

การพัฒนาสไลด์สเมียร์เสมหะที่มีผลบวกต่อแบคทีเรียทนกรดโดยใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์

พีรดา พิชพิสุทธิ์¹ วิจิตร วงศ์ลำชา² ณภัทร มั่นกำเนิด¹ นพวรรณ ชนัญพานิช³ สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร⁴ และ กนกวรรณ กิตตินิยม^{1*}

¹ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิกและเทคโนโลยีประยุกต์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม 73170 ประเทศไทย

²คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต กรุงเทพมหานคร 10210 ประเทศไทย

³ศูนย์บูรณาการทางเคมีเพื่อเทคโนโลยีที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพมหานคร 10800 ประเทศไทย

⁴สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000 ประเทศไทย

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน อีเมล: kanokwan.kit@mahidol.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.005

รับเมื่อ 15 ตุลาคม 2567 แก้ไขเมื่อ 4 สิงหาคม 2568 ตอรับเมื่อ 7 สิงหาคม 2568

บทคัดย่อ

การย้อมเสมหะด้วยสีทนกรดเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคปอดที่ทำได้ง่ายและใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยวิธีนี้มีความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นการประกันคุณภาพของวิธีทดสอบนี้จึงมีความสำคัญ ซึ่งการใช้สไลด์สเมียร์เสมหะเป็นหนึ่งในวัสดุควบคุมคุณภาพ การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะโดยใช้แบคทีเรียทนกรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและทำให้เชื้อกระจายตัวด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองเส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ที่เคลือบด้วยพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ โดยทำการเปรียบเทียบแผ่นกรอง 4 ชนิดคือ 2Hz 8M, 2Hz 4M, 3Hz 8M และ 3Hz 4M ที่ผลิตขึ้นมา ซึ่งมีความพรุนสูงถึงร้อยละ 99.98 และมีความหนาของแผ่นกรอง 222, 158, 81 และ 48 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไปกรองเชื้อแบคทีเรียทนกรด พบว่าการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M ทำให้สไลด์สเมียร์เสมหะพบแบคทีเรียย้อมติดสีทนกรดแบบตัวเดียวจำนวนมาก (เฉลี่ย 4.0 ± 2.8 ตัวต่อวงกลอง) และแบบที่เกาะกลุ่มเพียงขนาดเล็ก 2-5 ตัวต่อกลุ่ม (เฉลี่ย 4.67 ± 0.2 กลุ่มต่อวงกลอง) ซึ่งมีสัดส่วนของเชื้อแบบเดี่ยวสูงกว่าจำนวนกลุ่มเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แผ่นกรองชนิดอื่น ในขั้นตอนการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะ สามารถปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้เพื่อเตรียมให้ได้ผลการรายงานเป็น AFB 3+, AFB 2+ และ AFB 1+ ตามเกณฑ์การรายงานผลขององค์การอนามัยโลกได้โดยการเจือจางเชื้อ 1:10 ในแต่ละระดับการรายงานผล สไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมได้นี้มีความคล้ายคลึงกับเสมหะจริงของผู้ป่วย โดยพบเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียย้อมติดสีทนกรดที่กระจายตัวดีเป็นแบบตัวเดียวเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ งานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ประยุกต์ใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโนในการกรองแบคทีเรียทนกรดสำหรับการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและสะดวก สามารถนำไปใช้ในงานประกันคุณภาพวิธีการย้อมสีทนกรดในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ และใช้ประโยชน์ในการฝึกอบรมบุคลากรทางการแพทย์ได้

คำสำคัญ: สไลด์สเมียร์เสมหะ, เส้นใยนาโนพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์, แบคทีเรียทนกรด

Development of Smear-Sputum Slides with Acid Fast Bacilli Positive Using Polyvinylidene Fluoride Nanofiber Filters

Peerada Phuechpisut¹, Wijit Wonglumsom², Napat Monkamnoed¹, Noppavan Chanunpanich³, Sudaluck Thunyaharn⁴ and Kanokwan Kittiniyom^{1*}

¹Department of Clinical Microbiology and Applied Technology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Nakhon Pathom, 73170 Thailand

²Faculty of Medical Technology, Dhurakij Pundit University, Bangkok, 10210 Thailand

³Integrated Chemistry Research Center for Sustainable Technology, King Mongkut's University of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800 Thailand

⁴Faculty of Allied Health Sciences, Medical Technology Nakhonratchasima College, Nakhonratchasima, 30000 Thailand

* Corresponding Author, E-mail: kanokwan.kit@mahidol.ac.th DOI: 10.14416/JASET.KMUTNB.2025.02.005

Received 15 October 2024; Revised 4 August 2025; Accepted 7 August 2025

ABSTRACT

Acid-fast staining of sputum is a simple and widely used method for diagnosis of pulmonary tuberculosis worldwide. This method is high specificity but requires the expertise of the operator in analysis. Therefore, quality assurance of the testing method is essential, with sputum smear slides used as one of the quality control materials. This study aimed to develop a method for the preparing sputum smear slides using cultured acid fast bacilli (AFB) which were dispersed by filtration through a polyvinylidene fluoride (PVDF) nanofiber membrane coated with polyvinyl alcohol (PVA). Four types of the homemade nanofiber filters as 2Hz 8M, 2Hz 4M, 3Hz 8M and 3Hz 4M with a porosity of up to 99.98 percent and filter thicknesses of 158, 222, 48 and 81 micrometers, respectively were compared for filtration efficiency. When used to filter AFB, the 2Hz 4M PVDF membrane produced sputum smear slides with a high number of single AFB (averaging 4.0 ± 2.8 cells per oil power field) and small clusters of 2-5 AFB per cluster (averaging 4.67 ± 0.2 clusters per oil power field). The proportion of single AFB by the 2Hz 4M was higher than the number of AFB clumping in clusters compared to the use of other types of filters. In the preparation process of sputum smear slides, the concentration of AFB could be adjusted to give the result of AFB 3+, AFB 2+, and AFB 1+ according to the World Health Organization's reporting criteria by diluting AFB at a 1:10 ratio for each reporting level. This prepared slides closely resembled the actual patient sputum, showing leukocytes and welled-dispersed single AFB under microscopic examination. This study is the first to apply nanofiber membrane filtration for dispersing AFB in sputum smear preparation. This method is simple, practical, and suitable for use in quality assurance of acid-fast staining in clinical laboratories as well as in training healthcare personnel.

KEYWORDS: Sputum smear slide, Polyvinylidene fluoride nanofiber, Acid fast bacilli

Please cite this article as: K. Kittiniyom, "Development of Smear-Sputum Slides with Acid Fast Bacilli Positive Using Polyvinylidene Fluoride Nanofiber Filters," *Journal of Applied Science and Emerging Technology*, vol 24, no 2, pp. 1-11, ID. 258823, August 2025 (in Thai).

1. บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคติดเชื้อเรื้อรังที่สำคัญ ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ โดยในปี พ.ศ. 2565 คาดว่าทั่วโลกมีรายงานผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคนี้ 1.3 ล้านคน และพบผู้ป่วยทั่วโลกประมาณ 10.6 ล้านคน (World Health Organization, 2023) ส่วนในประเทศไทยคาดการณ์อุบัติการณ์วัณโรค 155 คนต่อประชากรแสนคนต่อปี หรือจำนวน 111,000 คน และมีผู้ป่วยวัณโรคเสียชีวิต 14,000 คน (Department of Disease Control, 2024) วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติทนกรด (Acid-fast bacilli; AFB) มีขนาดของเซลล์กว้างประมาณ 0.2-0.6 ไมครอน และยาวประมาณ 1.0-10 ไมครอน (Gunasingam, 2022) การติดต่อของเชื้อนี้จากคนสู่คนโดยผ่านทางอากาศ เชื้อที่ผ่านเข้าปอดจะถูกจับโดยแมโครฟาจในถุงลม (Alveolar macrophage) เชื้อสามารถมีชีวิตเพิ่มจำนวนและดำรงอยู่ได้ภายในเซลล์เป็นระยะเวลานาน ภายหลังได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายอาจเกิดพยาธิสภาพทำให้ป่วยเป็นวัณโรคได้ หรือยังไม่มีอาการของโรคเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Vynnycky & Fine, 2000) ในประเทศไทยมีรายงานบุคลากรทางการแพทย์ในโรงพยาบาลเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงในอัตราความชุกร้อยละ 9.50 (Saengngoen, 2022) การวินิจฉัยวัณโรคใช้การตรวจคัดกรองทางคลินิก (Department of Disease Control, 2018) ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย (Department of Disease Control, 2019) การตรวจทางห้องปฏิบัติการควรเลือกใช้วิธีทดสอบที่มีความถูกต้องแม่นยำ เพื่อประโยชน์ในการรักษา ติดตาม และควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ ให้มีอัตราการเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตลดลง (Lewinsohn et al., 2017; Campelo et al., 2021)

วิธีตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์มีการใช้กันมานานกว่าหนึ่งร้อยปี โดยเฉพาะในประเทศที่มีรายได้ต่ำ และปานกลาง หรือมีข้อจำกัดด้านทรัพยากรต่าง ๆ (World Health Organization, 2021) เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายต่ำ ขั้นตอนการทำค่อนข้างง่าย ทำได้รวดเร็ว จึงนิยมใช้ในการคัดกรอง ค้นหาและวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรค (Department of Disease Control, 2023; Opota et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการติดตามการตอบสนองต่อการ

รักษา ซึ่งต่างจากวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น PCR ที่อาจให้ผลบวกคงอยู่ต่อไปได้นานในสิ่งส่งตรวจของระบบทางเดินหายใจ แม้ว่าผลการรักษาจะเป็นไปด้วยดี การย้อมสไลด์เสมียร์เสมหะผู้ป่วยด้วยสีทนกรดแล้วตรวจหา AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จัดเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Boldi et al., 2023) และควรมีปริมาณเชื้ออย่างน้อย 10^3 - 10^4 เซลล์ต่อมิลลิตรของเสมหะ (van Zyl-Smit et al., 2011) ทั้งนี้การตรวจหา AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ต้องอาศัยประสบการณ์ และความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานด้วย ในกรณีรายงานผลบวกปลอมจะส่งผลเสียต่อผู้ป่วย โดยอาจทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ไม่จำเป็น อาจเกิดผลข้างเคียงของยาต่อร่างกาย มีผลกระทบต่อจิตใจของผู้ป่วยและครอบครัวและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการรักษา (Ridderhof et al., 2002) ส่วนการรายงานผลลบปลอมจะส่งผลต่อการเจ็บป่วยเรื้อรัง เสี่ยงต่อการเสียชีวิต และแพร่กระจายเชื้อสู่ผู้อื่น

การประกันคุณภาพของวิธีทดสอบ นับว่ามีความสำคัญสำหรับห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ซึ่งมีทั้งการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal quality control; IQC) และการประเมินคุณภาพโดยองค์กรภายนอก (External quality assessment; EQA) วัสดุควบคุมคุณภาพที่ใช้ในการประกันคุณภาพวิธีย้อมสีทนกรดเพื่อตรวจหาเชื้อ AFB ด้วยกล้องจุลทรรศน์ มักนิยมใช้เป็นเสมียร์เสมหะของผู้ป่วยวัณโรคที่ตรึงบนสไลด์ หรือตัวอย่างเสมียร์เสมหะจำลองหรือแบบเสมือนจริง (Department of Medical Sciences, 2024; Faculty of Medical Technology, 2024; UK NEQAS, 2022; CMPT, 2023) วัสดุควบคุมคุณภาพตามข้อกำหนดมาตรฐานสากล ISO/IEC 17043 (ISO, 2023) ที่ระบุให้มีคุณสมบัติและลักษณะใกล้เคียงกับตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยให้มากที่สุดและต้องมีความเป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัว ดังนั้นตามแนวทางสากลจึงแนะนำให้ใช้เสมหะจากผู้ป่วยที่ AFB เป็นผลบวกและลบมาใช้เตรียมตัวอย่างเพื่อให้มีความเหมือนของจริง (Department of Public Health, 2015) หรือทำการเตรียมเสมหะแบบเข้มข้นโดยใช้ sodium hydroxide หรือ N-acetyl-L-cysteine ทำให้เสมหะผู้ป่วยมีความเหลวที่เหมาะสมในการใช้เตรียมตัวอย่างเสมหะที่ตรึงบนสไลด์ ในการเตรียมเสมียร์โดยใช้เสมหะของผู้ป่วยวัณโรคต้องคำนึงถึงความปลอดภัย และปริมาณเสมหะของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต้องมีมากพอสำหรับการเตรียม

ตัวอย่างสเมียร์สไลด์ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และมีเพียงพอับจำนวนสมาชิก จึงนิยมใช้วิธีการเตรียมเช่นนี้ในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคสูง อีกวิธีเป็นการเตรียมตัวอย่างสเมียร์สเมียร์สจำลองหรือแบบเสมือนจริง โดยการเพาะเชื้อ Mycobacteria แล้วนำเชื้อมาผสมกับเชื้อประจำถิ่นในเสมหะ ก่อนนำส่วนผสมมาสเมียร์บนสไลด์ (Farnia et al., 2003; Somoskövi et al., 2001) แต่การเตรียมเช่นนี้เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นไม่เหมือนการใช้เสมหะจริง และการเจริญของ Mycobacteria ในอาหารเหลวจะพบการเกาะกลุ่มกันของเชื้อ จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมที่ทำให้เชื้อที่เป็นกลุ่มเกิดการกระจายตัวจนได้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ก่อนนำมาใช้งาน วิธีหนึ่งที่ยอมรับใช้คือการกรอง

