือ BAL บนสไลด์
2. นำมาตรึงให้คงสภาพด้วย absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
3. แتشสไลด์ใน 5% chromic acid ที่อุณหภูมิ 65⁰ c นาน 1 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
4. แتشสไลด์ใน 1% potassium metabisulfate นาน 1 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
5. แتشสไลด์ใน MSN-DMSO ที่อุณหภูมิ 95⁰ c นาน 2 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
6. แتشสไลด์ใน 0.2% gold chloride นาน 2 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
7. แتشสไลด์ใน 2% sodium thiosulfate นาน 1 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
8. แتشสไลด์ใน 0.02% light green นาน 1 นาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง
9. แتشสไลด์ใน 95% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที
10. แتشสไลด์ใน absolute ethanol 2 ครั้งๆ ละ 1 นาที
11. แتشสไลด์ใน xylene นาน 1 นาที
12. นำไป mount ด้วย permount

ผลการย้อม ผนังซิสต์ และ โทรโฟซอइट (trophic form) ภายในซิสต์ของเชื้อ จะติดสีน้ำตาลดำ มักพบเชื้ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ รูปร่างกลมหรือคล้ายรูปถ้วย รูปพระจันทร์เสี้ยว หรือพบผนังซิสต์เป็นลักษณะพับเป็นรอยคล้ายเครื่องหมายวงเล็บ

การย้อมสีโทลูอิดินบลูโอ

สารละลาย

- Glacial acetic acid
- Sulfuric acid, concentrated
- Toluidine blue O
- 100% Methyl alcohol



รูปที่ 20 การย้อมโทลูอิดินบลูโอ

เตรียม Sulfation reagent

1. ใส่ Glacial acetic acid 45 มล. ใน Coplin Jar
2. ค่อยๆ เติม Concentrated sulfuric acid 15 มล. ผสมกับ Glacial acetic acid เก็บไว้ในตู้เย็นที่ผสมแล้วเก็บไว้ใช้ได้ 1 สัปดาห์ แต่ถ้านำมาใช้ย้อมแล้วเก็บไว้ได้เพียง 1 วัน

วิธีการย้อม

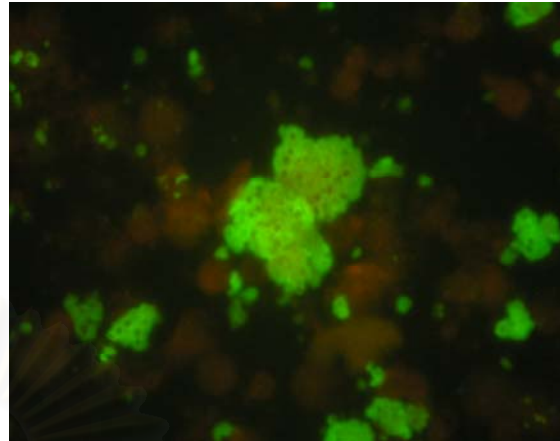
1. smear เสมหะ หรือน้ำล้างปอดบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง
2. จุ่มสไลด์ใน sulfation reagent แช่ทิ้งไว้ 10 นาที
3. ล้างในน้ำกลั่น นาน 5 นาที
4. จุ่มสไลด์ในโทลูอิดินบลูโอ แช่ทิ้งไว้ 3 นาที
5. แช่สไลด์ใน 95% ethyl alcohol 10 วินาที เพื่อล้างสีย้อม
6. แช่สไลด์ใน 100% Methyl alcohol นาน 10 วินาที เพื่อ decolorization
7. แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 10 วินาที
8. นำไป mount ด้วย permount

ผลการย้อม ชีสต์ขนาด 5 ไมครอน ติดสีม่วงแดง ชีสต์ติดสีสม่ำเสมอ ขอบชัด มักพบเชื้อ อยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ รูปร่างกลมหรือคล้ายรูปถ้วย

การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซน

สารละลาย

- Phosphate buffer saline pH 7.4
- ชุดย้อม IFA Pneumo cel
- Acetone



รูปที่ 21 อิมมูโนฟลูออเรสเซน

ชุดย้อม IFA Pneumo cel จากบริษัท Cellabs เป็นชุดทดสอบ direct immunofluorescence โดยใช้ fluorescein labelled mouse monoclonal antibody ได้รับการทดสอบพบว่ามีความไวและความจำเพาะ 100% ไม่มี cross reactivity กับเชื้อ Cryptococcus neoformans, Candida tropicalis, Saccharomyces cerevesiae, Aspergillus niger, Candida krusei และ Candida albicans

วิธีการย้อม

1. ผสม เสมหะ หรือ น้ำล้างปอด กับ Phosphate buffer saline pH 7.4
2. หยอดตัวอย่างลงในหลุมสไลด์ ประมาณ 10 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
3. Fixed สไลด์ด้วย acetone 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง
4. เติมสารละลาย RP 1 (pneumo cel reagent) 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมตัวอย่าง ให้ น้ำยาคลุม ทั่วตัวอย่าง นำสไลด์ไป incubate ที่อุณหภูมิ 37⁰c เป็นเวลา 30 นาที ต้องไม่ให้สไลด์แห้ง
5. นำมาล้างด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline pH 7.4 ในภาชนะพร้อมเขย่า 1-2 นาที
6. เติม RMF(mounting fluid) ลงบนหลุม แล้วปิด coverslip พยายามไม่ให้มีฟองอากาศ นำไปดูด้วยกล้องฟลูออเรสเซน

ผลการย้อม เชื้อนิวโมซิสติสจะเรืองแสงสีเขียวอ่อน(apple green fluorescence) ชีสต์ รูปร่างกลม ผนังหนา และพบ pleomorphic trophic form เป็นจุด โดยมีพื้นสีแดงอมน้ำตาล

การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (เทคนิค PCR)

เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคใหม่ทางด้านอณูชีววิทยา คิดค้นขึ้นโดย Kary B. Mullis ในปี ค.ศ. 1985 เป็นวิธีเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม DNA ส่วนที่มีความจำเพาะต่อจุดชี้พื้ที่ต้องการตรวจหา ทางทฤษฎีจะทำให้สามารถตรวจพบจุดชี้พื้ก่อโรคในระดับที่ต่ำได้ถึง 1 เซลล์ในสิ่งส่งตรวจต่างๆ ได้ ขั้นตอนของการทำ PCR เป็นการเลียนแบบการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม DNA (DNA replication) ในหลอดทดลองโดยให้เกิดซ้ำกันหลายรอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. การให้ความร้อนระดับ 90-95 °C เพื่อให้ DNA สายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนนี้เรียกว่า denaturation
2. ต่อไปเป็นขั้นตอนที่เรียกว่า primer annealing ทำได้โดยลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 40-60 °C เพื่อให้สายนิวคลีโอไทด์สังเคราะห์ขนาดยาว 20-30 เบสที่เรียกว่า ไพรมเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเข้าไปจับคู่สมกับ DNA สายเดี่ยวต้นแบบ (template)
3. ขั้นตอนต่อไปคือ primer extension อาศัยเอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase ในการสร้างสาย DNA ต่อจากไพรมเมอร์ทางด้าน 3'-OH จนได้เป็นสาย DNA ขนาดยาวเท่าที่ต้องการ โดยเอ็นไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 °C

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

สำหรับ Target gene ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ small subunit ribosomal RNA ซึ่งครอบคลุมทั้ง ITS1 และ 2 เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 587 คู่เบส

ลำดับเบสของPrimer มีดังนี้

PJ RNA FO Forward primer

Sequence CCG TAG GTG AAC CTG CGG A ลำดับเบสนี้ได้จาก small subunit ribosomal RNA ของเชื้อนิวโมซิสติส

PJ RNA RO Reverse primer

Sequence ATG CTT AAG TTC AGC GGG T ลำดับเบสนี้ได้จาก small subunit ribosomal RNA ของเชื้อนิวโมซิสติส

สำหรับลำดับเบสระหว่าง Primer ทั้ง 2 มีดังนี้

AGGTTT CCGT	GGTGAAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAATGAA	TTACTGTCAA
GGTTCATAAC	CTGGATCTTG	ATATTTTCATT	TAAATACACG	TGAACATTAA
TGATTGATTT	TGGCAGGACA	GGTTTCAGTT	TTCAAAGCTG	GAGGCTCGTT
CTGCCAGAGG	TTTTAATATA	AAAAGCTTTT	TTTGTTTCGTC	GGTAGATATA
AATTTTTTAAA	AAACTTTCAA	CAATGGATCT	CTTGGTTCTC	GCGTCGATGA
AGAACGTGGC	AAAATGCGAT	AAGTAGTGTG	AATTGCAGAA	TTCAGTGAAT
CATCGAATTT	TTGAACGCAA	ATTTGCGCTC	TCAGTATTCT	GGGGAGCATG
CCTGTTTGAG	CGTCATTTAA	AAATTTGGAT	CTTTTATTTT	AAAGGGTTCCG
TGTTGGGTAT	GCATTTTTTG	CAAAATGCTG	GTCTGAAATA	GAGTTCGGCT
TTATCAGTTC	ATGCAGCGTA	GTAGGGTTAA	TTCAATTCGT	TGCTTAAGAA
ATGATGGGCT	GATTTTTTTC	GTGGATGCTT	TTGCAAGAAA	GCATGAGTTC
TTTGACCTCA	AATCAGGCAG	GATT ACCCGC	TGAACTTAAG	CATATC

วัสดุอุปกรณ์ในการทำ PCR

PCR primers

PCR reagent

Reagent for DNA electrophoresis

Thermal paper

Pipette tips with filter 10,100,1000 microlitre

Microtube

PCR thermal cycler

วิธีการทำ ประกอบด้วย

1. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

- 1.1 ทำการปั่น (centrifuge) ตัวอย่าง แล้วดูดูส่วนน้ำใส (supernatant) ที่
- 1.2 เก็บตะกอน 20 µl ผ่าน QIA DNA minikit เติมสารละลาย ATL ปริมาตร 160 µl
- 1.3 เติม proteinase K ปริมาตร 20 µl
- 1.4 Incubate ไว้ข้ามคืนที่ 56 °C ใน buffer AL ปริมาตร 200 µl
- 1.5 Inactivation ด้วยความร้อนที่ 70 °C นาน 10 นาที

1.6 เติม ethanol 200 μ l นำมาปั่นที่ความเร็ว 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

1.7 ดูดส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ใส่ buffer AW 1 500 μ l นำมาปั่น 8000 rpm 1

นาที

1.8 ดูดส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ใส่ buffer AW 2 นำมาปั่น 14000 rpm 3 นาที

1.9 ดูดส่วนน้ำใส (supernatant) ที่ใส่ นำมาปั่น 14000 rpm 1 นาที

1.10 เติม buffer AE 50 μ l ที่ 25°C 5 นาที นำมาปั่น 8000 rpm 1 นาที

1.11 ได้สารตั้งต้น (sample) 40 μ l

2. เตรียม PCR mix ในอัตราส่วนดังนี้ ปริมาตร (μ l) ความเข้มข้นสุดท้าย

1. 10 x PCR buffer 1.5

2. 10 mM dNTP (A,C,G,T) 1.2 μ l each dNTPs

3. primer

4. Taq DNA Polymerase 0.4 unit

5. เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 15

3. นำ PCR mix ในข้อ 2 เข้าสู่ PCR thermal cycler โดยใช้ 40 cycles ซึ่งประกอบด้วย

ขั้นตอนดังนี้ Denaturation 94°C 30 วินาที

Annealing 60°C 30 วินาที

Extension 72°C 1 นาที

ทำซ้ำ 40 รอบ

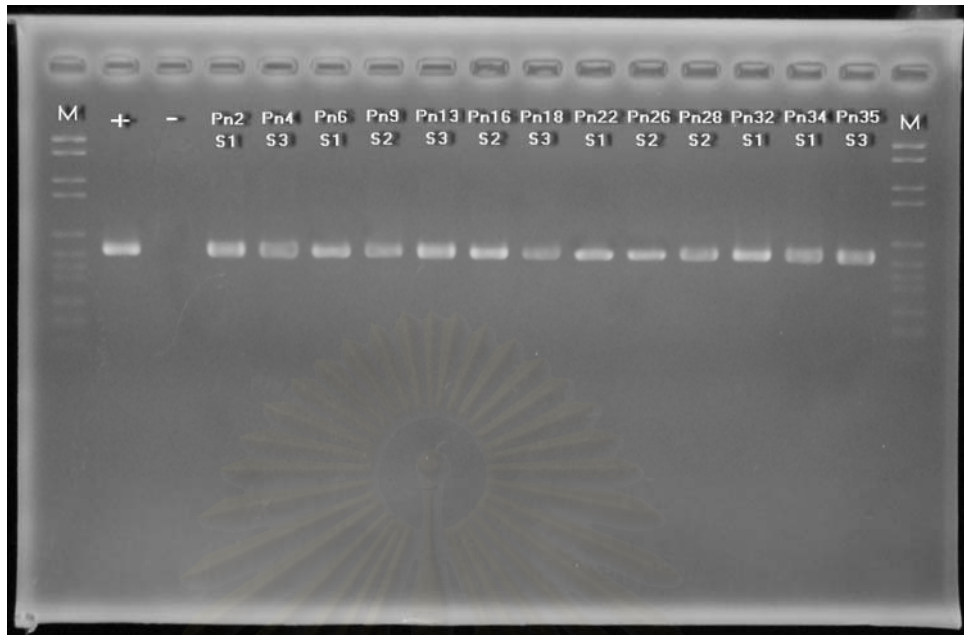
และ Final primer extension 72°C 5 นาที

4. นำ PCR product ที่ได้ มาวิเคราะห์โดยวิธี electrophoresis บน 2% agarose gel

ใน 0.5x Tris -Borate EDTA buffer เติม ethidium bromide และอ่านผลโดยใช้

ultraviolet light โดยใช้ marker VI ของบริษัท Roche

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 การตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส

การรวบรวมข้อมูล(Data Collection)

ข้อมูลผู้ป่วย อายุ เพศ ระยะเวลาที่ทราบว่ามี การติดเชื้อ HIV ปัจจุบันเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HIV ปริมาณ CD4 lymphocyte ประวัติยาป้องกันการติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี ประวัติการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆ

ข้อมูลการเจ็บป่วย อาการและระยะเวลาการเป็นไข้ ไอ เหนื่อย ระดับออกซิเจนในเลือด ภาพรังสีปอด ยารักษาการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ที่ได้รับยาปฏิชีวนะ และคอร์ติโคสเตียรอยด์ และวันที่เริ่มให้การรักษา วันที่ได้ตรวจเสมหะและ bronchoscopy (นับจากวันที่เริ่มมีอาการและวันที่รับไว้ในโรงพยาบาล) ผลการตรวจเสมหะและ น้ำล้างปอด ผลข้างเคียงจากการกระตุ้น เสมหะและส่องกล้อง

ข้อมูลการรักษา ผลตอบสนองต่อยารักษา ที่ได้รับโดยประเมินผลที่ 3 สัปดาห์หลังการรักษา

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis) โดยใช้ค่าสถิติ คือ ความไว (Sensitivity)

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Consideration)

1. การได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร (Informed consent) โดยผู้ป่วยสามารถถอนตัวจากการศึกษาได้ถ้าผู้ป่วยต้องการ โดยไม่มีเงื่อนไขใดๆ ต่อการรักษาที่พึงมี

2. การศึกษานี้เป็นการศึกษาที่ทำในผู้ป่วยที่มีความจำเป็นจะต้องตรวจเสมหะเพื่อการวินิจฉัยและรักษาอยู่แล้ว ซึ่งอาจมีความเสี่ยงบ้างแต่ค่อนข้างต่ำ เช่นภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ ชั่วคราว หลอดลมหดรััดตัว ไอเป็นเลือด และมีการแนะนำการปฏิบัติตัวและติดตามอาการอย่างใกล้ชิด และได้รับการรักษาภาวะแทรกซ้อนทันที

3. ส่งให้คณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อขอความเห็นชอบก่อน

4. ข้อมูลจากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับของผู้ป่วยแต่ละคน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

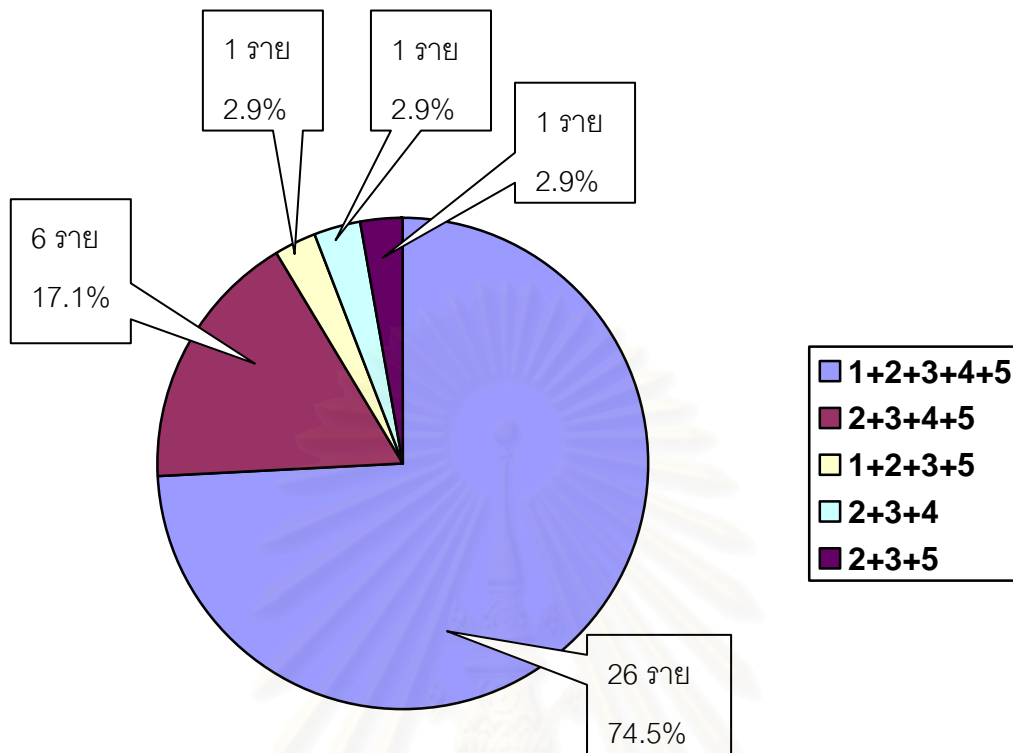
บทที่ 6

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการทางคลินิก และภาพรังสีปอดเข้าเข้าเกณฑ์การวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี มีทั้งสิ้น 35 ราย เป็นชาย 16 ราย (ร้อยละ 45.7) หญิง 19 ราย (ร้อยละ 54.3) อายุ 24-61 ปี ได้รับการวินิจฉัยโรคเอดส์ครั้งแรก 18 ราย (ร้อยละ 54.3) ผู้ป่วยทุกรายไม่ได้รับยาป้องกันการติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีมาก่อน ผู้ป่วยมีอาการของปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ดังนี้ ไข้ 27 ราย (ร้อยละ 77.1) เหนื่อย 35 ราย (ร้อยละ 100) ไอ 35 ราย (ร้อยละ 100) มีภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ 33 ราย (ร้อยละ 94.3) โดยผู้ป่วยแต่ละรายมีอาการตั้งแต่ 3 ข้อขึ้นไปตามเกณฑ์ข้อตกลงการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซีดังแสดงในรูปที่ 23 ผู้ป่วยที่เริ่มมีอาการภายในเวลา 14 วันก่อนได้รับการวินิจฉัยร้อยละ 65.7 และ ร้อยละ 91.4 เริ่มมีอาการภายในเวลา 21 วันก่อนได้รับการวินิจฉัย อาการเริ่มแรกก่อนการวินิจฉัยเร็วที่สุด 2 วัน ช้าที่สุด 30 วัน ผู้ป่วยทุกรายมีภาพรังสีปอดแบบ diffuse infiltration ผู้ป่วยที่ระดับ CD4 lymphocyte มากกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร มี 2 ราย (CD4 lymphocyte 248 และ 442) ผู้ป่วย ร้อยละ 85.7 (30 ราย) มีการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่นมาก่อน ประกอบด้วยการติดเชื้อไวรัสฮิสโตพลาสมา 7 ราย เยื่อหุ้มสมองอักเสบจากเชื้อ Cryptococcus 2 ราย วัณโรค 6 ราย เชื้อราในปาก 20 ราย Oral hairy leukoplakia 8 ราย มีการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่น(ไม่รวม oral candidiasis) ร่วมขณะมีปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี 7 ราย ได้แก่ วัณโรค 4 ราย เชื้อไวรัส cytomegalovirus 2 ราย และ disseminated strongyloidiasis ร่วมกับ gram negative bacteremia 1 ราย

ผู้ป่วยทุกรายได้รับการกระตุ้นเสมหะ 3 ครั้งและส่องกล้องหลังเก็บเสมหะครบ มีผู้ป่วยที่ไม่ได้เสมหะเลย 3 ราย (ร้อยละ 8.6) (ตารางที่ 8) ผู้ป่วยทุกรายไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงจากการกระตุ้นเสมหะ แต่เกิดภาวะหายใจล้มเหลวจากการส่องกล้อง 1 ราย เนื่องจากมี laryngospasm และ negative pressure pulmonary edema หลังส่องกล้องมีออกซิเจนต่ำนานมากกว่า 24 ชั่วโมง 2 ราย และมีไข้ 1 ราย

ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี ด้วยยามาตรฐาน มีผู้ป่วยที่ได้รับยาคอร์ติโคสเตียรอยด์ เนื่องจากมีออกซิเจนต่ำ $PaO_2 < 70$ มม.ปรอท หรือ $D(A-a)O_2 > 30$ มม.ปรอท ร้อยละ 94.3 และเสียชีวิต 1 รายจากปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี เนื่องจากเกิดภาวะ adult respiratory distress syndrome (ARDS) ร่วมกับภาวะมีลมรั่วใน ช่องอก (pneumothorax) และการเกิดช่องรั่วระหว่างหลอดลมและเนื้อปอด (bronchopulmonary fistula)



รูปที่ 23 แสดงจำนวนผู้ป่วยในแต่ละกลุ่มอาการตามเกณฑ์ข้อตกลงการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรคซี่

1=ไข้ 3 วัน ถึง 3 สัปดาห์, 2=อาการเหนื่อยที่ดำเนินไปอย่างช้าๆ, 3=ไอ, 4=ภาวะออกซิเจนในเลือดต่ำ, 5= ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษา PCP

ตารางที่ 8 แสดงจำนวนผู้ป่วยและจำนวนครั้งที่เก็บเสมหะหรือน้ำล้างปอดได้

จำนวนเสมหะที่เก็บได้	จำนวนผู้ป่วย n=35	ร้อยละ
0 ครั้ง	3	8.6
1 ครั้ง	2	5.7
2 ครั้ง	2	5.7
3 ครั้ง	28	80
จำนวนน้ำล้างปอดที่เก็บได้	34*	97.1

*ผู้ป่วย 1 ราย จากทั้งหมด 35 ราย มีภาวะ laryngospasm และ negative pressure pulmonary edema จึงต้องหยุดการเก็บน้ำล้างปอด 1 ราย

ผู้ป่วยร้อยละ 97 ได้รับการเก็บตัวอย่างส่งตรวจภายใน 7 วัน หลังเริ่มให้ยารักษา PCP โดยมีระยะเวลาส่งตรวจโดยเฉลี่ย ระยะเวลาส่งตรวจเร็วที่สุด และช้าที่สุด ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงระยะเวลาที่ส่งตรวจ specimen (จำนวนวัน) หลังให้ยารักษา PCP

ระยะเวลาที่ส่งตรวจ specimen หลังให้ยารักษา (จำนวนวัน)	เสมอหะ1	เสมอหะ2	เสมอหะ3	น้ำล้างปอด
Mean	1.2	1.89	2.74	3.51
Median	1	1	2	3
Minimum	0	0	0	1
maximum	15	15	16	16

ผลการตรวจเสมอหะและน้ำล้างปอดด้วยการย้อมสีชนิดต่างๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงความไวการตรวจเสมอหะและน้ำล้างปอดด้วยการย้อมสีชนิดต่างๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (n=35)

