



Advance in diagnostic techniques and clinical application

อังคณา ฉายประเสริฐ วท.ด. (ชีววิทยา)

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการ มีการพัฒนาจากการวิจัยค้นคว้าในด้านต่างๆ อย่างมาก โดยเฉพาะในระยะ 10-20 ปีที่ผ่านมา ทำให้มีวิธีที่ช่วยการตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการที่ตอบสนองได้ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วหลายวิธี ซึ่งสามารถแบ่งกล่าวได้ 2 ส่วน คือ ส่วนที่หนึ่ง เป็นวิธีตรวจการติดเชื้อวัณโรค และส่วนที่สอง เป็นวิธีตรวจการเป็นวัณโรค

วิธีที่ใช้ตรวจการติดเชื้อวัณโรค (latent tuberculosis) ในอดีต คือ วิธีทดสอบทางผิวหนังด้วยทูเบอร์คูลิน (Tuberculin skin test) ซึ่งเป็นวิธีเก่าที่ใช้มานานกว่า 100 ปี มีข้อจำกัดที่ให้ผลบวกข้ามปฏิกิริยากับวัคซินบีซีจี และเชื้อมัคโคแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงไม่นิยมใช้ในการตรวจการติดเชื้อวัณโรคในประเทศที่ให้ประชากรได้รับการฉีดวัคซินบีซีจี วิธีนี้อาจช่วยการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในเด็กและผู้ใหญ่ในบางประเทศ

ปัจจุบันมีบริษัทในประเทศอังกฤษและออสเตรเลีย ได้ผลิตชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค โดยการตรวจวัดระดับอินเทอร์เฟอรอนแกมมา ที่ถูกสร้างจาก T-cell จำเพาะที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อวัณโรคที่ไม่พบในสายพันธุ์วัคซินบีซีจี คือ early secreted antigenic target (ESAT-6) และ culture filtrate protein (CFP-10) การทดลองในหลายประเทศแสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบนี้มีความไวระหว่างร้อยละ 75-89 สำหรับ Quantiferon-TB

Gold และ 80-97 สำหรับ ELISPOT-TB ส่วนความจำเพาะของทั้งสองวิธีจะมีค่ามากกว่าร้อยละ 90¹⁻²

สำหรับวิธีตรวจวินิจฉัยวัณโรค (active tuberculosis) ในอดีตใช้วิธีตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และการเพาะแยกเชื้อบนอาหารไขสูตร Löwenstein Jensen หรือสูตร Ogawa ปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง เช่น TKMedium³ หรืออาหารเหลวสูตรดัดแปลงจาก Middlebrook 7H9 โดยเป็นระบบเพาะเชื้ออัตโนมัติ ได้แก่ BACTEC MGIT 960, BACTEC 9000 series, VersaTREK และ BacT/Alert 3D (เดิมคือ MB/BacT)⁴ การเพาะเชื้อด้วยอาหารเหลวในระบบต่างๆ ช่วยให้รายงานผลการเพาะเชื้อวัณโรคและมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ ได้รวดเร็วขึ้น แต่ระบบเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นกว่าวิธีเดิม

การตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยวิธีเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิก วิธีนี้ถูกนำมาใช้ตรวจหาเชื้อวัณโรค โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แบบ in-house โดยเพิ่มยีนส์ หรือส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายต่างๆ ของเชื้อวัณโรค เช่น 16S rRNA gene, hsp65, rpoB, 126kD fusion protein gene และ insertion sequence เช่น IS6110 ซึ่งสามารถใช้เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วย หรือใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของมัคโคแบคทีเรียที่เพาะแยกได้บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว^{4-5,8-11} ต่อมาเนื่องด้วย

กฎหมายคุ้มครองสิทธิบัตร ทำให้มีการพัฒนาวิธีเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกวิธีอื่นนอกเหนือจาก PCR ขึ้น เช่น วิธี reverse transcriptase PCR, ligase chain reaction (LCR) และ strand displacement amplification (SDA)³⁻⁴