ปัจจุบันเส้นใยนาโนจัดเป็นวัสดุที่ได้รับความสนใจในการประยุกต์ใช้ในหลายเทคโนโลยี เส้นใยนาโนสามารถสร้างรูพรุนขนาดเล็กที่มีลักษณะต่อเนื่องได้ในปริมาณที่มาก และมีพื้นที่ผิวสูงเมื่อเทียบกับน้ำหนัก (Song et al., 2020) การผลิตเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต (Electrospinning) สามารถขึ้นรูปเส้นใยจากพอลิเมอร์ หลอมเหลวหรือสารละลายได้ ทำให้เส้นใยมีรูพรุนขนาดต่างๆ กันตามความต้องการในการใช้งาน ต่อมาได้มีการนำสารพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (Polyvinylidene fluoride; PVDF) มาใช้ผลิตแผ่นกรองเส้นใยนาโน ทำให้วัสดุที่ได้มีความทนทานต่อสารเคมีและอุณหภูมิสูง มีความยืดหยุ่นสูง ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ขั้นตอนการผลิตไม่ยุ่งยาก และสามารถผลิตผสมกับสารชนิดอื่นได้ดี (Aghayari, 2022) แผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตได้จะมีน้ำหนักเบา จึงสามารถนำมาซ้อนทับกันให้หนาขึ้นเพื่อใช้กรองอนุภาคที่มีขนาดเล็กกระดัดไมโครเมตรและนาโนเมตรได้ และยังเพิ่มคุณสมบัติการดูดซับน้ำของแผ่นกรอง PVDF โดยการผสมกับสารพอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl alcohol; PVA) ที่มีคุณสมบัติชอบน้ำและช่วยเพิ่มความแข็งแรงคงทนให้กับแผ่นกรอง ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้พัฒนาวิธีการเตรียมแผ่นเส้นใยนาโน โดยอาศัยหลัก การนี้ด้วยการฉีดขึ้นรูปแบบ batch ในสถานะที่เหมาะสม เพื่อเตรียมเป็นแผ่นกรอง สำหรับกรองแบคทีเรียในอากาศ และน้ำ (Kittiniyom et al., 2020; Suwanboon et al., 2018) ส่วนงานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยแรกที่ประยุกต์ใช้แผ่นกรองเส้นใยนาโน PVDF ที่ผลิตแบบ continuous ในการกรองแบคทีเรียทนกรดสำหรับการเตรียมสไลด์สเมียร์สเมหะ

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การพัฒนาการเตรียมสไลด์สเมียร์สเมหะที่ให้ผลบวกสำหรับการย้อมสีทนกรด โดยการสเมียร์สไลด์ด้วยส่วนผสมของเชื้อ AFB ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและผ่านการกรองด้วยแผ่นกรอง PVDF ให้เป็นเชื้อตัวเดียว ผสมกับเสมหะของผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นวัณโรคที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมให้มีเม็ดเลือดขาวเหมือนเสมหะจริง สไลด์ สเมียร์สเมหะที่เตรียมด้วยวิธีนี้ทำได้ง่าย และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายในงานทางด้านทางการแพทย์และสาธารณสุข

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 การขึ้นรูปเส้นใยนาโนและการผลิตแผ่นกรอง

เส้นใยนาโน PVDF ขึ้นรูปด้วยเครื่องปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตแบบต่อเนื่อง 45 เซม โดยฉีดสารละลาย PVDF ความเข้มข้นร้อยละ 18 โดยน้ำหนัก ให้เป็นเส้นใยบนผ้าสปันบอนด์ที่มีความกว้าง 30 เซนติเมตร เคลื่อนที่ด้วยความเร็ว 0.04 ± 5 เมตรต่อวินาที (2 Hertz; Hz) ความกว้างของเส้นใยปรับด้วยรางเลื่อนเคลื่อนที่ซ้ายขวาเป็นระยะทาง 18 เซนติเมตร และเคลื่อนด้วยอัตราเร็ว 170 รอบต่อวินาที โดยมีสภาวะการขึ้นรูปเส้นใยนาโนคือ ใช้ศักย์ไฟฟ้า 18 กิโลโวลต์ ระยะห่างจากปลายเข็มถึงฉากรับ 10 เซนติเมตร อัตราการไหลของสาร 45 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ต่อนำเส้นใยนาโน PVDF ที่เตรียมมาซ้อนทับกัน 4 ชั้น (แผ่นกรอง 2Hz 4M) หรือ 8 ชั้น (แผ่นกรอง 2Hz 8M) แล้วพันเคลือบด้วยสารละลาย PVA ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก นำไปรีดด้วยเครื่องเคลือบบัตรที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส โดยรองด้วยแผ่น Teflon ทั้งด้านบนและด้านล่างของเส้นใย จากนั้นนำเส้นใยนาโนที่ได้ มาตัดให้เป็นวงกลมขนาด 25 มิลลิเมตร สำหรับการเตรียมแผ่นกรอง 3Hz 4M และ 3Hz 8M อาศัยหลักการฉีดขึ้นรูปด้วยสภาวะเดียวกันกับสภาวะที่กล่าวข้างต้นแต่ใช้การฉีดสารละลาย PVDF เคลื่อนที่ด้วยความเร็วจาก 2 Hz เป็น 3 Hz และในการทดลองนี้ใช้กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ชนิดเซลลูโลสที่มีรูพรุนขนาด 8 ไมโครเมตรเป็นแผ่นกรองเปรียบเทียบกับแผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตขึ้นมา

2.2 การหาความพรุน (Porosity) ของแผ่นกรอง

นำแผ่นกรอง PVDF มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง และวัดความหนาของแผ่นกรองจำนวน 5 ตำแหน่ง ด้วยไมโครมิเตอร์ จากนั้นคำนวณหาความ

หนาแน่นปรากฏ (ρ_{mat}) ตามด้วยความพรุน (Porosity) ดังสมการที่ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\rho_{mat} (g/cm^3) = \frac{Mass}{Volume} = \frac{Mass}{Area \times Thickness} \quad (1)$$

$$Porosity (\%) = (1 - \frac{\rho_{mat}}{\rho_{PVDF}}) \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ $Mass$ คือ น้ำหนักของแผ่นกรอง PVDF (กรัม)

$Volume$ คือ ปริมาตรของแผ่นกรอง PVDF

(ลูกบาศก์เซนติเมตร)

$Area$ คือ พื้นที่ของแผ่นกรอง PVDF

(ตารางเซนติเมตร)

$Thickness$ คือ ความหนาของแผ่นกรอง PVDF

(เซนติเมตร)

ρ_{mat} คือ ความหนาแน่นปรากฏของแผ่นกรอง PVDF (กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

ρ_{PVDF} คือ ความหนาแน่นของ PVDF (1.76 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