	Sensitivity (%)				
	ยิมซา	โกโมไร มิเทนนามิน ซิลเวอร์	โกลูติดีนบลูโอ	อิมมูโน ฟลูออเรสเซน	ปฏิกริยา ลูกโซ่โพลี เมอร์เรส
เสมอหะ1	22.9	60	51.4	77.1	88.6
เสมอหะ2	20	54.3	45.7	65.7	77.1
เสมอหะ3	20	54.3	51.4	77.1	88.6
เสมอหะบวก1ใน 3*	40	77.1	62.9	88.6	91.4
น้ำล้างปอด	94.3	97.1	97.1	97.1	97.1

*เสมอหะพบเชื้อตั้งแต่ 1 specimen ขึ้นไปในการตรวจแต่ละวิธี ถือว่าเป็นบวก

จากการศึกษาพบว่า การตรวจเสมอหะในแต่ละครั้งด้วยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และ สีย้อมเดียวกันมีความไวใกล้เคียงกัน โดยปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสมีความไวสูงสุด ร้อยละ 88.6

ยิมซา มีความไวต่ำสุด ร้อยละ 22.9 เมื่อตรวจเสมหะ 3 ครั้ง พบว่ามีความไวเพิ่มมากกว่า การตรวจเสมหะครั้งเดียว โดยปฏิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรสมีความไวเพิ่มขึ้นถึง ร้อยละ 91.4 อิมมูโนฟลูออเรสเซน ร้อยละ 88.6 โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ ร้อยละ 77.1 โทลูอิดีนบลูโอ ร้อยละ 62.9 ส่วนยิมซามีความไวต่ำสุด ร้อยละ 40 การตรวจน้ำล้างปอดมีความไวสูง และไม่แตกต่างกันในแต่ละสีย้อม อิมมูโนฟลูออเรสเซนและปฏิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะหรือน้ำล้างปอดที่เก็บได้เท่านั้น จะพบว่าความไวของการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง ด้วยโกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ สูงถึง ร้อยละ 84.3 อิมมูโนฟลูออเรสเซน ร้อยละ 96.9 และปฏิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส ร้อยละ 100

ตารางที่ 11 แสดงความไวการตรวจเสมหะและน้ำล้างปอดด้วยการย้อมสีชนิดต่างๆ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และปฏิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะหรือน้ำล้างปอดที่เก็บได้เท่านั้น

	n Total=35	Sensitivity(%) ถ้า n เป็นเสมหะที่เก็บได้				
		ยิมซา	โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์	โทลูอิดีนบลูโอ	อิมมูโนฟลูออเรสเซน	ปฏิริยาถูกใช้โพลีเมอร์เรส
เสมหะ1	31	25.8	67.7	58	87.1	100
เสมหะ2	28	25	67.9	57	82.1	96.4
เสมหะ3	31	22.5	61.3	58	87.1	100
เสมหะบวก1ใน 3 [*]	32	43.8	84.3	68.8	96.9	100
น้ำล้างปอด	34	97	100	100	100	100

* เสมหะพบเชื้อตั้งแต่ 1 specimen ขึ้นไปในการตรวจแต่ละวิธี ถือว่าเป็นบวก

การตรวจเสมหะครั้งที่ 2 เพิ่มความไวจากการตรวจครั้งแรก ร้อยละ 2.9-11.5 ครั้งที่ 3 เพิ่มความไวจากการตรวจ 2 ครั้ง ร้อยละ 2.9 -8.6 โดยขึ้นกับชนิดสีย้อม และการตรวจน้ำล้างปอด ก็จะเพิ่มความไวเมื่อตรวจไม่พบเชื้อจากเสมหะด้วย

ตารางที่ 12 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะหรือเมื่อส่องกล้องตรวจน้ำล้างปอด (n=35)

	เสมหะ1 (%sensitivity)	เสมหะ2 (%sensitivity ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเสมหะครั้งที่ 1 ไม่พบเชื้อ)	เสมหะ3 (%sensitivity ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเสมหะครั้งที่ 1+2 ไม่พบเชื้อ)	น้ำล้างปอด (%sensitivity ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเสมหะครั้งที่ 1+2+3 ไม่พบเชื้อ)
ยิมซา	22.9	11.5	5.7	57.1
โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์	60	11.5	5.7	22.9
โทลูอิดีนบลูโอ	51.4	5.7	5.7	13
อิมมูโนฟลูออเรสเซน	77.1	2.9	8.6	11.5
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	88.6	0	2.9	8.6

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบความไวการตรวจเสมหะ 3 ครั้งในแต่ละวิธีกับการตรวจน้ำล้างปอด (n=35)

	Sensitivity (%)	
	เสมหะพบเชื้อ 1 ใน 3 ครั้ง	น้ำล้างปอด
ยิมซา	40	94.3
โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์	77.1	97.1
โทลูอิดีนบลูโอ	62.9	97.1
อิมมูโนฟลูออเรสเซน	88.6	97.1
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส	91.4	97.1

การย้อมเสมหะหลายวิธีจะเพิ่มความไวมากขึ้น ในการย้อมเสมหะครั้งแรก ถ้าย้อม cytochemical stain 2 วิธี การย้อมโกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ และโทลูอิดีนบลูโอดีที่สุด โดยมีความไว ร้อยละ 74.3 ถ้าใช้ 3 วิธี มีความไวเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 77.1 และถ้าใช้ ร่วมกับอิมมูโน ฟลูออเรสเซนด้วยจะมีความไวร้อยละ 80 ใช้ร่วมกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จะมีความไว ร้อยละ 88.6 และถ้าตรวจเสมหะ 3 ครั้ง มีความไวสูงถึง ร้อยละ 91.5 เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะที่เก็บได้เท่านั้น จะมีความไวสูงถึง ร้อยละ 100

ตารางที่ 14 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะ โดยการย้อมสี 2-4 วิธี และปฏิกิริยาถูกโซไฟลีสเมอร์เรส (n=35)

	Sensitivity (%)		
	เสมหะ 1	เสมหะ1+ 2	เสมหะ1+2+3
Giemsa+GMS+toluidine blue+PCR	88.6	88.6	91.5
Giemsa+GMS+toluidine blue+IFA	80	85	91.5
Giemsa+GMS+toluidine blue	77.1	82.9	85.7
GMS+toluidine blue	74.3	80	82.9
Giemsa+GMS	68.6	82.9	85.7
Giemsa+toluidine blue	54.3	65.7	71.4

เสมหะพบเชื้อในการย้อมสีตั้งแต่ 1 วิธีขึ้นไปในการย้อมสี 2-4 วิธีในแต่ละspecimen ถือว่าเป็นบวก
Giemsa = ยิมซา, GMS = โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์, toluidine blue = โทลูอิดีนบลูโอ,
IFA = อิมมูโนฟลูออเรสเซน, PCR = ปฏิกิริยาถูกโซไฟลีสเมอร์เรส

ตารางที่ 15 แสดงการเพิ่มความไวการตรวจเสมหะเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจเสมหะ โดยการย้อมสี 2-4 วิธี และ ปฏิกิริยาถูกโซไฟลีสเมอร์เรส เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะที่เก็บได้เท่านั้น

n=32	Sensitivity(%)		
	เสมหะ1	เสมหะ1+2	เสมหะ1+2+3
Giemsa+GMS+toluidine blue+PCR	96.9	96.9	100
Giemsa+GMS+toluidine blue+IFA	87.5	93.8	100
Giemsa+GMS+toluidine blue	84.4	90.6	93.8
GMS+toluidine blue	81.3	87.5	90.6
Giemsa+GMS	75	90.6	93.8
Giemsa+toluidine blue	59.4	71.9	78.1

เสมหะพบเชื้อในการย้อมสีตั้งแต่ 1 วิธีขึ้นไปในการย้อมสี 2-4 วิธีในแต่ละspecimen ถือว่าเป็นบวก
Giemsa = ยิมซา, GMS = โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์, toluidine blue = โทลูอิดีนบลูโอ, IFA = อิมมูโน
ฟลูออเรสเซน, PCR = ปฏิกิริยาถูกโซไฟลีสเมอร์เรส

การตรวจเสมหะครั้งแรกด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซน ร่วมกับ cytochemical stain อื่นๆ
เพิ่มความไวจากการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนเพียงอย่างเดียวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนการตรวจ

ด้วยปฏิกิริยาถูกใช้โพสเมอไรเซส มีความไวสูงมาก ร้อยละ 100 เมื่อใช้ n เป็นจำนวนเสมหะที่เก็บได้ จึงสามารถใช้ตรวจเพียงวิธีเดียวได้ โดยไม่มีความจำเป็นต้องใช้ร่วมกับวิธีอื่น (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบความไวที่เพิ่มขึ้นจากการย้อมด้วยอิมมูโนฟลูออเรสเซน และการตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาถูกใช้โพสเมอไรเซส (n=35)

n=35	เสมหะ 1
PCR	88.6%
Giemsa+ GMS+ toluidine blue+ IFA+ PCR	88.6%
Giemsa+ GMS+ toluidine blue+ IFA	80%
Giemsa+ GMS+ IFA	80%
Giemsa+ toluidine blue+ IFA	80%
GMS+ toluidine blue+ IFA	80%
Giemsa+ IFA	77.1%
toluidine blue+ IFA	80%
GMS+ IFA	80%
IFA	77.1%

Giemsa = ยิมซา, GMS = โกโมโรมิเทนนามินซิดเวอร์, toluidine blue = โทลูอิดีนบลูโอ,
IFA = อิมมูโนฟลูออเรสเซน, PCR = ปฏิกิริยาถูกใช้โพสเมอไรเซส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

การอภิปรายผลการศึกษา

ปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี (PCP) เป็นการติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยเอดส์ ถึงแม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับการรักษาแบบ empirical treatment ก็ตาม แต่ในผู้ป่วยที่มีอาการปอดติดเชื้อรุนแรง หรือตอบสนองของการรักษาช้า หรือเคยได้รับยาป้องกันการติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี มาก่อน ควรได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อ

เนื่องจากเชื้อนิวโมซิสติสซิโรเวคซี ไม่สามารถเพาะเชื้อได้ในหลอดทดลอง การย้อมสี cytochemical stain อิมมูโนฟลูออเรสเซน และตรวจ ปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากเสมหะ หรือน้ำล้างปอด จึงเป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการวินิจฉัย

ผลการตรวจย้อมสีจากเสมหะ และน้ำล้างปอด มีความไวแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา โดยขึ้นกับชนิดสีที่ย้อมและวิธีการศึกษา ดังได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น การย้อมจากน้ำล้างปอดมี ความไวมากกว่าการย้อมจากเสมหะ ในหลายการศึกษาพบว่าการย้อมเสมหะหลายครั้งเพิ่มความไวในการตรวจ เชื้อมากขึ้น โดยเฉพาะในการศึกษาของ Narasimha และคณะ[11] พบว่าการตรวจเสมหะ โดยการย้อมสี โทลูอิดีนบลูโอ 3 ครั้งเพิ่มความไวจาก ร้อยละ 20-40 เป็น 70 ซึ่งการศึกษาดังกล่าว ได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง เพิ่มความไวของการตรวจเชื้อโดยการย้อมสียิมซา เพิ่มความไวจาก ร้อยละ 22.9 เป็น 40 โกลโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ เพิ่มความไวจาก ร้อยละ 60 เป็น 77.1 โทลูอิดีนบลูโอเพิ่มความไวจาก ร้อยละ 51.4 เป็น 62.9 อิมมูโนฟลูออเรสเซน เพิ่มความไวจาก ร้อยละ 77.1 เป็น 88.6 และปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพิ่มความไวจาก ร้อยละ 88.6 เป็น 91.4 โดยปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีความไวสูงถึง ร้อยละ 100 เมื่อนับเฉพาะเสมหะที่เก็บได้