วิธีต่างๆ ที่กล่าวข้างต้นได้ถูกพัฒนาและผลิตในเชิงการค้าในระยะ 3-5 ปีที่ผ่านมา ได้แก่ Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD) ใช้หลักการของ isothermal (42°C) transcriptase-mediated amplification, Amplicor MTB test ใช้หลักการของ PCR, BD Probe Tec ET ใช้หลักการของ SDA และ Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ใช้หลักการของ SDA วิธีการต่างๆ ที่กล่าวถึง มี 2 วิธีที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ได้แก่ AMTD และ Amplicor MTB ให้ใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรคในตัวอย่างตรวจที่ย้อมพบเชื้อ acid fast bacilli (AFB) โดยวิธี AMTD สามารถใช้กับตัวอย่างส่งตรวจที่ย้อมไม่พบเชื้อได้ด้วย วิธีที่ใช้เครื่องอัตโนมัติมีข้อดีคือ สะดวกและทำได้รวดเร็ว แต่ข้อเสียคือราคาแพงทั้งเครื่องมือและชุดน้ำยาตรวจสอบ วิธี LAMP เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ ทำได้ง่ายและตรวจหาดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอได้ผลรวดเร็วในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง³

วิธีทางซีโรโลยียังไม่มียี่ห้อที่ทดสอบแล้วให้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่ก็มีข้อเสนอแนะว่าการพัฒนาวิธีนี้ควรมุ่งเน้นเพื่อตรวจหาแอนติเจนหรืออิมมูโนคอมเพล็กซ์จะดีกว่าการตรวจหาแอนติบอดี และจะดียิ่งขึ้นถ้าสามารถพัฒนาเป็นการทดสอบที่ทำได้ข้างเตียงผู้ป่วยหรือ ณ จุดตรวจโดยตรง (point-of-care strip tests)

การพัฒนาวิธีการและชุดตรวจวินิจฉัยวัณโรคต่างๆ พยายามมุ่งเน้นการพัฒนาให้เป็นวิธีอัตโนมัติในช่วงกลางของพัฒนาการ แต่เนื่องจากทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงไม่สามารถใช้ได้ในประเทศที่รายได้น้อยแต่มีปัญหาวัณโรคมาก ปัจจุบันองค์กรต่างๆ จึงพยายามมุ่งพัฒนาวิธีที่ทำได้ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก อ่านผลได้ง่าย และรวดเร็ว เพื่อจะนำไปใช้ในประเทศต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ตัวอย่างของวิธีเหล่านี้ ได้แก่

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยวิธีดูการตอบสนองของปฏิกิริยาทางผิวหนัง ล่าสุดที่มีการพัฒนาคือ MPB64 skin patch test³ โดยใช้ MPB64 แอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อกลุ่มก่อวัณโรค (*M. tuberculosis* complex) ซึ่ง Nakamura และคณะ พบว่าแอนติเจนนี้กระตุ้นผู้ป่วยที่เป็นโรคแต่ไม่กระตุ้นผู้ติดเชื้อ และได้ผลิต MPB64 patch test และทำการทดสอบในญี่ปุ่นและฟิลิปปินส์ พบว่าสามารถใช้ช่วยการวินิจฉัยผู้ป่วยเป็นโรคออกจากผู้ติดเชื้อ โดยมีความไวร้อยละ 88-98 ความจำเพาะร้อยละ 100 ขณะนี้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูประสิทธิภาพในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอชไอวีรวม และในชาวผิวดำว่าจะมีปัญหาในการอ่านผลหรือไม่³

การตรวจเพาะเชื้อแบบรวดเร็วโดยใช้ TKMedium เป็นวิธีที่อาศัยหลักการ การเปลี่ยนสีของอาหารเพาะเชื้อที่เกิดจาก metabolism ของเชื้อวัณโรค การตรวจหาเชื้อวัณโรคคือยาไรแฟมบิซินโดยวิธี Line-probe assays Rif TB kit (Innogenetics) ตรวจ MDR-TB โดยชุด GenoType MTB DR (Hain Life-Science) ซึ่งชุดตรวจเหล่านี้ยังไม่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาจากสหรัฐอเมริกา แต่มีจำหน่ายแล้วในสหภาพยุโรป นอกจากชุดตรวจที่ใช้หลักการตรวจกรดนิวคลีอิกแล้ว ยังมีชุดตรวจโดยใช้หลักการ Bacteriophage assay เช่น FASTPlaque-TB-MDRi และ FASTPlaque-TB-Response ซึ่งมีการจำหน่ายในสหภาพยุโรปแล้วเช่นกัน^{3-4,6-7}