2.3 การเตรียมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*

เชื้อแบคทีเรียททรด (Acid fast bacilli; AFB) ที่ใช้ คือ *Mycobacterium tuberculosis* สายพันธุ์ H37Ra ATCC 25177 นำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Dubos ปริมาตร 40 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการฆ่าเชื้อโดยเติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมาทำให้เชื้อ AFB ที่เกาะกลุ่มในขณะเจริญเติบโตให้กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โดยนำอาหารเหลวที่เพาะเชื้อไว้มาใส่ลงในหลอดแก้ว และใส่ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตรลงไป ทำให้เชื้อกระจายตัวด้วยเครื่อง Vortex mixer เขย่านาน 5 นาที ใช้กระบอกฉีดยาที่ใส่เข็มเบอร์ 21 ทำการดูดอาหารเหลวเข้าออกกระบอกฉีดยาผ่านรูเข็มจำนวน 20 ครั้ง ต่อมาใช้กระบอกฉีดยาที่ใส่เข็มเบอร์ 29 ทำการดูดอาหารเหลวเข้าออกกระบอกฉีดยาผ่านรูเข็มจำนวน 1 ครั้ง จากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มากรองโดยเปรียบเทียบการกรองผ่านหัวกรองที่มีแผ่นกรองชนิดต่างๆ ได้แก่ กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2), แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, ชนิด 2Hz 8M, ชนิด 3Hz 4M และ ชนิด 3Hz 8M เทียบกับเชื้อตั้งต้นก่อนกรอง นำเชื้อส่วนที่กรองผ่านกระดาษกรองแต่ละชนิดไปวัดความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard และนับจำนวนเชื้อโดยวิธี

Spread Plate บนจานเพาะเลี้ยง Dubose agar ในการทดลองนี้มีการเตรียม AFB ให้เข้มข้นขึ้นโดยนำเชื้อส่วนที่กรองผ่านแผ่นกรอง 2Hz 4M ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 10 นาที จากนั้นนำตะกอนมาเติมน้ำกลั่นในปริมาตรลดลง 10 เท่าจากของเหลวเริ่มต้น จึงทำให้เชื้อเข้มข้นขึ้น 10 เท่า และเจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่น 1:10 เพื่อใช้ในการเตรียมเชื้อแบบ Grading

2.4 การเตรียมตัวอย่างเสมหะ

ใช้ตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยที่ไม่ได้เป็นวัณโรคที่เหลือจากการใช้งานในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คัดเลือกเสมหะที่มีคุณภาพดีคือเมื่อนำมาย้อมสีแกรมแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบปริมาณเม็ดเลือดขาว > 50 เซลล์ต่อ Low power field (LPF), Epithelium cell < 20 เซลล์/LPF และแบคทีเรีย 1-5 เซลล์/Oil power field (OPF) และเมื่อนำเสมหะมาย้อมสีทกรดต้องไม่พบ AFB จากนั้นนำเสมหะที่คัดเลือกรวมให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ต่อมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 3 นาทีก่อนนำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะได้เสมหะที่พร้อมใช้งาน

2.5 การเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะที่ผสมเชื้อ AFB

นำเชื้อ AFB ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติมนลงในเสมหะปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.4 แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นดูดเสมหะที่ผสมเชื้อ AFB นี้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ที่สะอาด สเมียร์เสมหะเป็นรูปร่างรีขนาดกว้าง 2 เซนติเมตรและยาว 3 เซนติเมตร ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้ววางสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ที่ตั้งอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำสไลด์ไปย้อมสีทกรด

2.6 การย้อมสีทกรดและการรายงานเชื้อ AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำสไลด์สเมียร์เสมหะมาย้อมสีทกรด โดยหยดสี Carbol Fuchsin ให้ท่วมบริเวณที่สเมียร์ของสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำประปา ต่อมาใช้ 3 % Acid alcohol หยดทับให้ท่วมสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที หรือล้างจนไม่มีสีหลุดออกมา ล้างตามด้วยน้ำประปา และ

ย้อมทับด้วยสี Methylene blue โดยให้สีทึบสมเียรนานประมาณ 1 นาที จึงล้างสีออกด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้สไลด์แห้ง แล้วตรวจหาเชื้อ AFB ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ทำการรายงานผล 2 แบบ คือ 1) ตรวจนับปริมาณเชื้อ AFB ที่ติดสีแดง โดยนับจำนวน 100 วงกลอง (OPF) บันทึกจำนวนเชื้อตัวเดียวที่นับได้ต่อวงกลอง และจำนวนกลุ่มที่มีเชื้อ AFB เกาะรวมกันเป็นปริมาณตัวเชื้อต่างๆ ตามเกณฑ์ดังนี้ Group Code A: มีจำนวนเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code B: มีจำนวนเชื้อ AFB 6-10 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code C: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ 11-20 ตัวต่อกลุ่ม; และ Group Code D: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ >20 ตัวต่อกลุ่ม (รูปที่ 1) และ 2) รายงานผลบวกแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading) อ้างอิงตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, 1998)

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มีการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey-Kramer Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลลัพธ์และการอภิปราย

3.1 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของแผ่นกรองเส้นใยนาโน

คุณสมบัติของแผ่นกรอง PVDF ที่ผลิตขึ้นดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าแผ่นกรองทั้ง 4 ชนิดมีความหนาที่สม่ำเสมอ การใช้แรงอัดจากเครื่องรีดภายใต้ความร้อนสูงช่วยให้เส้นใยนาโนแต่ละเส้นติดกันได้เป็นแผ่นที่ดี ซึ่งผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Suwanboon et al., 2018) แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 3Hz 8M และ 3Hz 4M มีความบางกว่าเมื่อเปรียบเทียบความหนาของแผ่นกระดาษกรองเชิงพาณิชย์ ซึ่งมีค่าความหนาเท่ากับ 190 ไมโครเมตร สำหรับค่าความพรุนของแผ่นแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกันทั้งการซ้อนทับกัน 4 ชั้นและ 8 ชั้น เนื่องจากแผ่นเส้นใยนาโนสามารถสร้างรูพรุนที่เปิดต่อเนื่องถึงกันได้ดี (Interconnectivity pore)

3.2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นกรองในการเตรียมสไลด์สเมียร์เสมหะผสมเชื้อ AFB

ในการเตรียมเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* เมื่อนำเชื้อส่วนที่กรองผ่านแผ่นกรองไปวัดความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland Standard ได้ค่าดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าการวัดค่าความขุ่นสามารถประมาณการจำนวนเชื้อ AFB