การตรวจย้อมสีจากเสมหะครั้งที่ 2 และ 3 เพิ่มความไว ร้อยละ 2.9-11.5 แตกต่างกัน ตามสีย้อม ยิมซาและโกลโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์เพิ่มความไวจากการย้อมครั้งที่ 2 ร้อยละ 11.5 ครั้งที่ 3 ร้อยละ 5.7 โทลูอิดีนบลูโอเพิ่มความไวจากการย้อมครั้งที่ 2 ร้อยละ 5.7 ครั้งที่ 3 ร้อยละ 5.7 อิมมูโนฟลูออเรสเซนเพิ่มความไวจากการย้อมครั้งที่ 2 ร้อยละ 2.9 ครั้งที่ 3 ร้อยละ 8.6 ส่วนปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส ไม่เพิ่มความไว เนื่องจากความไวร้อยละ 100 อยู่แล้ว ความไวของปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากจำนวนเสมหะที่เก็บได้เพิ่มขึ้นในครั้งที่ 2 และ 3 การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซน และปฏิภิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีความไวมากกว่า การย้อมด้วยวิธีอื่นๆ แต่ตรวจได้ในบางแห่งเท่านั้น และมีราคาแพง

การตรวจเชื้อด้วยหลายวิธีร่วมกัน เพิ่มความไวได้มากเช่นเดียวกัน โดยการย้อม โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ กับ โทลูอิดีนบลูโอมีความไว ร้อยละ 74.3 โกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์, โทลูอิดีน บลูโอ กับ ยิมซา มีความไว ร้อยละ 77.1 ซึ่งใกล้เคียงกับการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซน (ร้อยละ 77.1) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ในโรงพยาบาลส่วนใหญ่ และราคาถูกลงกว่า การใช้ อิมมูโนฟลูออเรสเซน ร่วมกับ cytochemical stain อื่นๆ สามารถเพิ่มความไวได้ แต่ไม่มาก

การย้อมเสมหะหลายๆ ครั้งและย้อมหลายวิธีมีความไวสูงมาก โดยถ้าย้อมเสมหะ 3 ครั้งด้วย 4 วิธี มีความไวสูงถึง ร้อยละ 91.5 สามารถเพิ่มการวินิจฉัย และลดความจำเป็นในการส่องกล้องได้มาก

ซึ่งผลการศึกษานี้มีความแตกต่างจากการศึกษาของ Mishra M. และคณะ [75] ที่พบว่า การย้อมสีหลายวิธีไม่เพิ่มความไวการตรวจเชื้อ โดยทำการศึกษาผู้ป่วยเอดส์ที่สงสัยการติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิสโรเวคซี ตั้งแต่ปี ค.ศ.1999 ถึง 2005 พบเชื้อ 279 ใน 1101 ของเสมหะที่ส่งตรวจ ใน 279 เสมหะนั้น ย้อมโกโมโรมิเทนนามินซิลเวอร์ ร้อยละ 100 โทลูอิดีนบลูโอ ร้อยละ 98.2 และ ยิมซา ร้อยละ 91.78

อย่างไรก็ตาม การตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอด ยังเป็นวิธีที่มีความไวสูง การย้อม 4 วิธีและตรวจปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีความไวใกล้เคียงกันมาก ร้อยละ 94-97 จึงยังคงเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัย แต่อาจมีภาวะแทรกซ้อนรุนแรงจากการส่องกล้องได้ จึงควรทำในผู้ป่วยที่ตรวจเสมหะไม่พบเชื้อเท่านั้น

ในแง่ของระยะเวลาการเก็บเสมหะและน้ำล้างปอด หลังให้การรักษาอาจจะมีผลต่อการพบเชื้อหรือไม่นั้น ยังไม่มีการศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสม ว่าควรทำภายในกี่วันจึงจะมีผลต่อความไวการตรวจน้อยที่สุด ในการศึกษายุคเริ่มแรกของการระบาดเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซีในผู้ป่วยเอดส์พบว่าเชื้อจะอยู่ได้นานในผู้ป่วยเอดส์มากกว่าผู้ป่วยภูมิคุ้มกันโรคบกพร่องจากเหตุอื่น ในช่วงกลางทศวรรษ 1980 Wharton และคณะ กับ Delorenzo และคณะ [28] ศึกษา การตอบสนองของการติดเชื้อนิวโมซิสติสต่อการรักษาด้วยยา trimethoprim-sulfamethoxazole หรือ pentamidine ติดตามตรวจเชื้อโดยวิธี lung biopsy พบเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี ในสัปดาห์ที่ 3 หลังเริ่มการรักษา ร้อยละ 64 และ 38 ตามลำดับ ต่อมา Water J.และคณะ [76] ได้ตรวจเสมหะผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี หลังให้การรักษาด้วยยามาตรฐาน 3 สัปดาห์ 24 ราย ในสัปดาห์ที่ 2, 3, 4 และ 6 ด้วยการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซน ผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังคงพบเชื้อจากเสมหะระหว่างให้การรักษา ร้อยละ 88 (21 ใน 24 ราย) ยังคงพบเชื้อจากเสมหะในสัปดาห์ที่ 2 ร้อยละ 76 (16 ใน 21 ราย) ยังคงพบเชื้อในสัปดาห์ที่ 3 โดยผู้ป่วยทุกรายมีอาการและภาพรังสีปอดดีขึ้น มีผู้ป่วย 17 ราย ที่ติดตามถึง 6 สัปดาห์ ในสัปดาห์ที่ 4 ยังพบเชื้อ ร้อยละ 29 (5 ใน 17 ราย) และในสัปดาห์ที่ 6 ยังพบเชื้อ ร้อยละ 24

(4 ใน 17 ราย) จากการศึกษาดังกล่าว จึงควรเก็บเสมหะเพื่อส่งตรวจภายในสัปดาห์แรก การศึกษาของเรา ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการตรวจภายในสัปดาห์แรก มีผู้ป่วย เพียง 1 รายที่ตรวจเสมหะวันที่ 15 หลังให้การรักษาเนื่องจากผู้ป่วยรับการรักษาที่โรงพยาบาลอื่นมาก่อน ส่วนน้ำล้างปอด มีผู้ป่วย 2 รายที่ตรวจเกิน 7 วัน (9 และ 16 วัน) โดยผู้ป่วยดังกล่าวยังคงตรวจพบเชื้อทั้งจากเสมหะและน้ำล้างปอด

สำหรับวิธีการกระตุ้นเสมหะเพื่อส่งตรวจเชื้อ ยังไม่มีการศึกษาวิธีการมาตรฐาน การศึกษานี้เลือกใช้ large volume ultrasonic nebulizer เนื่องจากผู้ป่วย PCP ส่วนใหญ่ไม่มีเสมหะ หรือมีเสมหะปริมาณน้อย การกระตุ้นด้วย ultrasonic nebulizer มีประสิทธิภาพการกระตุ้นเสมหะดีกว่า jet nebulizer droplet mass เล็กกว่า ใช้ปริมาณสารละลายกระตุ้นเสมหะได้มากกว่าโดยใช้เวลาในการกระตุ้นสั้นกว่า ทำให้ได้ปริมาณเสมหะมากพอที่จะส่งตรวจ และการศึกษาส่วนใหญ่ ก่อนหน้านั้นใช้วิธีดังกล่าว เลือกใช้ 3% saline (hypertonic saline) ถึงแม้ว่าจะไม่มีข้อมูลชัดเจนว่ามีประสิทธิภาพการกระตุ้นเสมหะดีกว่า normal saline แต่เชื่อว่าน่าจะทำได้ปริมาณเสมหะ ตามต้องการมากกว่า การใช้ hypertonic saline อาจทำให้มีหลอดลมหดตัวได้มากกว่า normal saline แต่จากการศึกษาในที่นี้ไม่พบว่ามีภาวะดังกล่าวเกิดขึ้น

Leigh และคณะ[77] ศึกษาผลของการกระตุ้นเสมหะ ต่อการลดลงของออกซิเจน และการทำงานของปอด Force expiratory volume at 1 second (FEV1) โดยใช้ spirometry ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างคนปกติ 15 ราย ผู้ป่วยเอดส์ที่ไม่มีอาการ 10 ราย และผู้ป่วยเอดส์ที่เป็น PCP 110 ราย พบว่า ผู้ป่วยเอดส์ที่เป็น PCP มีออกซิเจนสูงสุดขณะพ่นยา ออกซิเจนตลอดระยะเวลา ระหว่างการพ่นยาต่ำกว่า การลดลงของออกซิเจน และ FEV1 มากกว่า ผู้ที่ไม่ได้เป็น PCP จากการศึกษา นี้ พบว่าการกระตุ้นเสมหะผู้ป่วยมีออกซิเจนลดลงระหว่างการพ่นยา โดยเฉพาะเวลาไอ แต่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มออกซิเจน ไม่มีภาวะหายใจล้มเหลวเกิดขึ้น จึงเป็นวิธีที่ปลอดภัยและผู้ป่วยสามารถทนได้ (tolerable) แม้มีออกซิเจนต่ำอยู่เดิม

เนื่องจาก PCP สามารถเกิด nosocomial transmission ได้ โดยมีรายงานจากหลาย การศึกษาถึงการสัมผัสผู้ป่วยที่เป็น PCP มาก่อน และติดเชื้อ PCP ตามมาภายหลัง [78] ดังแสดงใน ตารางที่ 17 แต่รายงานเหล่านี้มีข้อจำกัด ยังไม่มีการศึกษา genotype ของเชื้อเพื่อยืนยันว่าผู้ที่ป่วย เป็น PCP หลังจากสัมผัสเชื้อ มี genotype ของเชื้อแบบเดียวกัน ต่อมา Boer และคณะ [79] ศึกษา case control analysis โดยตรวจ genotype ของเชื่อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี ในผู้ป่วยที่ได้รับการ เปลี่ยนไตที่เป็น PCP 22 ราย พบว่า มี 1 predominant genotype และทำ transmission map พบว่ามี nosocomial transmission แต่ไม่สามารถประเมินได้ว่า ติดเชื้อมาจากการสัมผัสผู้ป่วยที่

เป็น PCP ที่เป็น index case จากบุคลากรที่เป็นพาหะของเชื้อนิวโมซิสติส หรือจากสิ่งแวดล้อมในโรงพยาบาล

ตารางที่ 17 แสดงรายงานการศึกษาถึงการสัมผัสผู้ป่วยที่เป็น PCP มาก่อน และติดเชื้อ PCP ตามมาภายหลัง [78]

ปี	จำนวนผู้ป่วย	Observation period (เดือน)	โรค	ประวัติการสัมผัสผู้ป่วยที่เป็น PCP
1965	3	4	1 leukemia 2 no predisposing illness	Share household
1969	2	2	Lymphoma	Share hospital room
1970	19	18	Pediatric malignancies	In and out patient hospital contact
1975	2	12	Myeloma lymphoma	Share household
1975	11	3	Lymphoma leukemia	In and out patient hospital contact
1978	10	10	Pediatric malignancies	out patient hospital contact
1990	2	2	Leukemia	Share hospital room
1990	10	4	Renal transplant recipients	Inpatient hospital contact
1991	5	22	Renal transplant recipients	Out patient hospital contact with AIDS
1991	5	3	no predisposing illness	In and out patient hospital contact
1994	3	1.5	Pediatric malignancies	Share hospital room
1997	6	1-5	HIV infection	Share households

Sergio และคณะ[80] ศึกษาการติดต่อของโรค โดยตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส จาก deep nasal swab และ antibody โดย Index case คือผู้ป่วยเด็กอายุ 8 เดือน ป่วยเป็น PCP และไม่ได้เป็นโรคเอดส์ ตรวจมารดาผู้ป่วย บุคลากรทางการแพทย์ที่สัมผัสผู้ป่วย 2 ราย และบุคลากรทางการแพทย์ที่ไม่ได้สัมผัสผู้ป่วย 30 ราย ตรวจพบเชื้อในผู้ที่สัมผัสผู้ป่วยทุกราย และไม่พบเชื้อในบุคลากรทางการแพทย์ที่ไม่ได้สัมผัสผู้ป่วยเลย และผู้ที่สัมผัสผู้ป่วยทุกรายมี antibody ต่อเชื้อ แต่ตรวจติดตามต่อไปแล้วไม่เพิ่มขึ้นรวมทั้งไม่มี serological response และไม่ป่วยเป็นโรคด้วย