วิธีสุดท้ายที่จะกล่าวถึงเป็นวิธีตรวจผลการเพาะเชื้อ โดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ร่วม คือดูลักษณะ microcolony ของเชื้อบนอาหารวุ้น⁴ และดูลักษณะ strings and tangles ของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Microscopic observation drug-susceptibility assay (MODS) วิธีนี้ทำได้ง่าย ราคาถูก เพราะไม่ต้องการเครื่องมือที่เฉพาะและมีราคาแพง แต่ใช้แรงงานคนมาก จึงอาจเหมาะกับประเทศที่มีรายได้ประชาชาติน้อย

คาดว่าภายใน 5-8 ปีข้างหน้าจะมีวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคที่น่าจะเข้าถึงกลุ่มคนที่ต้องการใช้เทคนิคเหล่านั้นจริงๆ ในราคาที่สมารถรับได้ โดยการทำงานประสานกันขององค์กรต่างๆ ในระดับโลก เช่น Stop TB Part-

nership, Foundation for Innovative New Diagnostics, TB Diagnostic Initiative of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, WHO เป็นต้น³

เอกสารอ้างอิง

- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6:413-22.
- อังกูร เกิดพาณิชย์. วัณโรคในเด็ก 2549. วารสารวัณโรค โรคทรวงอกและเวชบำบัดวิกฤต 2549; 27:69-94.
- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6:423-31.
- Tortoli E, Palomino JC. New diagnostic methods in *Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care*. Edited by Palomino JC, Leão SC and Ritacco V. Sponsor by Bernd Sebastian Kamps and Patricia Bourcillier. www. Tuberculosis Textbook.com. 2007. p. 441-86.
- อังคณา ฉายประเสริฐ. ใช้การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการวัณโรค เพื่อประโยชน์ในการควบคุมวัณโรคที่ดี ในรายงานการประชุมวิชาการวัณโรคระดับชาติเพื่อเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระบรมราชินีนาถ ในวาระที่ทรงมีพระชนมายุครบ 6 รอบ จัดโดยสมาคมปราบวัณโรคแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร และสมาคมอูเรเวชแห่งประเทศไทย สนับสนุนโดยกองทุนต้านเอ็ดส์ วัณโรค และมาลาเรีย 5-6 สิงหาคม 2547 ณ ห้องแกรนด์บอลรูม โรงแรมณเทียริเวอร์ไซด์ กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2547 หน้า 33-48.
- Migliori GB, Loddenkemper R, Blasi F, Raviglione MC. 125 years after Robert Koch's discovery of the tubercle bacillus: the new XDR-TB threat. Is "science" enough to tackle the epidemic? *Eur Respir J* 2007; 29:423-7.
- Heifets L, Desmond E. Clinical Mycobacteriology (Tuberculosis) Laboratory : Services and Methods. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Edited by Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs WR Jr. ASM Press, Washington D.C. 2005. p.49-69.
- Gengvinij N, Pattanakitsakul S, Chierakul N, Chaiprasert A. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens using one-tube nested PCR. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2001; 32:114-25.
- Prammananan T, Arjatanakool W, Chaiprasert A, Leechawengwong M, Asawapokee N, Leelarasamee A, Dhiraputra C. Secondline drug susceptibilities of Thai multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:216-9.
- Prammananan T, Cheunoy W, Na-Ubol P, Tingtoy N, Srimuang S, Chaiprasert A. Evaluation of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis for routine identification of mycobacteria : accuracy, rapidity, and cost analysis. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2005; 36:1252-60.
- Chaiprasert A, Prammananan T, Tingtoy N, Na-Ubol P, Srimuang S, Samerpitak K, Rangspanuratr W. One-tube multiplex PCR provides an alternative, inexpensive method for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 2006; 37:1-9.