เริ่มต้นก่อนการผสมเชื้อลงในเสมหะที่เตรียมขึ้นได้ โดยในกรณีเชื่อก่อนกรองจะมีค่าความขุ่นมากที่สุดคือค่าเฉลี่ยความขุ่นเท่ากับ 3.17 ซึ่งมีเชื้อปริมาณมากที่มีการเกาะกันเป็นกลุ่มขนาดใหญ่สังเกตได้จากการนำเชื้อมาย้อมสีทึบทรด ในขณะที่การกรองด้วยกระดาษกรองเชิงพาณิชย์มีค่าความขุ่นมากรองลงมาด้วยค่าเฉลี่ยความขุ่นเท่ากับ 0.64 โดยจากการย้อมสีทึบทรดพบว่าปริมาณเชื้อในระดับปานกลางมีการเกาะกันเป็นกลุ่มหลายขนาด ส่วนที่กรองด้วยแผ่นกรอง PVDF จะมีค่าความขุ่นน้อยที่สุดที่ค่าเฉลี่ยความขุ่นในช่วง 0.24 ถึง 0.37 โดยจากการย้อมสีทึบทรดพบว่าปริมาณเชื้อน้อย และส่วนใหญ่พบลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวในทุกชนิดของแผ่นกรอง PVDF

ผลการทดลองหาจำนวนเชื้อ AFB ที่มีชีวิตโดยวิธี Spread Plate บนจานเพาะเลี้ยง Dubose agar ซึ่งใช้เชื้อที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองชนิด 2Hz 4M ที่ให้ค่าความขุ่นเท่ากับ 0.36 พบว่ามีจำนวน AFB ประมาณ 10^5 colony forming unit (cfu) ต่อมิลลิลิตร ซึ่งตามมาตรฐานความขุ่น 0.5 McFarland Standard จะมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 1.5×10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร แต่จำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่แท้จริงตามความขุ่นนี้ยังขึ้นอยู่กับขนาดเชื้อ การมีชีวิตของเชื้อ (Viability) และการเกาะกลุ่ม (Clumping) ของเชื้อเช่นกัน (Isenberg, 1992) โดยเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งนานถึงสองสัปดาห์เป็นเชื้อรูปแท่งทรงแท่งยาวและการเจริญเติบโตมักมีการเกาะกลุ่ม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตค่อนข้างต่ำกว่าของมาตรฐานความขุ่น McFarland Standard

ผลการตรวจสอบสไลด์สเมียร์เสมหะผสมเชื้อ AFB ที่ได้กรองผ่านแผ่นกรอง หลังจากนำไปย้อมสีทึบทรดแล้วดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจนับเชื้อ AFB โดยนับทั้งเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มต่อวงกลองโดยผู้เชี่ยวชาญสามคน ค่าเฉลี่ยจากการนับเชื้อจากการใช้แผ่นกรองแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 2 พบว่าการใช้แผ่นกรองชนิด 2Hz 4M และ 2Hz 8M มีการกระจายตัวของเชื้อ AFB ที่มีเชื้อแบบตัวเดียวจำนวนมากและพบเพียงการเกาะกลุ่มแบบ Group code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม) ซึ่งการเกาะกลุ่มแบบนี้ยังพวามีน้อยกว่าที่พบจากแผ่นกรองชนิด 3Hz 4M, 3Hz 8M และกระดาษกรองเชิงพาณิชย์ ส่วนผลการกรองโดยใช้แผ่นกรองชนิด 3Hz 4M และ 3Hz 8M พบการ

ตารางที่ 1 ความหนาเฉลี่ย (Thickness) และความพรุน (Porosity) ของแผ่นกรอง PVDF

แผ่นกรอง PVDF	ความหนาเฉลี่ย±SD (ไมโครเมตร)	ความพรุนเฉลี่ย±SD (%)
2Hz 4M	158±0	99.9833±0
2Hz 8M	222±0	99.9832±0
3Hz 4M	48±0	99.9841±0
3Hz 8M	81±0	99.9805±0

ตารางที่ 2 แสดงค่าความขุ่นเทียบกับ McFarland Standard ของเชื้อที่กรองผ่านแผ่นกรองชนิดต่าง ๆ

แผ่นกรอง	ค่าเฉลี่ยความขุ่น McFarland Standard
2Hz 4M	0.37
2Hz 8M	0.37
3Hz 4M	0.31
3Hz 8M	0.24
กระดาษกรองเชิงพาณิชย์	0.64
เชือกกรอง	3.17

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวน AFB แบบเชื้อเดี่ยวและแบบเกาะกลุ่ม Code A ที่พบในเสมหะ และผล grading โดยกรองเชื้อด้วยแผ่นกรอง 2Hz 4M และใช้เชื้อที่ไม่เจือจางและเจือจางในอัตราส่วน 1:10 สำหรับการทดลองสองครั้ง

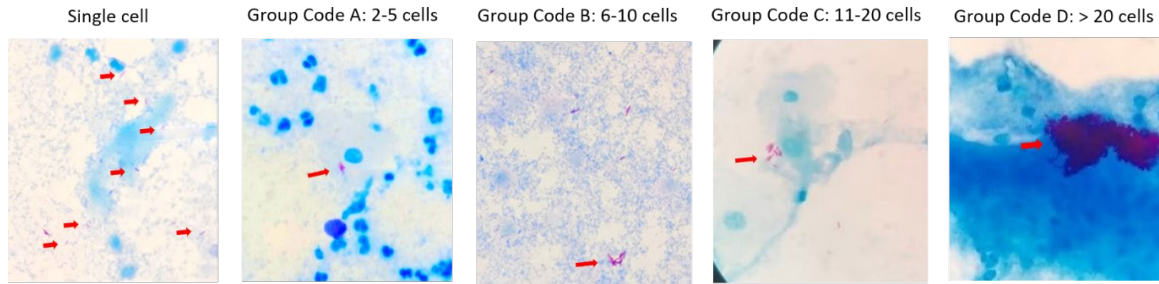
การทดลอง	จำนวนเฉลี่ย AFB แบบเดี่ยว ต่อ OPF ± SD	จำนวนเฉลี่ย AFB แบบกลุ่ม Code A ต่อ OPF ± SD	จำนวนเฉลี่ย AFB รวม ต่อ OPF (ช่วงค่า)	Grading
ครั้งที่ 1: เชื้อที่ไม่เจือจาง	13.22 ± 8.50	2.05 ± 0.44	15.27 (14.07-18.17)	AFB 3+ (>10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 1: เชื้อที่เจือจาง 1:10	1.69 ± 1.59	0.20 ± 0.08	1.89 (1.78-2.17)	AFB 2+ (1-10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 2: เชื้อที่ไม่เจือจาง	7.56 ± 4.23	1.26 ± 0.50	8.82 (8.10-10.62)	AFB 2+ (1-10 AFB ต่อ OPF)
ครั้งที่ 2: เชื้อที่เจือจาง 1:10	0.41 ± 0.93	0.18 ± 0.16	0.59 (0.49-0.84) (59 AFB ใน 100 OPF)	AFB 1+ (10-99 AFB ใน 100 OPF)