ต่อมามีรายงานการตรวจพบเชื้อในบุคลากรทางการแพทย์ที่ไม่ได้สัมผัสผู้ป่วยด้วย โดยพบว่าบุคลากรทางการแพทย์ที่สัมผัสผู้ป่วยเอดส์มีความเสี่ยงต่อการเป็นพาหะของเชื้อนิวโมซิสติส ร้อยละ 24 มากกว่าที่ไม่ได้สัมผัสผู้ป่วยซึ่งพบเพียงร้อยละ 11 แต่เชื้อที่พบในบุคลากรทางการแพทย์ที่เป็นพาหะ มีหลาย genotype และบาง genotype ไม่พบในพื้นที่นั้น จึงอาจมีการ รับเชื้อมาจากสิ่งแวดล้อมอื่นด้วย ถึงแม้ว่าการกระตุ้นเสมหะ จะมีความเสี่ยงต่อ nosocomial transmission ก็ตาม [81-84] แต่ผู้ที่ได้รับเชื้อไม่ได้ป่วยเป็นโรคด้วย จึงไม่มีความสำคัญทางคลินิก

ผู้ป่วย PCP มักติดเชื้อฉวยโอกาสชนิดอื่นร่วมได้บ่อย โดยมีรายงานการพบเชื้อ Cryptococcus, Cytomegalovirus, Aspergillus, Herpes simplex virus, Candida, Mycobacterium avium intracellulare และแบคทีเรียอื่นๆ จากการย้อมหรือเพาะเชื้อในเนื้อเยื่อปอดที่ส่งตรวจในผู้ป่วย PCP [85-87] การพบเชื้อวัณโรคร่วมด้วยมีรายงานจำนวนน้อย [88-90] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการศึกษาส่วนใหญ่ทำในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคต่ำ Draganovic และคณะ [91] ทำการศึกษาแบบ retrospective ในประเทศแอฟริกาใต้ ซึ่งมีความชุกของวัณโรค 386 รายต่อประชากร 100,000 ราย มีผู้ป่วยเอดส์ที่พบเชื้อวัณโรคร่วมกับ PCP 39 ราย (ร้อยละ 9.9 ของผู้ป่วย PCP ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา) โดยการตรวจเชื้อจากเสมหะด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนของเชื้อนิวโมซิสติส ย้อม Acid fast bacilli (AFB) และเพาะเชื้อวัณโรค ผู้ป่วยดังกล่าวมีอาการไอ ร้อยละ 82 ไอเป็นเลือดร้อยละ 5 น้ำหนักลดร้อยละ 79 เหงื่อออกกลางคืนร้อยละ 45 เหนื่อย ร้อยละ 34 ไข้ ร้อยละ 32 มีผู้ป่วย 10 รายที่ทราบว่าเป็นวัณโรคก่อนการรักษา ผู้ป่วยเอดส์ 39 รายนี้ มีภาพรังสีปอด ดังนี้ bilateral patchy infiltration 15 ราย reticulonodular infiltration 11 ราย focal consolidation 9 ราย hilar/paratracheal lymphadenopathy 7 ราย pleural effusion 6 ราย necrotizing/cavitation 5 ราย pericardial effusion 2 ราย bronchopulmonary fistula 1 ราย

พบเชื้อวัณโรคจากตรวจเสมหะ AFB 20 ราย ตรวจ AFB จากไขกระดูก 1 ราย ต่อม น้ำเหลือง 1 ราย เพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะ 21 ราย จากไขกระดูก 10 ราย น้ำในโพรง เยื่อหุ้มปอด 4 ราย จากเลือด ต่อม น้ำเหลือง และ bronchial wash อย่างละ 1 ราย

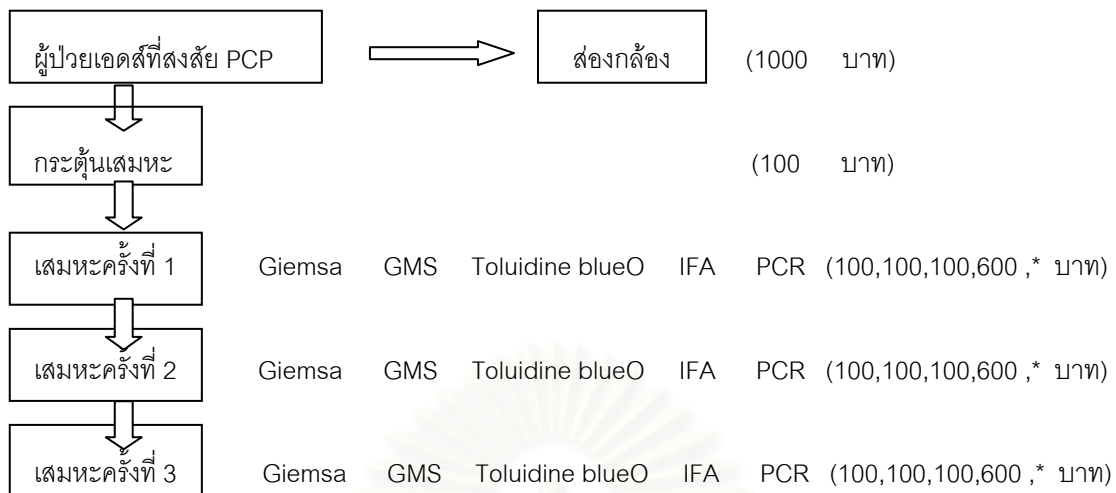
Klein และคณะ[92] ศึกษาการติดเชื้อวัณโรคร่วมในผู้ป่วยที่สงสัย PCP โดยศึกษาผลตรวจเสมหะในผู้ป่วยที่สงสัย PCP และได้รับการตรวจอิมมูโนฟลูออเรสเซนของเชื้อนิวโมซิสติส AFB และเพาะเชื้อวัณโรค 373 ราย 519 ตัวอย่าง พบเชื้อ PCP 136 ใน 519 ตัวอย่าง (ร้อยละ 26) Mycobacterium tuberculosis 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.9) ในผู้ป่วย 9 ราย ตรวจพบผลบวกจาก AFB 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 1.7) 7 ใน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 78) เพาะเชื้อขึ้นเป็น Mycobacterium tuberculosis 2 ใน 9 ตัวอย่าง (ร้อยละ 22) เพาะเชื้อขึ้นเป็น Mycobacterium avium complex 66 ตัวอย่าง เพาะเชื้อ Mycobacterium ขึ้นโดยที่ AFB เป็นผลลบ 3 ใน 66 ตัวอย่าง (ร้อยละ 4.5) เพาะเชื้อขึ้นเป็น Mycobacterium tuberculosis และ 63 ตัวอย่าง ขึ้นเป็น Mycobacterium อื่นๆ ผู้ป่วย 6 ใน 9 ราย ทราบว่าเป็นวัณโรคมาก่อน ผู้ป่วย 1 ใน 9 ราย ไม่มีอาการทางคลินิกที่สงสัย วัณโรคเลย

ในการศึกษานี้ พบการติดเชื้อวัณโรคร่วมด้วย 4 ราย ทราบว่าเป็นวัณโรคมาก่อน 1 ราย โดย 2 ราย ตรวจพบผลบวกจาก AFB และรักษาวัณโรคแล้วอาการดีขึ้น 1 ราย ไม่พบเชื้อวัณโรค แต่ยังคงมีไข้ รับประทานอาหารไม่ได้ น้ำหนักลด หลังได้รับการรักษา PCP แม้ว่าออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็นปกติแล้วก็ตามและอาการดีขึ้นหลังการรักษาวัณโรค แต่การศึกษานี้มีข้อจำกัด ไม่ได้ส่งเพาะเชื้อวัณโรคทุกราย ผู้ป่วย 4 รายนี้มีภาพรังสีปอด diffuse reticular infiltration ทุกรายไม่มีต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอดโต หรือน้ำในโพรงเยื่อหุ้มปอดเลย

อย่างไรก็ตามเนื่องจากวัณโรคเป็น airborne transmission ผู้ป่วย PCP อาจมีการติดเชื้อวัณโรคร่วมด้วย การกระตุ้นเสมหะจึงควรคำนึงถึงการแพร่เชื้อวัณโรคสู่บุคลากรทางการแพทย์และผู้ป่วยอื่นๆ จึงควรทำการกระตุ้นเสมหะในห้องแยกที่มี negative pressure เพื่อลดความเสี่ยงนี้

สำหรับค่าใช้จ่ายในการส่งตรวจ วิธีการตรวจเสมหะจึงประหยัดกว่ามาก โดยสามารถเลือกวิธีการยอมตามศักยภาพของแต่ละโรงพยาบาลดังรูปที่ 24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 แสดงราคาการส่งตรวจเสมหะ การส่องกล้อง และการตรวจเชื้อโดยวิธีต่างๆ ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ * PCR ยังไม่เปิดบริการ อยู่ในโครงการวิจัยเท่านั้น

ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและความคุ้มค่าจากการตรวจเชื้อจากเสมหะขึ้นกับความชุกของผู้ป่วย PCP ในประชากรด้วย [93,94] ถ้ามีความชุกมาก ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและความคุ้มค่ายิ่งสูง ตัวอย่างเช่น ที่ซานฟรานซิสโก ประเทศสหรัฐอเมริกา มีความชุก PCP ในประชากรที่รับการตรวจเชื้อจากเสมหะร้อยละ 75 ความไวของการตรวจเสมหะร้อยละ 92 ลดความจำเป็นในการส่องกล้องได้ร้อยละ 61 ที่ปารีส ประเทศฝรั่งเศส มีความชุก PCP ในประชากรที่ศึกษาร้อยละ 30 ความไวของการตรวจเสมหะ เพียงร้อยละ 56 ลดความจำเป็นในการ ส่องกล้องได้ร้อยละ 17 จาก Statistic model ความชุก PCP ในประชากรที่รับการตรวจเชื้อจากเสมหะน้อยกว่าร้อยละ 48 จะลดประสิทธิภาพในการวินิจฉัยและความคุ้มค่าเป็นอย่างมาก สำหรับการศึกษานี้ที่นี้ ความชุกของ PCP ในผู้ป่วยที่มาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการดังกล่าวและได้รับการตรวจเชื้อจากเสมหะนี้สูง จึงมีความคุ้มค่าเป็นอย่างมาก

การศึกษานี้มีข้อจำกัด ไม่สามารถประเมิน ความจำเพาะ negative predictive value และ positive predictive value ได้ เนื่องจากผู้ป่วยที่มีอาการสงสัย PCPตามข้อตกลงเบื้องต้น ตรวจพบเชื้อ PCP ทุกราย แต่การวิจัยนี้ได้แก้ไขโดยส่ง respiratory specimen ของ ผู้ป่วยที่มาตรวจด้วยโรคอื่นเป็น negative control ซึ่งพบว่าไม่มีผลบวกหลง

การที่ผู้ป่วยที่มีอาการสงสัย PCPตามข้อตกลงเบื้องต้น ตรวจพบเชื้อ PCP ทุกราย อาจเป็นเพราะความชุกของ PCP ในผู้ป่วยที่มาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการดังกล่าวนี้สูง จึงสามารถให้อาการทางคลินิกในการวินิจฉัยได้อย่างแม่นยำ

ถึงแม้ว่า PCP สามารถวินิจฉัยโดยใช้อาการทางคลินิก และให้การรักษาแบบ empirical ได้ โดยติดตามอาการตอบสนองทางคลินิกหลังให้การรักษา แต่มีผู้ป่วยบางรายดังได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น ที่มีความจำเป็นต้องได้รับการตรวจยืนยันการติดเชื้อนี้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงให้ข้อสรุปและแนวทางการเลือกใช้สิ่งส่งตรวจ ตลอดจนวิธีการตรวจต่างๆ ซึ่งได้รับการประเมินทั้งในเชิงคุณสมบัติ การตรวจวินิจฉัยและความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐกิจ อันจะเป็นแนวทางในการวางมาตรฐานในการวินิจฉัยโรค PCP ต่อไปอย่างมีประสิทธิภาพ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 8

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวินิจฉัย PCP มีข้อจำกัด เนื่องจากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ ผู้ป่วย PCP ส่วนใหญ่มีเสมหะปริมาณน้อย การส่องกล้องเพื่อตรวจหาเชื้อในน้ำล้างปอด (BAL) จึงเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ปัจจุบันพบว่าการกระตุ้นเสมหะเพื่อตรวจหาเชื้อมีความไวในการวินิจฉัยมากขึ้น การศึกษานี้ยืนยันความสำคัญในการตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อในผู้ป่วย PCP เนื่องจากเป็นวิธีการ noninvasive ไม่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง และลดความจำเป็นในการส่องกล้องได้ โดยขั้นตอนการวินิจฉัยการติดเชื้อควรทำตามขั้นตอนตามที่แสดงในรูปที่ 24 สำหรับสรุปจากการศึกษานี้มีดังนี้

1. การตรวจเสมหะด้วยวิธี ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส และ อิมมูโนฟลูออเรสเซน มีความไวมากกว่า โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูอิดีนบลูโอ และ ยิมซา ตามลำดับ

2. การตรวจเสมหะ 3 ครั้ง ช่วยเพิ่มความไวของการตรวจเชื้อ การย้อม ยิมซา เพิ่มความไวจากร้อยละ 22.9 เป็น 40 โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ เพิ่มความไวจากร้อยละ 60 เป็น 77.1 โทลูอิดีนบลูโอเพิ่มความไวจากร้อยละ 51.4 เป็น 62.9 อิมมูโนฟลูออเรสเซนเพิ่มความไวจากร้อยละ 77.1 เป็น 88.6 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพิ่มความไวจากร้อยละ 88.6 เป็น 91.4

3. การตรวจเชื้อด้วยหลายวิธีร่วมกันเพิ่มความไวได้มาก โดยการย้อมเสมหะครั้งแรก โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์กับโทลูอิดีนบลูโอมีความไวร้อยละ 74.3 โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ , โทลูอิดีนบลูโอกับยิมซา มีความไวร้อยละ 77.1 ซึ่งใกล้เคียงกับการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซน (ร้อยละ 77.1)

4. การตรวจเสมหะด้วยวิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซน หรือ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจเสมหะในโรงพยาบาลที่มีห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจได้ แต่ในโรงพยาบาลที่ไม่มีอุปกรณ์และน้ำยาย้อม สามารถตรวจด้วยวิธี โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ กับ โทลูอิดีนบลูโอ หรือ โกลโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ , โทลูอิดีนบลูโอกับยิมซา ร่วมกันทดแทนได้ ถ้าตรวจไม่พบเชื้อจากเสมหะครั้งแรก ควรตรวจเสมหะซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

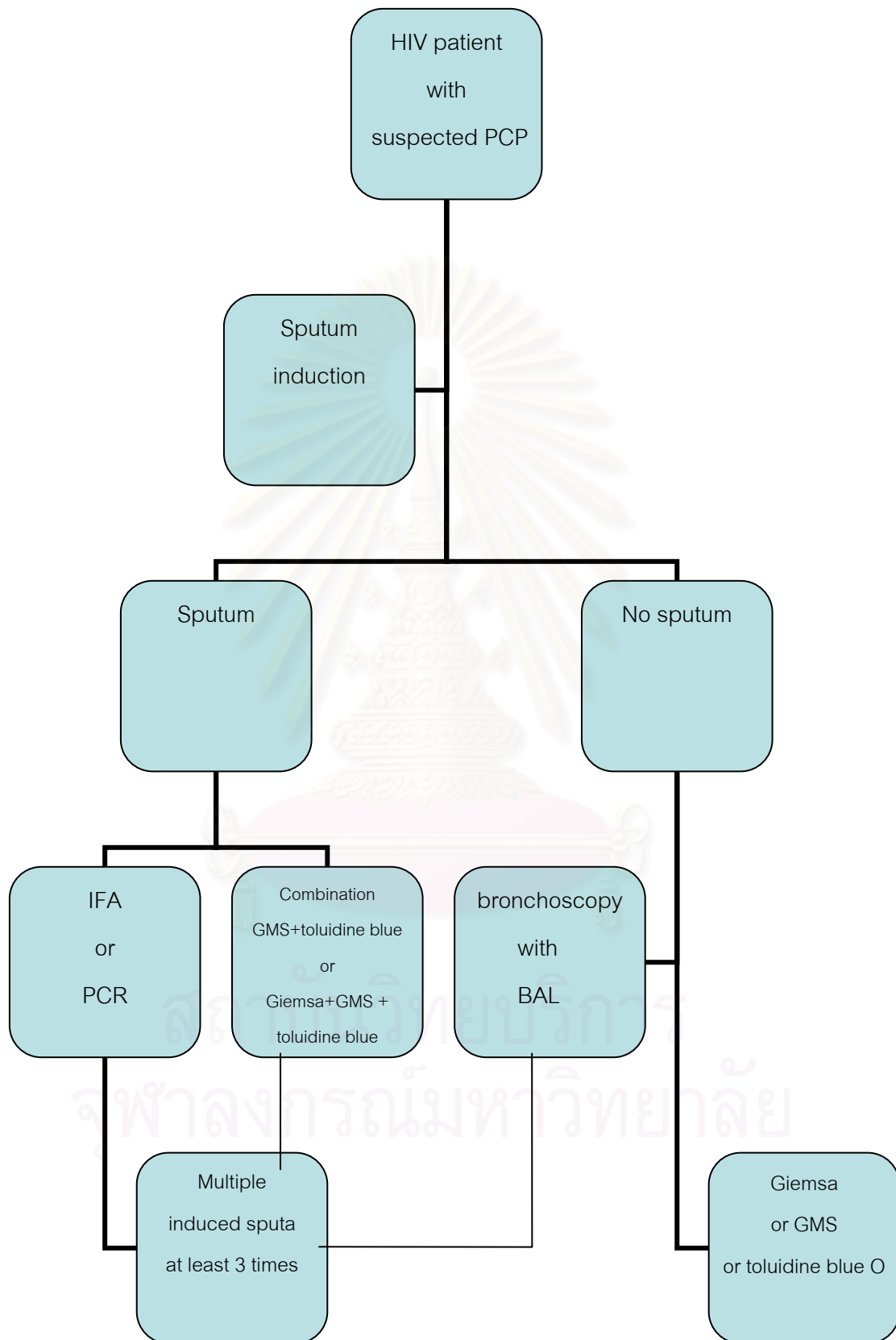
5. ผู้ป่วยที่ไม่มีเสมหะหรือตรวจไม่พบเชื้อจากเสมหะ 3 ครั้ง ให้ส่องกล้องเพื่อตรวจหาเชื้อในน้ำล้างปอด เนื่องจากการย้อมสี cytochemical stain มีราคาสูงกว่าย้อม อิมมูโนฟลูออเรสเซน และ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส การตรวจเชื้อจากน้ำล้างปอด ไม่มีความจำเป็นต้องตรวจ อิมมูโนฟลูออเรสเซนหรือ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส เพราะราคาแพง และความไวไม่แตกต่างจาก การตรวจด้วยวิธีอื่น

6.การข้อมสิทธิ์แต่ละวิธี มีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน ตามที่ได้กล่าวไว้เบื้องต้น จึงควรพิจารณาตามความเหมาะสมตามศักยภาพของโรงพยาบาลแต่ละแห่ง

7.เมื่อพิจารณาค่าใช้จ่าย การตรวจเสมหะประหยัดกว่าการตรวจน้ำล้างปอดเป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าการกรวดน้ำล้างปอดจะมีความไวสูง ร้อยละ 94.3-97.1 ก็ตาม แต่มีภาวะแทรกซ้อนรุนแรง จึงควรพิจารณาตรวจเสมหะเพื่อหาเชื้อในผู้ป่วย PCP ก่อน จะช่วยลดความจำเป็นในการส่องกล้องได้มาก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 ขั้นตอนการวินิจฉัยการติดเชื้อ PCP

รายการอ้างอิง

- [1] Wachter RM, Luce JM, Turner J. Intensive care of patients with the acquired immunodeficiency syndrome outcome and changing patterns of utilization. **Am Rev Respir Dis** 1986;134:891-6.
- [2] Naresh G, Mansharamani, Robert Garland, David Delaney, Henry Koziel. Management and Outcome Patterns for Adult Pneumocystis carinii Pneumonia 1985 to 1995. **Chest** 2000;118:704-11.
- [3] Shelhamer JH, Gill VJ, Quinn TC. The laboratory evaluation of opportunistic pulmonary infections. **Ann Intern Med** 1996;124:585-99.
- [4] Pitchenick AE, Ganjei P, Torres A, Evans DA, Rubin E, Baier H. Sputum examination for diagnosis of Pneumocystis carinii pneumoniae in acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1986;133:226-9.
- [5] Bigby TD, Margolsky D, Curtis JL. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1986;133:515-8.
- [6] Zaman MA, Wooten OJ, Suprahmanya B, Ankobiah W, Finch PJP, Kamholz SL. Rapid noninvasive diagnosis of Pneumocystis carinii from induced liquefied sputum. **Ann Intern Med** 1988;109:7-10.
- [7] Leigh TR, Parsons P, Hume C, Husain OAN, Gazzard B, Collins JV. Sputum induction for diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia. **Lancet** 1989;2:205-6.
- [8] Cregan P, Yamamoto A, Lum A, Van Der Heide T, Mac Donald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of Pneumocystis carinii in respiratory specimens. **J Clin Microb** 1990;28:2432-6.
- [9] Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients: comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. **Acta Cytol** 1995;39:1089-93.
- [10] Kovacks J, Valerie L, Masur H. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia

- improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. **N Engl J Med** 1988;318:589–93.
- [11] Narasimha PD, Prabha MR, Harsha AB, Thomas RJ, Shenoy S, Chakrapani M. Role of multiple induced sputum examination in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 2004 ;35(3):702-4.
- [12] Coleman D L, P.M. Dodek, J.M.Luce, J.A. Golden, W.M. Gold, J.F. Murray. Diagnostic utility of fiberoptic bronchoscopy in patients with PCP and the acquire immune deficiency syndrome . **Am.Rev.Respir.Dis** 1983; 128 :795-9.
- [13]Ognibene F P, J.Shelhamer, V.Gill, A.M.r, D.Loew . The diagnosis of PCP in patients with acquired immune deficiency syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage **Am Rev Respir Dis** 1986;133:929-32.
- [14]Golden J.A., H.Hollander, M.S. StulBArg, G.Gamsu . Bronchoalveolar lavage as the exclusive diagnosis modality for PCP . **Chest** 1986 ;90:18-22.
- [15]Gill J.Vee, Evans Gloria, Stock, Parrillo E. Joseph. Detection of PCP by Fluorescent antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. **J Clin Microb** 1987; 25(10):1837-40.
- [16] Wolfson S. John, Waldron Ann Mary, Sierra stella Luz . Blinded comparison of DFA staining method and a Giemsa staining method for identification of PCP in induced sputum and bronchoalveolar lavage specimens of patients infected with HIV. **J clin Microb**1990 ; 28(9) :2136-8.
- [17]NG.L Valerie, Vinari A Nzeera, Chaisson E. Richard, Yajko M. David. Rapid detection of PCP using a DFA stain **J Clin. Microb** 1990; 28(10):2228-33
- [18] Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, Phunmanee A. PCR diagnosis of PCP on sputum and BAL sample in immunocompromised patients. **Parasitol Res** 2004; 94 : 213-8.
- [19] Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients: comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. **Acta Cytol** 1995;39:1089-93.
- [20] Ribes J A, Limper A H, Espy M J, Smith T F. PCR detection of *Pneumocystis*

- carinii in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity
J clin Microbio1997;35:830-5.
- [21] Torres J, Goldman M, Wheat L J, Tang X. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods **Clin infect dis** 2000 ; 30(1):141-5.
- [22] Chagas C Nova. Ttripanozomiasse humana: estudo sobre a morfologia e o evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1909 ;1 :159-218.
- [23] Carinii A. Formas de eschizogonia do Trypanozoma lewisi. **Commun Soc Med Sao Paulo** 1910 ;16 :204.
- [24] Delanoë P, Delanoë M. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le Trypanosoma Lewisi. **C R Acad Sci** 1912 ;155 :658-60.
- [25] Enrique J Calderón-Sandubete, José M. Varela-Aguilar, Francisco J Medrano-Ortega, Virginia Nieto-Guerrero, Nieves Respaldiza-Salas, Carmen de la Horra-Padilla, et al. Historical Perspective on Pneumocystis carinii Infection **Protist** 2002 ;153(3) : 303-10.
- [26] Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the fungi. **Nature** 1988; 334: 519-22.
- [27] Charles F Thomas, Andrew H Limper. Pneumocystis Pneumonia **NEJM** 2004; 350:2487-98.
- [28] DeLorenzo LJ, Huang CT, Maguire GP, Stone DJ. Roentgenographic patterns of Pneumocystis carinii pneumonia in 104 patients with AIDS. **Chest** 1987;91:323–27.
- [29] Goodman PC. Pneumocystis carinii pneumonia. **J ThoracImaging**1991;6(4):16-21.
- [30] Goodman PC, Daley C, Minagi H. Spontaneous pneumothorax in AIDS patients with Pneumocystis carinii pneumonia. **AJR Am J Roentgenol** 1986;147(1):29-31.
- [31] Goodman PC. The chest film in AIDS. In: Sande MA, Volberding P, eds. The Medical Management of AIDS, 4th ed. Philadelphia: Saunders.1995;592-613.