กระจายตัวของเชื้อเป็นแบบเดี่ยวและแบบกลุ่มที่หลากหลายทั้งแบบ Group code A, Group code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม) ซึ่งเป็นแบบเดียวกันกับการใช้กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ เมื่อเปรียบเทียบการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz และ 3Hz พบว่าแผ่นกรองชนิด 2Hz สามารถดักจับกลุ่มเชื้อขนาดใหญ่ตั้งแต่ 6-10 ตัวต่อกลุ่มขึ้นไปได้ดีกว่าชนิด 3Hz เนื่องจากการเตรียมแผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz ใช้การเคลื่อนที่ของตัวรับสปีบนอนต์ที่ช้ากว่าการเตรียมชนิด 3Hz ทำให้ได้แผ่นเส้นใยสะสมที่มีความหนากว่าประมาณสามเท่า (ตารางที่ 1) จึงมีโอกาสดักจับกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่ได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบแผ่นกรอง PVDF ที่มีจำนวนชั้นต่างกันคือชนิด 4 M และ 8 M พบว่าแผ่นกรองชนิด 8 M จะกรองเชื้อชนิดตัวเดี่ยวได้น้อยกว่าชนิด 4 M เนื่องจากแผ่นกรองชนิด 8 M มีความหนาแน่นกว่าชนิด 4 M ประมาณ 1.5 เท่า (ตารางที่ 1) ความหนาของแผ่นกรองอาจส่งผลต่อขนาดรูพรุน (pore size)

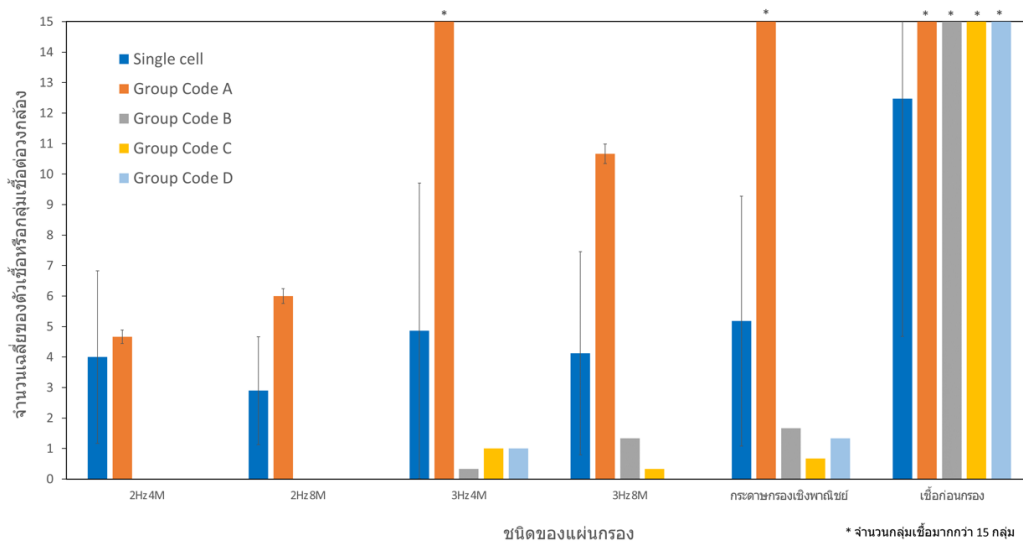
ความหนาที่มากขึ้นจะทำให้ขนาดรูพรุนของแผ่นกรองลดลง ดังผลการทดลองของ Suwanboon et al., 2018 ดังนั้นเมื่อกรองด้วยแผ่นกรองที่มีความหนาจึงมีผลให้เชื้อตัวเดี่ยวลอดผ่านรูได้น้อยลง

อย่างไรก็ตามจำนวนเฉลี่ยของเชื้อตัวเดี่ยวต่อวงกลองของการใช้แผ่นกรองแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชือกกรองและหลังกรองด้วยทุกชนิดแผ่นกรอง ($p < 0.00$)

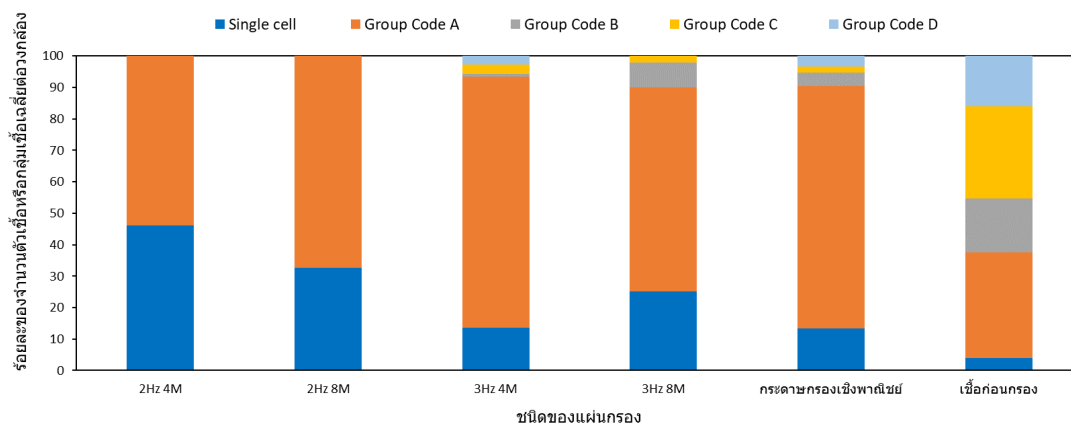
ผลการ grading ตามเกณฑ์การรายงานผลการย้อมสีทึบกรดขององค์การอนามัยโลก พบว่าสไลด์เสมหะที่เตรียมจากทุกชนิดของแผ่นกรองได้ค่า AFB 2+ ซึ่งหมายถึงพบเชื้อ AFB จำนวน 1-10 ตัวต่อ Oil power field ซึ่งมีการใช้จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 10^5 cfu ต่อมิลลิลิตร ในการเปรียบเทียบสัดส่วนเชิงร้อยละของจำนวนตัวเชื้อหรือกลุ่มเชื้อเฉลี่ยต่อวงกลอง ทั้งแบบเชื้อตัวเดี่ยวและกลุ่มเชื้อแบบ Group code A, B, C และ D สำหรับกระดาษกรอง



รูปที่ 1 แสดงการกระจายตัวของเชื้อ AFB ในสไลด์สเมียร์เสมหะ และเกณฑ์การนับปริมาณเชื้อ AFB ตาม Code ที่กำหนด: นับปริมาณเชื้อ AFB ที่เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแดง (ใช้ตัวลูกครีแดง) ทั้งแบบเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และแบบเกาะกลุ่มดังนี้ Group Code A: มีจำนวนเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code B: มีจำนวนเชื้อ AFB 6-10 ตัวต่อกลุ่ม; Group Code C: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ 11-20 ตัวต่อกลุ่ม; และ Group Code D: มีจำนวนเชื้อ AFB ประมาณ >20 ตัวต่อกลุ่ม



รูปที่ 2 แสดงจำนวนเฉลี่ยของตัวเชื้อ AFB รูปแบบต่างๆ บนสไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิด: ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ใช้เตรียมเชื้อ AFB ของแผ่นกรอง 5 ชนิด ได้แก่ แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, และ 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2) เทียบกับเชือกกรอง โดยตรวจนับเชื้อ AFB ในรูปแบบต่างๆ เฉลี่ยต่อวงกลอง โดยนับทั้งรูปแบบที่เป็นเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มเชื้อแบบ Group Code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group Code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม)



รูปที่ 3 แสดงสัดส่วนเป็นร้อยละของจำนวนตัวเชื้อเดี่ยวและกลุ่มเชื้อ AFB เฉลี่ยต่อวงกลอง บนสไลด์สเมียร์เสมหะที่เตรียมด้วยแผ่นกรองแต่ละชนิด: ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่ใช้เตรียมเชื้อ AFB ของแผ่นกรอง 5 ชนิด ได้แก่ แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, และ 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์ (Whatman No. 2) เทียบกับเชือกกรอง โดยตรวจนับเชื้อ AFB ในรูปแบบต่างๆ เฉลี่ยต่อวงกลอง โดยนับทั้งรูปแบบที่เป็นเชื้อตัวเดี่ยว (Single cell) และเป็นกลุ่มเชื้อแบบ Group Code A (จำนวน 2-5 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code B (จำนวน 6-10 ตัวต่อกลุ่ม), Group Code C (จำนวน 11-20 ตัวต่อกลุ่ม), และ Group Code D (จำนวน >20 ตัวต่อกลุ่ม)

เชื้อตัวเดียวเฉลี่ยต่อวงกลองเมื่อใช้แผ่นกรองชนิด 2Hz 4M, 2Hz 8M, 3Hz 4M, 3Hz 8M, กระดาษกรองเชิงพาณิชย์, และเชื้อก่อนกรอง มีค่าเท่ากับร้อยละ 46, 33, 14, 25, 13, และ 4 ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแผ่นกรอง PVDF ชนิด 2Hz 4M มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการใช้กรองเชื้อ AFB เพื่อให้ได้เชื้อส่วนใหญ่เป็นแบบตัวเดียว หรือมีการเกาะกลุ่มของเชื้อเพียงขนาดเล็ก 2-5 ตัวต่อกลุ่ม โดยไม่พบกลุ่มเชื้อขนาดใหญ่ซึ่งยากต่อการนับจำนวนเชื้อ และส่งผลให้จำนวนเชื้อ AFB ที่นับได้คลาดเคลื่อน ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ AFB ด้วยแผ่นกรองดังกล่าวผสมกับสมมติที่ผ่านกรรมวิธีของงานวิจัยนี้

3.3 การเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติสำหรับรายงานผลบวกการย้อมสีทนกรดแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading)

ในการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติสำหรับการย้อมสีทนกรด เพื่อให้รายงานผลบวกแบบระดับปริมาณเชื้อ (Grading) ตามเกณฑ์การรายงานผลขององค์การอนามัยโลก เป็น AFB 3+, AFB 2+ และ AFB 1+ นั้น ทำโดยนำเชื้อที่เตรียมได้จากการใช้แผ่นกรอง PVDF ชนิด 2 Hz 4M มาทำให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่าโดยการปั่น เพื่อให้มีจำนวนเชื้อ AFB มากเพียงพอในการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติให้มีการรายงานผลการ Grading เป็น AFB 3+ และเจือจางเชื้อลง 10 เท่าเพื่อให้รายงานผลได้เป็น AFB 2+ และ AFB 1+ ในการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการคำนวณปริมาณเชื้อรวม จากจำนวนเฉลี่ยของเชื้อแบบเดี่ยวและแบบกลุ่ม Code A ที่นับได้ต่อวงกลอง เช่น ในการทดลองครั้งที่ 1 เมื่อรวบรวมจำนวนเฉลี่ยเชื้อ AFB แบบเดี่ยว (13.22) กับจำนวนเชื้อเฉลี่ยในกลุ่ม Code A (2.05) จะได้เป็น 15.27 ตัวต่อ OPF ซึ่ง >10 AFB ต่อ OPF (Grading 3+) และเมื่อเจือจาง 10 เท่า พบจำนวนเชื้อเฉลี่ยรวมเป็น 1.89 ตัวต่อ OPF ซึ่งค่าอยู่ในช่วง 1-10 AFB ต่อ OPF (Grading 2+) เช่นเดียวกับจำนวนเชื้อเฉลี่ยรวมในการทดลองที่ 2 สำหรับการใส่เชื้อไม่เจือจาง 8.82 ตัวต่อ OPF และ 0.59 ตัวต่อ OPF (59 ตัว ใน 100 OPF) ซึ่งตรงกับผล Grading AFB 2+ และ AFB 1+ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นว่าในการเจือจางเชื้อลง 10 เท่ามีผลลดค่า Grading ลงหนึ่งระดับได้จาก Grading AFB 3+ เป็น AFB 2+ และจาก Grading AFB 2+ เป็น AFB 1+ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamada และคณะ

(Yamada et al., 2006; Yamada et al., 2011) ที่ใช้การเจือจางเชื้อ 10 เท่าเพื่อการลดผลการ Grading AFB ลงหนึ่งระดับ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการพบการเกาะกลุ่มของเชื้อ AFB 2-5 ตัวต่อกลุ่ม แบบ Code A อาจมีผลกระทบต่อการรายงานค่า Grading เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบขึ้นอยู่กับการเตรียมจำนวนเชื้อ AFB อยู่ในระดับมากน้อยเพียงใด

4. บทสรุป

การย้อมสไลด์สเมียร์สมมติด้วยสีทนกรด เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคปอดที่ยังใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน ดังนั้นความถูกต้อง แม่นยำและความน่าเชื่อถือของการทดสอบนับว่าเป็นสิ่งสำคัญ จึงควรมีการประกันคุณภาพของวิธีการทดสอบและประเมินทักษะผู้ตรวจวิเคราะห์อย่างสม่ำเสมอด้วยวัสดุควบคุมคุณภาพที่มีความเหมือนจริงและปลอดภัย โดยการเตรียมสไลด์สเมียร์สมมติให้ผลบวกของแบคทีเรียทนกรด ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้เป็นอีกทางเลือกในการผลิตวัสดุควบคุมคุณภาพ ที่ทำได้ค่อนข้างง่าย และสะดวกในทางปฏิบัติ ซึ่งใช้เชื้อ AFB สายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว และกรองด้วยนวัตกรรมแผ่นกรองเส้นใยพอลิไวนิลลิดีนฟลูออไรด์ (PVDF) ชนิด 2Hz 4M ที่ทำให้เชื้อกระจายเป็นตัวเดียวจำนวนมาก ผสมกับสมมติที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมให้มีลักษณะคล้ายกับสมมติจากผู้ป่วยจริง ที่มีทั้งเม็ดเลือดขาว เซลล์เยื่อ เชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในสมมติ และเชื้อ AFB ที่สามารถปรับปริมาณ grading นอกจากจะใช้สไลด์สเมียร์สมมติในการควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการแล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา การแพทย์ และสาธารณสุข เช่น งานผลิตสื่อการสอนแก่นักศึกษา และการฝึกอบรมบุคลากรทางการแพทย์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการแพทยมหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ สารเคมี สถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aghayari, S. (2022). PVDF composite nanofibers applications, *Heliyon*, 8(11), e11620. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11620>.
- Boldi, M. O., Denis-Lessard, J., & Neziri, R., et al. (2023). Performance of microbiological tests for tuberculosis diagnostic according to the type of respiratory specimen: A 10-year retrospective study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1131241. <http://doi: 10.3389/fcimb.2023.1131241>
- Campelo, T. A., Cardoso de Sousa, P. R., Nogueira, L. D. L., Frota, C. C., & Zuquim Antas, P. R. (2021). Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far?. *Access microbiology*, 3(8), 000245. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000245>.
- Canadian Microbiology Proficiency Testing (CMPT). (2023). EQA Program Catalog 2023. Retrieved October 3, 2024, from <https://cmpt.ca/wp-content/uploads/2023/07/CMPT-Catalogue-2023.pdf>
- Department of Disease Control. (2018). *Systematic screening for active TB and drug-resistant TB*. 2nd ed., Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2019). *Management and practice guideline for tuberculosis laboratory*. Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2023). *Guidelines for the investigation of tuberculosis*. Aksorn Grphic Design Publishing. (in Thai)
- Department of Disease Control. (2024). *Situation and operation of tuberculosis in Thailand Fiscal Year 2023*. Retrieved October 3, 2024, from <https://www.tbthailand.org/statustb.html>. (in Thai)
- Department of Medical Sciences. (2024). *Conditions and Requirements for Members of the Quality Assessment of Analysis for the Fiscal Year 2025*. Retrieved October 3, 2024, from <https://pt.dmsc.moph.go.th/proficiency>. (in Thai)
- Department of Public Health, Federal Republic of Nigeria. (2015). *National Guidelines on External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy, Xpert MTB/RIF Assay, Line Probe Assay, Culture and Drug Susceptibility Testing*. Retrieved October 3, 2024, from <https://www.health.gov.ng/doc/National-Guidelines-on-EQA-December-2015.pdf>
- Faculty of Medical Technology, Mahidol University. (2024) Member Handbook 2024. The External Quality Assessment Schemes in Clinical Laboratory). Retrieved October 3, 2024, from <https://eqamt.mahidol.ac.th/eqab/>. (in Thai)
- Farnia, P., Masjedi, M. R., & Mohammadi, F., et al. (2003). The results of three years surveillance on sputum smear microscopy in 285 district and regional tuberculosis laboratories of Iran. *Tanaffos*, 2(5), 29-36.
- Gunasingam, N. (2022). Morphology and pathological characteristics of mycobacteria. *Mycobact Dis*, 12(S4), No. 1000005.
- Internal Organization Standard (ISO). (2023). *ISO/IEC 17043:2023 Conformity assessment — General requirements for the competence of proficiency testing providers*. ISO/IEC.
- Isenberg, H.D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol I, Washington, DC: ASM.
- Kittinijom, K., Suwanboon, C., & Chanunpanich, N. (2020). Antimicrobial assay on PVDF nanofiber membrane. In *Key Engineering Materials*, 856 (pp. 339-346). Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.856.339>.
- Lewinsohn, D. M., Leonard, M. K., & LoBue, P. A., et al. (2017). Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention clinical practice guidelines: diagnosis of tuberculosis in adults and children. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2), e1-e33.
- Opota, O., Senn, L., Prod'homme, G., Mazza-Stalder, J., Tissot, F., Greub, G., & Jaton, K. (2016). Added value of molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country. *Clinical microbiology and infection*, 22(7), 613-619. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.04.010>
- Ridderhof, J., Humes, J., & Boulahbal, F. (2002). *External quality assessment for AFB smear microscopy*. Retrieved October 3, 2024, from https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/External_Quality_Assessment_for_AFB_Smear_Microscopy.pdf
- Somoskövi, A., Hotaling, J. E., & Fitzgerald, M., et al. (2001). Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest*, 120(1), 250-257.
- Saengngoen, T. (2022). Prevalence and risk factors of latent tuberculosis infection among medical personnel in Roi Et Hospital. *Srinagarind Medical Journal*, 37(4), 407-418. (in Thai)
- Song, J., Kim, M., & Lee, H. (2020). Recent Advances on Nanofiber Fabrications: Unconventional State-of-the-Art Spinning Techniques. *Polymers*, 12(6), 1386. <https://doi.org/10.3390/polym12061386>
- Suwanboon, C., Chanunpanich, N., & Kitinijom, K. (2018). Antibacterial membrane from mixed polyvinylidene fluoride nanofiber and polyvinyl alcohol nanofiber. *The Journal of KMUTNB*, 28(4), 881-891. (in Thai)
- UK NEQAS Microbiology. (2022). Bacteriology schemes. Retrieved October 3, 2024, from https://ukneqasmicro.org.uk/scheme_areas/bacteriology/
- van Zyl-Smit, R. N., Binder, A., & Meldau, R., et al. (2011). Comparison of quantitative techniques including Xpert MTB/RIF to evaluate mycobacterial burden. *PLoS ONE*, 6(12), e28815. <http://doi:10.1371/journal.pone.0028815>
- Vynnycky, E., & Fine, P. E. M. (2000). Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *American journal of epidemiology*, 152(3), 247-263.
- World Health Organization. (1998) *Laboratory Services in Tuberculosis Control. PART II: Microscopy*. WHO.
- World Health Organization. (2021). *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 2: screening— systematic screening for tuberculosis disease*. Retrieved October 1, 2024, from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022676>
- World Health Organization. (2023). *Global Tuberculosis Report 2023*. Retrieved October 1, 2024, from <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2023>
- Yamada, H., Mitarai, S., Aguiaman, L., Matsumoto, H., & Fujiki, A. (2006). Preparation of mycobacteria-containing artificial sputum for TB panel testing and microscopy of sputum smears. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(8), 899-905.
- Yamada, H., Mitarai, S., & Wahyunitisari, M. R., et al. (2011). Improved polyacrylamide-based artificial sputum with formalin-fixed tubercle

bacilli for training of tuberculosis microscopists. *J Clin Microbiol*, 49(10). <https://doi-org.ejournal.mahidol.ac.th/10.1128/JCM.00370-11>

Yamada, H., Mitarai, S., Wahyunitisari, M. R., Mertaniasih, N. M., Sugamoto, T., Chikamatsu, K., & Fujiki, A. et al. (2011). Improved polyacrylamide - based artificial sputum with formalin-fixed tubercle bacilli for training of tuberculosis microscopists. *Journal of clinical microbiology*, 49(10), 3604-3609.