- [32] Wasser LS, Brown E, Talavera W. Miliary PCP in AIDS. **Chest** 1989 ;96(3) :693-5.
- [33] Barrio JL, Suarez M, Rodriguez JL et al. Pneumocystis carinii pneumonia presenting as cavitating and noncavitating solitary pulmonary nodules in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1986;134:1094–96.
- [34] Pastores SM, Garay SM, Naidich DP et al. Review: pneumothorax in patients with AIDS-related Pneumocystis carinii pneumonia. **Am J Med Sci** 1996;312: 229–34.
- [35] Crans Ca J, Boiselle PM. Imaging features of Pneumocystis carinii pneumonia. **Crit Rev Diagn Imaging** 1999; 40:251–84.
- [36] JE Kuhlman. Pneumocystic infections: the radiologist's perspective **Radiology** 1996; 198: 623.
- [37] WD Travis . Thin-walled cavities cysts and pneumothorax in Pneumocystis carinii pneumonia: further observations. **Radiology** 1990;174:697.
- [38] JS Sandhu, PC Goodman. Pulmonary cysts associated with Pneumocystis carinii pneumonia in patients with AIDS. **Radiology** 1989;173:33.
- [39] Emanuela Lattuada, Giovanni Puppini, Federica Faggian, Massimiliano Lanzafame, Ercole Concia. Pneumatocoele formation during Pneumocystis carinii pneumonia in a man with HIV-1 infection. **The Lancet Infectious Diseases** 2004;4(3) :170.
- [40] Takuya Maeda, Naoki Oyaizu, Tokiomi Endo, Takashi Odawara, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamotoi, et al. Pneumocystis jirovecii pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. **European Journal of Radiology Extra** 2007;61(2):49-52.
- [41] Bartlett J G. Pneumonia in the patient with HIV infection. **Infect Dis Clin N Am** 1998; 12 :807.
- [42] Selwyn P A , Pumerantz A D, Durante A et al . Clinical predictors of Pneumocystis carinii pneumonia bacterial pneumonia and tuberculosis in HIV infected patients **AIDS** 1998;12: 885.
- [43] Cruciani P, Marcati M, Malena O, Bosco G Serpelloni, C. Mengoli.

- Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. **Eur Respir J** 2002; 20: 982 - 89.
- [44] Turner D, Schwarz Y. Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data new issues . **Eur Respir J** 2003; 21: 204 – 8.
- [45] Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: epidemiologic diagnostic and clinical features. **Ann Intern Med** 1974;80: 83-93.
- [46] Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ II. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. **Am Rev Respir Dis** 1989;140:1204–9.
- [47] Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet** 1991;337:1378-9.
- [48] Cartwright CP, Nelson NA, Gill VJ. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. **J Clin Microbiol** 1994; 32:1634-8.
- [49] Moonens F, Liesnard C, Brancart F, Van Vooren JP, Serruys E. Rapid simple and nested polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Scand J Infect Dis** 1995;27(4):358-62.
- [50] Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K et al. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. **J Clin Microbiol** 1995; 33: 3004-7.
- [51] Ribes JA, Limper AH, Espy MJ, Smith TF. PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. **J Clin Microbiol** 1997;35(4):830-5.
- [52] Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. **J Clin Microbiol** 1998;36(7): 2068-72
- [53] Caliendo AM, Hewitt PL, Allega JM, Keen A, Ruoff KL, Ferraro MJ. Performance

- of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. **J Clin Microbiol** 1998; 36(4):979-82.
- [54] Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Russmann H, Tybus K, Pfaff F et al. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. **J Clin Microbiol** 2000 ;38(4) :1461-7.
- [55] Takahashi T, Goto M, Endo T, Nakamura T, Yusa N, Sato N et al. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. **J Med Microbiol** 2002;51(7):611-4.
- [56] Lipschik GY, Gill VJ, Lundgren JD, Andrawis VA, Nelson NA, Nielsen JO et al. Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. **Lancet** 1992; 340(8813):203-6.
- [57] Skøt J, Lerche AG, Kolmos HJ, Nielsen JO, Mathiesen LR, Lundgren JD. *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage and induced sputum: detection with a nested polymerase chain reaction. **Scnd J Inf Dis** 1995;27(4):363-7.
- [58] Weig M, Klinker H, Bogner BH, Meier A, Gross U. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. **J Clin Microbiol** 1997; 35(6):1445-9.
- [59] Weig M, Klinker H, Wilhelm M, Lemmer K, Gross U. Correlation of *Pneumocystis carinii* PCR with clinical diagnosis in immunocompromised patients. **Lancet** 1996;347(9010):1266.
- [60] Rabodonirina M, Raffenot D, Cotte L, Boibieux A, Mayencon M, Bayle G et al. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. **J Clin Microbiol** 1997;35(11):2748-51.
- [61] Mathis A, Weber R, Kuster H, Speich R. Simplified sample processing

- combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. **J Clin Microbiol** 1997;35(7):1691-5.
- [62] Torres J, Goldman M, Wheat LJ, Tang X, Bartlett MS, Smith JW et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. **Clin Infect Dis** 2000;30(1):141-5.
- [63] Agostoni F, Atzori C, Angeli E, Mainini A, Micheli V, Cargnel A. *Pneumocystis carinii* diagnosis: an update. **Int J Antimicrob Agents** 2000;16(4):549-57.
- [64] Olsson M, Stralin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clin Microbiol Infect** 2001;7(9):492-7.
- [65] Chouaid C, Roux P, Lavard I, Poirot JL, Housset B. Use of the polymerase chain reaction technique on induced-sputum samples for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. A clinical and cost-analysis study. **Am J Clin Pathol** 1995;104(1):72-5.
- [66] Jannik Helweg-Larsen. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular biology epidemiology and diagnosis. **Dan Med Bul** 2004;51(3):251-73.
- [67] Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2005 ; 45(3) :405-10.
- [68] Siripattanapipong S, J. Worapong, M. Mungthin, S. Leelayoova, P. Tanariya. Genotypic study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. **J Clin Microbiol** 2005;43:2104-10.
- [69] Kiska DL, Bartholoma NY, Fobres BA. Acceptability of low-volume, induced sputum specimens for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Am J Clin Pathol** 1998;109:335-7.
- [70] Garcia L S, Bruckner D A. *Pneumocystis carinii* in Diagnostic Medical Parasitology.

- 2nd ed. American Society for Microbiology Washington DC : 101-12.
- [71] Musto L, Flanigan M, Elbadawi A. Ten minute silver stain for *Pneumocystis carinii* and fungi in tissue sections. **Arch Pathol Lab Med** 1982; 106(6) : 292-4.
- [72] Saksirisampant W, Eampokalap B, Chantharodevong R, Changthong R. Comparison of methods for identification of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. **J Med Assoc Thai** 2002 ; 85 Suppl 1:S407-14
- [73] Garcia L S, Bruckner D A. Diagnostic Medical Parasitology. 4th ed., American Society for Microbiology Washington DC, 2001.
- [74] Churukian CJ, Schenk EA. Rapid Grocott's methanamine silver nitrate method for fungi and *Pneumocystis carinii*. **Am J Clin Pathol** 1977;68:427-8.
- [75] Mishra M, Thakar YS, Akulwar SL, Tankhiwale NS, Powar RM. Detection of *pneumocystis carinii* in induced sputum samples of HIV positive patients Indian. **J Med Microbiol** 2006 ;24(2):149-50.
- [76] WJ O'Donnell, W Pieciak, GM Chertow, J Sanabria, KC Lahive. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P carinii* pneumonia: assessment by serial sputum induction. **Chest** 1998; 114: 1264 - 8.
- [77] Leigh TR, Kirby K, Gazzard BG, Collins JV. Effect of sputum induction on arterial oxygen saturation and spirometry in HIV infected patients **Eur Respir J** 1994 ;7(3):453-8.
- [78] Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2005;45(3):405-10.
- [79] Mark G J de Boer, Lesia E S, Buijnesteijn van Coppenraet, Andre Gaasbeek, Stefan P Berger, Luc B S Genlinck et al. An Outbreak of *pneumocystis jirovecii* Pneumonia with 1 predominant Genotype among Renal Transplant Recipients: Interhuman Transmission or a Common Environment Source. **CID** 2007;44:1143-9.
- [80] Sergio L Vargas, Carolina A Ponce, Francis Gigliotti, Ana V. Ulloa, Susana

- Prieto, Maria P Muñoz et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a Patient with *P. carinii* Pneumonia to Immunocompetent Contact Health Care Workers. *J Clin Microbiol* 2000 ;38: 1536-8
- [81] Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent health care workers. *J Clin Microbiol* 2000;38:1536-8
- [82] Helweg-Larsen J, A G Tsolaki, R F Miller, B Lundgren, A E Wakefield. Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. *Q J Med* 1998;91:813-20.
- [83] Dohn MN, White ML, Vigdorth EM, Buncher CR, Hertzbert , Baughman RP et al. Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1617-21.
- [84] Morris AM, Swanson M, Ha H, Huang L. Geographic distribution of HIV associated *Pneumocystis carinii* pneumonia in San Francisco. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1622-6.
- [85] Peters SG, Prakash L. *Pneumocystis carinii* pneumonia: review of 53 cases. *Am J Med* 1987; 82:73-8.
- [86] Allegra CJ, Chabner BA, Tuazon CV . Trimetrexate in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1987; 317:978-85.
- [87] Sattler FR, Cowan R, Nielsen DM, Ruskin J. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1988; 109:280-7.
- [88] McLeod DT, Neill P Robertson VJ. Pulmonary diseases in patients infected with the human immunodeficiency virus in Zimbabwe, Central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83:694-7.
- [89] Atzori C, Bruno A, Chichino G, Gatti S, Scaglia M. *Pneumocystis carinii* pneumonia and tuberculosis in Tanzanian patients infected with HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:55-6.
- [90] Baughman RP, Dohn MN, Frame PT. The continuing utility of bronchoalveolar

- lavage to diagnose opportunistic infection in AIDS patients. **Am J Med** 1994; 97:515–22.
- [91] Dragana Orlovic, Ranmini Kularatne, Vivian Ferraz, Raymond A Smego, Jr. Dual Pulmonary Infection with Mycobacterium tuberculosis and Pneumocystis carinii in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. **Clinical Infectious Diseases** 2001;32:289-94.
- [92] Klein RS, Motyl M. Frequency of pulmonary tuberculosis in patients undergoing sputum induction for diagnosis of suspected Pneumocystis carinii pneumonia. Department of Medicine (Division of Infectious Diseases), Montefiore Medical Center, Bronx, NY 10467. **AIDS** 1993;7(10):1351-5.
- [93] Chouaid C, Housset B, Poirot JL, Roux P, Lebeau B. Cost effectiveness of the induced sputum technique for the Gx of pneumocystis carinii pneumonia in HIV infected patient. **Eur Respir J** 1993;6::248-52.
- [94] Glenn RW, Pierson DJ. Cost reduction in diagnosing pneumocystis carinii pneumonia:sputum induction versus BAL as the initial diagnostic procedure. **Am Rev Respir Dis** 1992 ;145:1425-8.
- [95] Kales CP, Murren JR, Torres RA, Crocco JA. Early predictors of in-hospital mortality for Pneumocystis carinii pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome **Arch Intern Med** 1987;147(8):1413-7.
- [96] Takeshi F, Tetsuya N, Aikichi I. Pneumocystis pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features **J Infect Chemother**. 2007 ;13(1):1-7.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

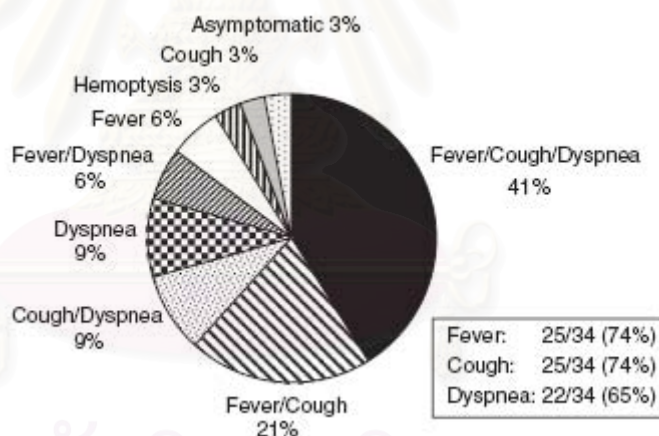
ที่มาของข้อตกลงเบื้องต้นของผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรเวคซี

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกของปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรเวคซี มี Triad [95] คือ

- ไข้
- ไอแห้งๆ (nonproductive cough)
- อาการเหนื่อยเป็นอย่างช้าๆ (progressive dyspnea)

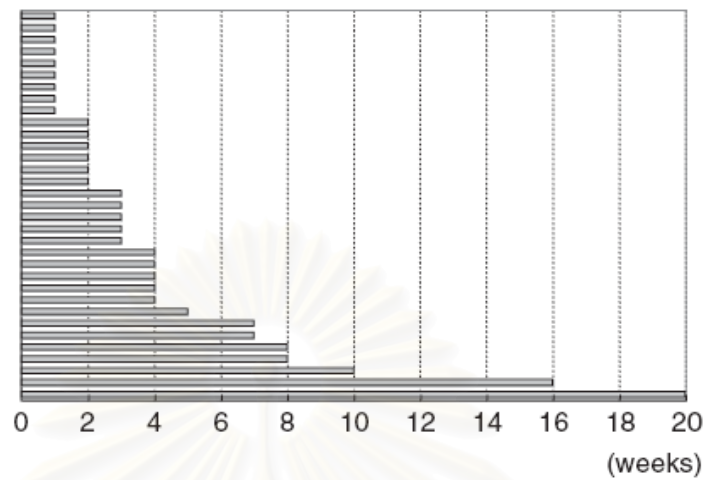
โดยการศึกษาของ Takeshi และคณะ [96] ได้รวบรวมอาการ Triad นี้ในผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการสงสัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติดิจิโรเวคซี เป็นดังนี้



รูปที่ 26 แผนภูมิรูปภาพแสดงจำนวนผู้ป่วย (%) ที่มีอาการต่างๆ ของปอดติดเชื้อนิวโมซิสติดิจิโรเวคซี [96]

โดยระยะเวลาตั้งแต่เริ่มมีอาการจนได้รับการวินิจฉัย Kovacs และคณะ [10] รายงาน median interval 28 วัน ส่วน Takeshi และคณะ [96] รายงาน median interval 3 สัปดาห์ ดังแผนภูมิที่ 4 ผู้ป่วยที่มีอาการนานกว่า 4 สัปดาห์ก่อนได้รับการวินิจฉัย มีเพียง 39 %

ผู้ป่วยรายที่



รูปที่ 27 แผนภูมิแท่งแสดงระยะเวลาตั้งแต่เริ่มมีอาการจนได้รับการวินิจฉัยของผู้ป่วยแต่ละราย[96]

ภาพรังสีปอด ของโรคปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิโรเวคซี ที่พบส่วนใหญ่ [28] คือ bilateral diffuse infiltration หรือ perihilar infiltration โดยพบภาพรังสีปอดปกติมีเพียง 10 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างความไวของการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง และความไวของการตรวจจากน้ำล้างปอด โดยการย้อมสี (ยิมซา โกโมไรมิเทนนามินซิลเวอร์ โทลูอิดีนบลูโอ) กับ วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนและ พีซีอาร์ เพื่อการวินิจฉัยปอดติดเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์

	Code
ชื่อ-นามสกุล _____ HN _____	1 HN
อายุ _____ ปี เพศ _____ Admission date _____	2 Age 3 Sex 4 Admisday
ระยะเวลาที่ทราบว่าเป็น HIV _____	5 Duration
ปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HIV <input type="checkbox"/> homosexual <input type="checkbox"/> IVDU <input type="checkbox"/> blood transfusion <input type="checkbox"/> multiple partner	6 Risk
ปริมาณCD4 _____	7 CD4
ประวัติยาป้องกันการติดเชื้อ PCP Yes No ยา _____	8 Pre drug
ประวัติการติดเชื้อฉวยโอกาสอื่นๆ <input type="checkbox"/> VZV <input type="checkbox"/> cryptococcosis <input type="checkbox"/> histoplasmosis <input type="checkbox"/> penicilliosis <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> OC <input type="checkbox"/> OHL <input type="checkbox"/> CMV	9 OI
อาการ และ ภาพรังสีปอด	
อาการทางคลินิก ของปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิสโรเวคซี อย่างน้อย 3/5 ข้อ 10 Symptom	
___ 1.ไข้ 3 วัน ถึง 3 สัปดาห์	
___ 2.อาการเหนื่อยเป็นอย่างช้าๆ	
___ 3.ไอ	
___ 4. ออกซิเจนในเลือด 11 PaO ₂ 12 PaCO ₂ 13 pH 14 O ₂ ratio 15 DO ₂ ABG PaO ₂ _____ PaCO ₂ _____ pH _____ PaO ₂ /FiO ₂ _____ D(A-a)O ₂ _____	
___ 5. ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยารักษา PCP ได้แก่ trimetroprim-sulfamethoxazole หรือ clindamycin กับ primaquine	
อาการเริ่มแรก DD/MM/YY _____	16 Onset
และ ภาพรังสีปอด ของโรคปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสซิสโรเวคซี	17 X-ray
___ ปกติ _____ diffuse infiltration _____ perihilar infiltration	

ยารักษา PCP ที่ได้รับ ___cotrimoxazole___ clindamycin+primaquine ___steroid 18 Treat

วันที่เริ่มให้การรักษา DD/MM/YY _____ 19 Date Rx

วันที่ได้ตรวจเสมหะ DD/MM/YY

D1_____ 20 D1sputum

D2_____ 21 D2sputum

D3_____ 22 D3sputum

bronchoscopy DD/MM/YY _____ 23 Day BAL

response to PCP treatment ___Yes ___No 24 Response

stain result positive negative

	IS 1	IS 2	IS 3	BAL
GMS				
Giemsa				
Tol.blue				
IFA				
PCR				

25 ISd1 26 ISd2 27 ISd3 28 BAL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

แบบฟอร์มคำอธิบายประกอบหนังสือยินยอม

ใบยินยอมรับการรักษาและเข้าร่วมโครงการวิจัย

หน่วยโรคปอด โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

วันที่ _____

ชื่อโครงการ การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจเสมหะโดยการข้อมสึ่ จิมซ่าและ ซิลเวอร์ กับ อิมมูโนฟลูออเรสเซน และบทบาทของจำนวนครั้งของเสมหะที่ส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติส จิโรเวคซี ในผู้ป่วยเอดส์

คำชี้แจงเกี่ยวกับโรคที่ศึกษาในการวิจัย

ปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสจิโรเวคซี เป็นสาเหตุของความเจ็บป่วยและการตายที่สำคัญในผู้ป่วยเอดส์ ซึ่งเป็นปัญหาการติดเชื้อที่สำคัญของผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย การวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน ส่วนใหญ่อาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิก ร่วมกับภาพรังสีในการวินิจฉัยเท่านั้น ซึ่งมีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้สูง

การตรวจเสมหะและการส่องกล้องในหลอดลมและปอดเพื่อตรวจเชื้อ จะช่วยให้สามารถยืนยันการวินิจฉัยได้แม่นยำมากขึ้น ทำให้การรักษาดำเนินไปอย่างถูกต้อง จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่า การตรวจเสมหะและสารคัดหลั่งจากปอดด้วยการข้อมสึ่ มีความไวในการวินิจฉัยโรคปอดติดเชื้อ นิวโมซิสติสจิโรเวคซี 50-90% แต่ยังไม่มียุทธวิธีดังกล่าวในประเทศไทย

คำชี้แจงเกี่ยวกับขั้นตอน วิธีการ และผลข้างเคียงของการศึกษา

- 1.ซักประวัติ ตรวจร่างกาย ตรวจสอบถามที่รับประทานอยู่ และบันทึกข้อมูล
- 2.ถ่ายภาพรังสีปอด และ เจาะเลือดตรวจหาระดับ CD4 ในรายที่ไม่เคยตรวจมาก่อน
- 3.ผู้ป่วยที่ศึกษาทุกราย จะได้รับการตรวจเสมหะ 3 ครั้ง โดยเก็บเสมหะด้วยการพ่นน้ำเกลือผ่านออกซิเจน 15-30 นาที และได้รับการส่องกล้องในหลอดลมและปอดเพื่อเก็บเสมหะ
- 4.นำเสมหะส่งตรวจข้อมสึ่เพิ่มเติม
- 5.รักษาตามอาการ และรักษาการติดเชื้อ นิวโมซิสติสจิโรเวคซี ด้วยยามาตรฐานโดยทันที โดยมีการติดตามการรักษาสม่ำเสมอโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคปอดโดยเฉพาะตลอดช่วงการศึกษา

อาการไม่พึงประสงค์ที่อาจเกิดขึ้น

การทำหัตถการดังกล่าวอาจมีผลข้างเคียงได้เล็กน้อย อาจมีการหดตัวของกล้ามเนื้อ หลอดลมหรือกล่องเสียงชั่วคราว ออกซิเจนในเลือดต่ำ คาร์บอนไดออกไซด์คั่ง ความดันโลหิตต่ำชั่วคราวได้ ซึ่งผู้ป่วยจะได้รับการรักษาผลข้างเคียงทันที

ประโยชน์ที่ผู้ป่วยจะได้รับ

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา จะได้รับการตรวจโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคปอดและไม่เสียค่าใช้จ่ายในการตรวจพิเศษบางอย่าง ซึ่งผู้ป่วยทุกรายที่เข้ารับการตรวจเสมหะ และ bronchoscopy จะเป็นผู้ป่วยที่จำเป็นต้องได้รับการตรวจเพื่อการวินิจฉัยโรคอยู่แล้ว และผู้ป่วยจะได้รับการรักษาปอดติดเชื้อตามมาตรฐาน โดยมีการติดตามการรักษาสม่ำเสมอ โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางโรคปอดโดยเฉพาะตลอดช่วงการศึกษา

คำชี้แจงเกี่ยวกับสิทธิของอาสาสมัคร

การเข้าร่วมการศึกษานี้เป็นไปโดยสมัครใจ โดยผู้ป่วยอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการศึกษาได้ทุกเมื่อ ข้อมูลทั้งหลายที่ได้รับจากการศึกษาจะถูกเก็บเป็นความลับ หากผู้ป่วยมีปัญหาหรือข้อสงสัยประการใด กรุณาติดต่อผู้วิจัยแพทย์หญิง ณัฏฐิภา กองพลพรหม หน่วยโรคปอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทรศัพท์ 02-2564252 ต่อ 3 หรือ 01-8057788 ได้ทุกเมื่อ

ขออนุญาตทำการตรวจเสมหะและ bronchoscopy โดยมีข้อบ่งชี้คือ เพื่อส่งตรวจหาเชื้อนิวโมซิสติสซิสโรเวคซี

ขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

ลงชื่อ _____ (อาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย)

(_____)

ชื่อผู้อนุญาต _____ เกี่ยวข้องเป็น _____

(_____)

_____ พยาน

(_____)

_____ (ผู้วิจัย)

(_____)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฏฐ์ผลิกา กองพลพรหม เกิดเมื่อวันที่ 14 มกราคม พ.ศ. 2519 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี แพทยศาสตรบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2541 จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อจากนั้นได้ปฏิบัติงานในฐานะแพทย์ใช้ทุน แผนกอายุรกรรม โรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลา 3 ปี ต่อมาได้เข้ารับการศึกษาคือ ต่อในตำแหน่งแพทย์ประจำบ้านอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2548 และสอบได้วุฒิบัตรผู้มีความรู้ความชำนาญทางวิชาชีพเวชกรรมสาขาอายุรศาสตร์ทั่วไป เมื่อปี พ.ศ. 2548 ปัจจุบันอยู่ระหว่างการฝึกอบรมแพทย์ประจำบ้านต่อยอด สาขาโรคระบบการหายใจและภาวะวิกฤติโรคระบบหายใจ ฝ่ายอายุรกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย