บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 วัณโรคเยื่อหุ้มปอด (tuberculous pleuritis)

วัณโรคเยื่อหุ้มปอด(tuberculous pleuritis) คือ การอักเสบของเยื่อหุ้มปอดทั้งชั้น visceral pleura และชั้น parietal pleura อันเนื่องมาจากการติดเชื้อวัณโรค (Mycobacterium tuberculosis) โดยนับเป็นวัณโรคชนิดนอกปอด (extrapulmonary tuberculosis)

อุบัติการณ์ของวัณโรคเยื่อ หุ้มปอดพบได้ประมาณร้อยละ 5 –30 ของผู้ป่วยวัณโรคทั้งหมด [5,6] ในขณะเดียวกัน จากหลายการศึกษาพบว่าร้อยละ 15 –40 ของผู้ป่วยที่มีน้ำในเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) มักมีสาเหตุมาจากวัณโรคเยื่อหุ้มปอด[5,7,8,9] โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV)และกลุ่มผู้ป่วยปกติ[6] วัณโรคเยื่อหุ้มปอดพบได้ในผู้ป่วยทุกอายุ แต่พบน้อยในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี และจะพบมากขึ้นเรื่อย ๆ ในวัยหนุ่มสาว

พยาธิกำเนิดของโรคเชื่อว่า เกิดจากการติดเชื้อครั้งแรก (primary infection) ซึ่งมักเกิดการอักเสบติดเชื้อ 6 -12 สัปดาห์ ก่อนมีน้ำในเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) หรือจากการกำเริบของเชื้อวัณโรค (reactivation) ในบริเวณอวัยวะใกล้เคียง ซึ่งมักจะเป็นจากภายในเนื้อปอด (lung parenchyma) แล้วมีการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคโดยตรงจากพยาธิสภาพของโรคที่ปอดส่วนที่ชิดกับ Visceral pleura (sub pleural focus) ซึ่งมีขนาดเล็กมาก หรือเชื้อวัณโรคอาจเดินทางมาถึงเยื่อหุ้มปอดทางกระแสเลือด หรือทางเดินน้ำเหลืองก็ได้ หลังจากที่ sub pleural caseous foci แตกออกเข้าสู่ช่องเยื่อหุ้มปอด (ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 6 –12 สัปดาห์) ส่วนที่เป็นโปรตีนจากเชื้อ bacilli ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาชนิดภูมิไวเกิน (delayed type hypersensitivity reaction) มีการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ให้หลั่ง lymphokines ออกมากระตุ้นแมคโครเฟจ (macrophages) เพื่อร่วมต่อต้านเชื้อวัณโรคโดยก่อตัวเป็น granuloma ในขณะเดียวกันปฏิกิริยานี้ก็ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการซึมผ่านของน้ำบริเวณหลอดเลือดฝอย (capillary permeability) ของเยื่อหุ้มปอด ซึ่งเมื่อรวมกับปริมาณโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มปอดที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้แรงดัน osmotic (oncotic pressure) ในช่องเยื่อหุ้มปอดเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดสารน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion) ในปริมาณที่สูงเกินกว่าอัตราการดูดซึมกลับของ visceral pleura จึงเกิดภาวะน้ำเยื่อหุ้มปอด (pleural effusion)[14] ซึ่งเป็นการอักเสบชนิด granulomatous และสามารถตรวจพบได้จากการตรวจทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหุ้มปอด

อาการและอาการแสดงทางคลินิกของวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ผู้ป่วยอาจไม่มีอาการเลยและพบ pleural effusion โดยบังเอิญจากภาพถ่ายรังสีทรวงอก (chest x-ray) หรืออาจเริ่มต้นด้วยอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด มีไข้ต่ำๆ เป็นเวลาหลายวัน (ซึ่งมักเกิน 7 วัน) หรือหลายสัปดาห์ โดยpleural effusion อาจเกิดในระยะ 1-2 สัปดาห์หลังมีอาการป่วยนำ หรือบางรายอาจมีไข้สูงทันทีร่วมกับอาการเจ็บหน้าอก (pleuritic pain) ไอแห้งๆ หอบเหนื่อย (กรณีที่มี effusion มาก) โดย effusion จะหายเองได้ในระยะเวลา 8-16 สัปดาห์ [19] แต่ประมาณ 1 ใน 3 ของผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษามักกลับเป็นซ้ำ และเป็นวัณโรคชนิดรุนแรง[14] หรือเป็นวัณโรคในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งในระยะเวลาประมาณ 1 ปีขึ้นไป[19] การตรวจร่างกายกรณีที่มีน้ำในเยื่อหุ้มปอดอาจเคาะทึบบริเวณชายโครงข้างนั้น ฟังเสียงลมหายใจได้เบาลง (decrease breath sound) และมี vocal resonance ลดลง

การวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดนั้นอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการร่วมกันหลายชนิด

2.1.1) ลักษณะภาพถ่ายรังสีทรวงอก ส่วนใหญ่จะพบ pleural effusion

2.1.2) การตรวจสารน้ำที่เจาะได้จากโพรงเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid) หรือในการวิจัยนี้เรียกว่าน้ำเยื่อหุ้มปอดจะมีลักษณะเป็น exudates ซึ่งมีลักษณะดังนี้ [19, 20]

- สีน้ำเยื่อหุ้มปอดมักมีสีเหลืองเข้ม (straw colors) อาจขุ่นเล็กน้อย และอาจพบเป็นสีปนเลือด(serosangenous) หรือเลือด (bloody) ก็ได้
- ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) มากกว่า 1.016
- สารโปรตีนมากกว่า 3.0 กรัมเปอร์เซ็นต์
- แลกเตต ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase)หรือ LDH มากกว่า 200 IU หรือมากกว่า 2 ใน 3 ของค่าปกติสูงสุดในซีรัม (serum)
- อัตราส่วนของโปรตีนในน้ำเยื่อหุ้มปอดต่อในซีรั่ม มากกว่า 0.5
- อัตราส่วนของ LDH ในน้ำเยื่อหุ้มปอดต่อในซีรัม มากกว่า 0.6
- ปริมาณเม็ดเลือดขาว (WBC) มากกว่า 500-1000 หรือมี lymphocyte มากกว่าร้อยละ 50 จากการนับแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว (differential cell count) ซึ่งการวินิจฉัยเป็น exudates นั้นเป็นไปตามเกณฑ์ของ Richard W. Right นั้นสามารถแยกจากชนิด Transudate โดยอาศัยข้อใดข้อหนึ่งต่อไปนี้[20]

2.1.2.1 อัตราส่วนของโปรตีนในน้ำเยื่อหุ้มปอดต่อในซีรั่มมากกว่า 0.5

2.1.2.2 อัตราส่วนของ LDH ในน้ำเยื่อหุ้มปอดต่อในซีรั่มมากกว่า 0.6 หรือ

2.1.2.3 ระดับ LDH ในน้ำเยื่อหุ้มปอดมากกว่า 2 ใน 3 ของระดับค่าปกติสูงสุดของในซีรั่ม

เมื่อนำน้ำเยื่อหุ้มปอดชนิด exudative มาตรวจปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวและนับแยกเมื่อพบสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte มักมากกว่าร้อยละ 50 ก็จะจัดเข้ากลุ่ม exudative lymphocytic pleural effusion โดยปริมาณ lymphocyte ที่สูงขึ้นนอกจากพบในวัณโรคเยื่อหุ้มปอดแล้ว อาจพบอันเนื่องจากสาเหตุอื่นอีกหลายโรค เช่น lymphoma , pyogenic infection ที่รักษาแล้วได้ผลดีขึ้น (สาเหตุของ exudates pleural effusion แสดงไว้ใน ภาคผนวก ก) โดยในคนสูงอายุอาจจำเป็นต้องแยกระหว่างวัณโรคกับมะเร็ง เป็นต้น ในผู้ป่วยที่มาด้วยปัญหาน้ำในเยื่อหุ้มปอดโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงหรือโรคที่ตรวจพบได้ ถ้ามี lymphocyte ปริมาณสูงมาก ส่วนใหญ่สาเหตุจะเป็นจากวัณโรคหรือมะเร็งชนิดแพร่กระจาย[19] ส่วนระดับน้ำตาลกลูโคสในน้ำเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคอาจสูงหรือต่ำก็ได้ ขึ้นกับระดับในเลือด ไม่มีความจำเพาะสำหรับวัณโรค

ส่วนการใช้ Adenosine deaminase (ADA) ในการวินิจฉัยนั้น จากหลายการศึกษารวมทั้ง meta-analysis โดย Bafiales และคณะ [21] และ Perez-Rodriques และคณะ [22] ว่ามีความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 99-100 และ 89-93.6 ตามลำดับ แต่เนื่องจาก exudative lymphocytic pleural effusion นั้นเกิดจาก hypersensitivity reaction ซึ่งพบได้ทั้งจากการติดเชื้อและโรคมะเร็งหลายชนิด ไม่ได้มีความจำเพาะสำหรับวัณโรคเท่านั้น ในขณะเดียวกัน ADA ก็เป็น เอนไซม์ที่เกิดจากกระบวนการ catabolism ของสาร purine ซึ่งพบได้ในในเซลหลายชนิดโดยเฉพาะ lymphocyte ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนของ lymphocyte ในน้ำเยื่อหุ้มปอด จึงทำให้ค่า ADA สูงขึ้นแต่บางภาวะก็ทำให้ตรวจพบค่า ADA สูงขึ้นเช่นเดียวกัน เช่น rheumatoid disease, chronic lymphocytic leukemia, undifferentiated lymphoma ส่งผลให้มีค่า false positive ได้ ดังนั้นจึงเชื่อว่าการ identified เชื้อ bacilli ไม่ว่าจะเป็นวิธีย้อม AFB การเพาะเชื้อ หรือแม้แต่การทำ PCR น่าจะยังเป็นวิธีที่ควรนำมาใช้ร่วมกับการตรวจ ADA เพื่อเพิ่มความสามารถและความแม่นยำในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด [14]

2.1.3) การตรวจน้ำเยื่อหุ้มปอดทางจุลชีววิทยา เพื่อวินิจฉัยวัณโรค

การย้อม acid fast bacilli (AFB) staining ของน้ำเยื่อหุ้มปอด เป็นวิธีการที่ได้ผลรวดเร็วแต่มีความไว (sensitivity) และมีความจำเพาะ (specificity) ต่ำ คือ ร้อยละ 6 – 23 และ 70 – 90 [5,9,10,12,13] ตามลำดับ

การเพาะเชื้อจากน้ำเยื่อหุ้มปอดและเนื้อเยื่อหุ้มปอด ต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 2 - 12 สัปดาห์ในการวินิจฉัย ขึ้นอยู่กับเทคนิควิธีการเพาะเชื้อ เช่น ถ้าเพาะเชื้อ Automated MGIT 960 System จะใช้เวลาน้อยกว่า อย่างไรก็ตามวิธีเพาะเชื้อ จากน้ำเยื่อหุ้มปอดให้ความไว และ

ความจำเพาะร้อยละ 13 – 70 และ100 ส่วนการเพาะเชื้อจากเนื้อเยื่อหุ้มปอด ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 29 – 67 และ 100 ตามลำดับ [5,9,10,12,13]

การตรวจเนื้อเยื่อหุ้มปอดทางพยาธิวิทยา นิยมใช้เข็มตัด Abrams Cope ในการตัดชิ้นเนื้อจากเยื้อหุ้มปอด และตรวจหาลักษณะการอักเสบแบบ granulomatous inflammation ซึ่งอาจพบลักษณะของ Caseous หรือ Non – Caseous gramuloma ก็ได้ โดยเฉพาะถ้าย้อมชิ้นเนื้อด้วย AFB ให้ผลบวกจะสนับสนุนการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด ความไวและความจำเพาะของการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา คือ ร้อยละ 26 – 90 และ70 – 95 ตามลำดับ [4,10,11]

2.1.4) การวินิจฉัยด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล (Molecular diagmosis)

เนื่องจากวิธีการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดที่กล่าวมาข้างต้น (ข้อ 2.1.1 – 2.1.3) (ยกเว้นวิธี AFB staining) นอกจากมีค่าความไวอยู่ในระดับที่ไม่น่าพอใจแล้ว ยังต้องใช้ระยะเวลานาน ทำให้การวินิจฉัยโรคล่าช้า จึงได้มีความพยายามในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จึงนำไปสู่การวินิจฉัยโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว

2.2 วิธีทางชีวโมเลกุลสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

วิธีทางชีวโมเลกุลสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในปัจจุบัน แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ[23]

2.2.1) Target Amplification ได้แก่

- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Strand Displacement Amplification (SDA)
- Ligase chain Reaction (LCR)
- Nucleic Acid Sequence – Based Amplification (NASBA)

โดยทุกวิธีดังกล่าวมีความไวและเข้าได้กับทุกวิธีของการตรวจจับ (detection techniques) เช่น fluorescence,chemiluminescence หรือ gel electrophoresis

2.2.2) Signal Amplification Technologies ได้แก่

- branched DNA (bDNA)
- hybrid Capture
- DNA Cleavage – based signal amplification
- Rolling circle amplification (RCA)

โดยจะกล่าวถึงวิธีการเพิ่มขยายกรดนิวคลีอิค (nucleic acid amplification) โดยจำแนกตามคุณสมบัติของแต่ละวิธีดังตารางที่ 2.1 [23]

ตารางที่ 2.1 เปรียบเทียบ nucleic acid amplification technologies วิธีต่าง ๆ [23]

Properties of various nucleic acid amplification technologies

Property	PCR	LCR	SDA	NASBA	bDNA	Invader RCA
DNA target amplification	✓	✓	✓	×	×	×	✓
RNA target amplification	✓	×	✓	✓	×	×	✓
DNA single amplification	×	×	×	×	✓	✓	✓
RNA single amplification	×	×	×	×	✓	✓	✓
Protein single amplification	×	×	×	×	×	×	✓
Muptiplexing	Little	×	Little	Little	×	×	✓
Mesothermal	×	×	✓	✓	✓	✓	✓
Amplification within cells	✓	×	×	×	×	×	✓
Amplification on microarrays	×	×	✓	×	×	×	✓
Sensitivity (copies)	< 10	100	500	100	500	600	1
Range (logs)	5	3	4	5	3	4	7
Specificity (allele discrimination factor)	50	5000	50	50	10	3,000	100,000

จะกล่าวถึง 3 วิธีการทางชีวโมเลกุลที่พบบ่อยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อทั่วไปในปัจจุบัน คือ PCR, LCR, และ SDA

<u>วิธี Polymerase chain reaction (PCR)</u> [23]

เป็นวิธีการขยายสาย DNA (DNA amplification) ที่นิยมใช้แพร่หลาย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (FDA) ของสหรัฐอเมริกาให้การรับรองชุดตรวจวินิจฉัย (diagnostic kits) ของบริษัทโรช (Roche) ซึ่งใช้ PCR ในการตรวจหา (detection) และนับปริมาณ (quantitation) ของเชื้อเอชไอวี ,วัณโรค , และคลามัยเดีย ทราโคมาทิส (C.trachomatis) โดยมีความเที่ยงตรงแม่นยำ (accuracy) เทียบเท่าหรือเหนือกว่าวิธีการขยายกรดนิวคลีอิค วิธีอื่นๆ เช่น bDNA และ NASBA

วิธี Ligase chain reaction (LCR)

โดยอาศัยเอนไซม์ ดี เอน เอ ลัยเก็ส (DNA ligase) เป็นตัวเชื่อมต่อสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotides) ทั้ง 2 สายเข้าด้วยกัน เป็นสะพานเชื่อมต่อ (Hybridization) เข้ากับDNA เป้าหมาย (Target DNA) จากนั้นจึงมีการขยายส่วนของ DNA ที่ถูกจับโดยตัวจับ (Probe) โดยกระบวนการ Thermo cycling ที่ผ่านมา FDA ของสหรัฐอเมริกาได้รับรองการตรวจวิธี LCR สำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อคลามัยเดีย ทราโคมาทิส

LCR มีความสามารถในการจับคู่กับสายนิวคลีโอไทด์ ที่จำเพาะกว่า PCR โดยเฉพาะกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของกรดอะมิโน ในสายของ DNA (Point Mutation และ Single Nucleotide Polymorphism หรือ SNP) เนื่องจากความสามารถในการเลือกจับคู่ (discriminatory power of ligation) ที่ดีกว่าการใช้ primer จากประโยชน์ดังกล่าว ปัจจุบันจึงมีการนำไปใช้ใน DNA microarrays ด้วย

วิธี Strand displacement amplification (SDA) [23]

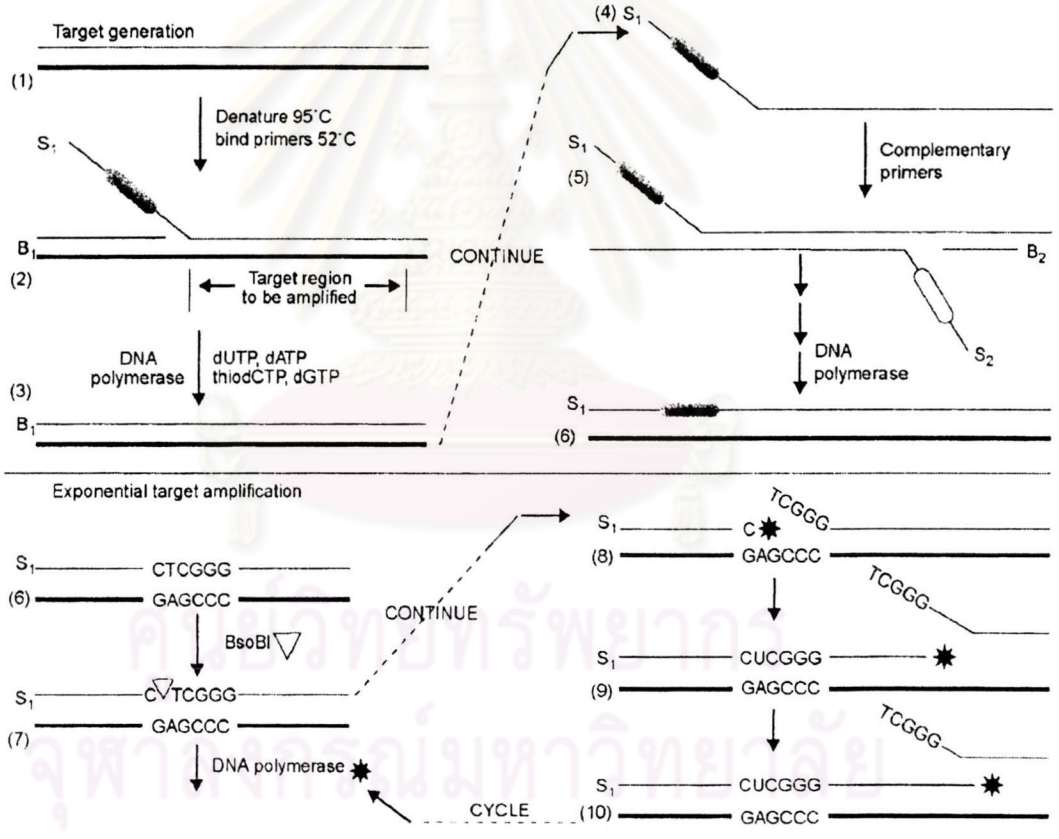
หลักการของ strand displacement amplification (SDA)(กลไกการทำงานดังแสดงในรูปที่ 2.1)

SDA คือกระบวนการขยายกรดนิวคลิอิก โดยอาศัยเอนไซม์(isothermal enzymatic process) เป็นกระบวนการซึ่งอาศัยการ nicking ของ modified recognition sequence โดยใช้เอนไซม์เอนโดนิวคลิเอส (endonuclease) ที่มีความจำเพาะ ชื่อ BsoBI และเกิดการต่อขยาย (extension) และซ่อมแซม (repair) ของตำแหน่งนั้นๆ โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ชนิด Bst ทำให้เกิดการสังเคราะห์สาย DNA ใหม่ทดแทนสายเดิม และ DNA สายใหม่นี้จะเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มขยาย (amplification) ต่อไป โดยกระบวนการทั้งหมดจะเกิดที่อุณหภูมิคงที่ ประมาณ 52.5 องศาเซลเซียสในกระบวนการ SDA นี้ จะมีตัวตรวจจับ (detector) ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลิโอไทด์สายเดี่ยว(single-strand oligonucleotide) ทำหน้าที่เป็นตัวจับ (probe) จะถูกสังเคราะห์ให้มีโครงสร้างรูป Stem-loop ซึ่งมีโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้ (donor) และมี quenching molecule ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (acceptor) ส่วนโครงสร้างรูป stem-loop จะมีส่วนของเบส(recognition sequence) ที่จำเพาะสำหรับเอนไซม์มาตัด(restriction endonuclease) ก่อนที่จะมีการขยายในส่วนที่จำเพาะ(specific target) ตัว donor และ acceptor จะอยู่ในตำแหน่งชิดกันมาก ดังนั้น พลังงานจากตัวให้(donor) จะสามารถส่งต่อไปที่ตัวรับ(acceptor) โดย quenching จึงไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมา

ในระหว่างการเกิด SDA จะมี amplicon เกิดขึ้นมากมาย ถ้ามีกรดนิวคลีอิคของจุลชีพที่ศึกษาทำให้ตัวจับ (probe) ในรูป stem-loop สามารถไปจับ amplicon ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนจาก

stem-loop ไปเป็น double-stranded oligonucleotide สายตรง และถูกตัดโดยเอนไซม์ชื่อ BsoBI ซึ่งจะตัดเฉพาะ double-stranded oligonucleotide ทำให้การแยกกันระหว่างตัวให้และตัวรับ ดังนั้น จึงมีการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ออกมาเนื่องจากไม่เกิด quenching บริษัท เบคตัน ดิคกินสัน (Becton – Dickinson) สหรัฐอเมริกาได้นำเทคนิคดังกล่าว (SDA) มาประยุกต์เข้ากับเครื่องตรวจจับฟลูออเรสเซนต์ (real-time fluorescence detection) เป็นระบบกึ่งอัตโนมัติ Semi-automated System (ProbeTecET , Becton – Dickinson) โดยใช้ตรวจหาเชื้อคลามัยเดีย (Chlamydia trachomatis) และเชื้อโกโนเรีย (Neisseria gonorrhoeae) มี ความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับวิธี LCR [23] และเริ่มมีการนำไปประยุกต์ใช้กับวิทยาการแบบ Microarrays ด้วย

รูปที่ 2.1 แสดงกลไกการทำงานของวิธีการ SDA [23]



จากรูป 2.1 ในระยะที่มีการสร้าง target DNA เป้าหมายซึ่งเป็นสายคู่ (1) ซึ่งถูกแยกออกและต่อเชื่อม (hybridized) ด้วย 2 primers (2) โดย primer แรก (S1) ถูกออกแบบมาเป็นกันชน (bumper primer) และอีก 1primer (S1) จะมีเอนไซม์ BsoBI ซึ่งมีความจำเพาะ จะเรียงตัวจากปลายด้าน 5' ไปยัง target blinding region โดย primer B1 (3) และ primer S1 (4) จะต่อขยายออกไปเรื่อยๆ โดยอาศัยเอนไซม์ Bst DNA polymerase ร่วมกับ thiolated dCTP (ที่อุณหภูมิคงที่)

การยืดยาวออกของ B1 primer จะดันสายที่สร้างจาก S1 primerซึ่งต่อมาจะถูกhybridize กับ primer สายตรงข้าม, B2 และS2 (5) จากนั้นสายที่เกิดจากprimer ทั้งสองจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการ exponential target amplification (6-10) ต่อไป

2.3 การใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการวินิจฉัยวัณโรค

การวินิจฉัยวัณโรคโดยอาศัยวิธีชีวโมเลกุล โดยอาศัยการขยายกรดนิวคลีอิค (Nucleic Acid amplification) เพื่อตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยตรง โดยเริ่มศึกษาในวัณโรคปอดก่อน (pulmonary Tuberculosis) พบว่าการใช้วิธีของ polymerase chain reaction (PCR) โดยวิธีของ amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct 2Test (AMTD2) ของบริษัท Genprobe, ซานดิเอโก้ แคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา และ Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test ของบริษัทRoche Diagnostic Systems, Inc, อินเดียนาโปลิส อินเดียนา สหรัฐอเมริกา ซึ่งใช้เป็น diagnostic test ในผู้ป่วยที่สงสัยว่าจะเป็นวัณโรคปอด โดยใช้ผลการเพาะเชื้อร่วมกับลักษณะทางคลินิกเป็น gold standard พบว่า ค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) อยู่ในช่วง 85.9-100%, 97.8-100%, 83.3-100%, 96.3-100% ในกลุ่มที่ย้อม AFB ให้ผลบวก[15-16, 24-25] และอยู่ในช่วง 83.3-85.3%, 99.1-99.4%, 71.4-96.7%, 97.3-99.6% [15-16, 24-25] ในกลุ่มที่ AFB ในเสมหะให้ผลลบ ส่วนการตรวจด้วยวิธี BD ProbeTecET System ของบริษัท BD Biosciences, sparks, md เป็นอีก direct diagnostic test ในการวินิจฉัยวัณโรคซึ่งได้รับการพัฒนาตั้งแต่ปีพ.ศ. 2537 โดยอาศัยเทคนิค strand displacement amplification (SDA) [26-29] และ IS 6110 ซึ่งมีความจำเพาะสูงมากต่อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB cpx) ของเชื้อวัณโรค [27-28]

BD Probe Tec ET System

เป็นระบบการตรวจหาเชื้อวัณโรคหรือมัยโคแบคทีเรีย (mycobacterium) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจหา Mycobacterium tuberculosis complex (MTB cpx) โดยตรงของสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจและจากการเพาะเชื้อวัณโรค (MTB cpx) เชื้อมัยโคแบคทีเรียม เอเวียม คอมเพล็กซ์ (M. avium complex) และ มัยโคแบคทีเรียม แคนซัสซิไอร์ (M.kansasii) ซึ่งเพาะได้จากจานเพาะเชื้อชนิดเหลว (liquid media) และ ชนิดแข็ง (solid media)

มีขั้นตอนการตรวจหลัก 3 ขั้นตอนคือ (ภาคผนวก ข)

1. Sample Processing

2. Priming and Warming

3. Simultaneous Amplification and detection

Sample Processing

- เป็นขั้นตอนที่มีการปั่นล้างและแยกส่วนของตัวยับยั้ง (inhibitor) ต่างๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งส่งตรวจออกไป

- จากนั้นนำไปผ่านเครื่องทำความร้อน เพื่ออบและทำลายเชื้อวัณโรคให้ตายเพื่อความปลอดภัยและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อในการนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ซึ่งทำนอกเครื่องอบ)

Priming and Warming

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจหลังผ่านขั้นตอนที่ 1 แล้ว จะถูกนำเข้าไปยัง Priming microwell ซึ่งมี standard displacement amplification (SDA)primer และ detector oligonucleotide dried เคลือบอยู่ด้านล่างของหลุม หลังจากrehydrateแล้ว จากนั้น incubate 20 นาที ถึง 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และเพื่อให้มีความจำเพาะของ primer จึง incubate ต่อ ที่อุณหภูมิ 72.5 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นจึงถูกส่งต่อไปยัง assay specific amplification well ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียสซึ่งหลุมเหล่านี้มี SDA enzyme แห้งบรรจุอยู่ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการนี้ wells จะถูกปิดอย่างถาวรด้วย amplification sealer

Simultaneous Amplification and detection

Sealed amplification well จะถูกบรรจุอยู่ใน BD Probe Tec ET instrument ที่ซึ่ง incubate wells ที่อุณหภูมิ 52.5 องศาเซลเซียส/ชั่วโมง ในระหว่างนี้จะมี SDA เกิดขึ้นและมีการติดตาม amplification โดยดูการเปลี่ยนแปลงของ Fluorescent ที่อยู่ใต้ microwell แล้วคำนวณและรายงานผล

จากนั้น 1 ชั่วโมงต่อมาเครื่องจะพิมพ์ผลการวิเคราะห์ออกมา

ในกระบวนการ BD Probe Tec ET System มีองค์ประกอบหลักต้องอาศัยอุปกรณ์สำเร็จรูป 3 อย่าง คือ

1. Sample processing test

2. Priming and Amplification microwell

3. Positive and Negative control

จากหลายการวิจัยในการตรวจหาเชื้อวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจจากทางเดินหายใจพบว่าการตรวจด้วยวิธี BDProbeTecETมี over all sensitivity, specificity, PPV และ NPV เท่ากับ 88.8-

92.3%, 96.2-98.6%, 70-93.8%, 99.7-100%, ส่วนในกลุ่ม smear negative เท่ากับ 68.8-78.6%, 97.6-98.6% ส่วนในกลุ่ม smear positive เท่ากับ 99.0-100%[18, 26-30] ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่2.2 [18] เปรียบเทียบการศึกษาวิจัยการใช้ BDProbeTec ET ในการวินิจฉัยวัณโรคจากสิ่งส่งตรวจของทางเดินหายใจ

Study (reference)	No. of specimens/ specimen type	No. of MTB cultures/ smear positive specimens	Gold standard used for assay s evaluation	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Sensitivity (%) for : Smear- positive specimens	Smear- negative specimens
Bergmann and Woods (7)	523/R	24/15	Culture, clinical correlation	100	99.2	85.7	100	100	100
Pfyffer et al. (47)	799/R	41/28	Culture, clinical correlation	97.9	96.5	63.9	99.9	100	92.3
Bergmann et al. (9)	600/R	16/12	Culture, clinical correlation	93.8	99.8	93.8	99.8	100	75
Johansen et al. (33)	351/R	150/85	Culture, clinical correlation	82.7	99	NA	NA	100	60
	372/E	192/67	Culture, clinical correlation	60.7	98.9	NA	NA	98.5	40.3
Barrett et al. (6)	200/R	104/101	Culture, clinical correlation	97.1	96	97	96	99	33.3
Maugein et al. (39)	547/R	69/43	Culture, clinical correlation	89.5	98.2	88.5	98.3	100	76.4
	74/E	8/4	Culture, clinical correlation					100	85.7
Mazzarelli et al. (40)	537/R	184/135	Culture, clinical correlation	91.3	98.1	49.2[b]	0.1[b]	99.2	70.6
	294/E	62/28	Culture, clinical correlation	77.8	97.7	33.3[b]	0.2[b]	90	69

สำหรับการเปรียบเทียบวิธีทางชีวโมเลกุล (molecular biology) ในการขยายกรดนิวคลีอิคด้วยวิธีต่างๆที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (commercial direction amplification test, CDAT) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบวิธีทางชีวโมเลกุลวิธีต่างๆที่มีจำหน่ายในท้องตลาด [18]

CDAT	Amplification method	Amplification target	Sample vol (μl)	Detection	Assay time (h)	Automation	IAC	Sensitivity[b]	Specificity[b]	FDA approval
AMTD2	TMA	16S RNA	450	Chemiluminescence	2.5	No	No	+ + + +	+ + +	Yes
AMPLICOR	PCR	16S DNA	100	Colorimetric	6	Yes	Yes	+ + +	+ + + +	Yes
LCx	LCR	PAB	500	Fluorimetric	6	Yes	No	+ + +	+ + + +	No
DTB	SDA	IS*6110*	500	Fluorimetric (ET)	3	Yes	Yes	+ + + +	+ + + +	No
LiPA	Nested PCR	RpoB gene	500	Colorimetric	12	Yes	No	+ + +	+ + + +	No

[a]**คำย่อ** : TMA, transcription - mediated amplification ; LCR , ligase chain reaction ; PAB , protein antigen b.

[b] +++ , good ; + + + + , very good.

การนำวิธีการทางชีวโมเลกุลมาใช้วินิจฉัยวัณโรคของเยื่อหุ้มปอดนั้น จากการศึกษาในต่างประเทศ โดย Mitarai และคณะ [31] ได้ทำการศึกษาน้ำเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วย 75 ราย ในโรงพยาบาลประจำกรุงโตเกียว เมื่อเดือนมกราคมถึงธันวาคม 2539 โดย ใช้อาการและอาการแสดงร่วมกับผลการเพาะเชื้อวัณโรค การตรวจเนื้อเยื่อหุ้มปอดทางพยาธิวิทยา เป็นเกณฑ์ในการวินิจฉัย ผลปรากฏว่าความไว และความจำเพาะของวิธี Amplicor PCR ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 27.3 และ 97.6 เมื่อเทียบกับวิธีวินิจฉัยแบบดั้งเดิม ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 30.6 และ 100 ตามลำดับ สรุปว่า การใช้ Amplicor PCR สามารถลดระยะเวลาในการวินิจฉัยโรคได้ แต่ยังมีความแม่นยำต่ำในการวินิจฉัยแยกโรคของน้ำเยื่อหุ้มปอดซึ่งเกิดได้จากหลายสาเหตุ

ส่วน Babu และคณะ[32] ได้ทำการศึกษา ความไวและความจำเพาะของ PCR ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเทียบกับการย้อม AFB และ adenosine deaminase (ADA) ในผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด จำนวน 20 ราย พบว่า PCR ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 70.0 และ 100.0 เมื่อเทียบกับการย้อม AFB ซึ่งให้ความไวร้อยละ 20 และ ADA ให้ความไวร้อยละ 55 (ที่ค่า cut-off 50 ไมโครกรัม/ลิตร)

Takogi และ คณะ [33] ทำการศึกษาใช้ PCR ต่อ IS6110 ของ DNA ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ในการวินิจฉัยวัณโรคจากชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด 20 ราย พบว่า ความไวของ PCR ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดเท่ากับร้อยละ100 (11/11)ในกลุ่มที่เพาะเชื้อขึ้นเชื้อวัณโรคและร้อยละ 89 (17/19) ในกลุ่มที่วินิจฉัยโดยพยาธิวิทยาร่วมกับอาการ และอาการแสดง โดยมีความจำเพาะร้อยละ 100

Riuz-Manzanoและคณะ[34] ทำการศึกษาความสามารถในการวินิจฉัยโรคของเยื่อหุ้มปอด โดยใช้ amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTD)ของบริษัท Gen-Probe ซานดิเอโก แคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา ในชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอด ที่อยู่ใน parafin-embedded 74 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บไว้นาน 12 ปี (2527 ถึง 2538) โดย 57 ตัวอย่าง ได้รับการวินิจฉัยเป็นวัณโรคเยื่อหุ้มปอด พบว่าวิธี AMTD (Gen-Probe) ให้ความไวในการวินิจฉัยวัณโรคร้อยละ 52.6 และความจำเพาะร้อยละ 100

Hasaneen และคณะ[35] ทำการศึกษาการใช้ PCR ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ IS986-base primer ของดีเอนเอ (DNA) ของเชื้อวัณโรค ในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 26 ราย ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์.ถึง เดือนธันวาคม 2543 พบว่า PCR ของเนื้อเยื่อหุ้มปอดให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 90 และร้อยละ 100 ตามลำดับเมื่อเทียบกับความไวของการย้อม AFB ของน้ำ และเนื้อเยื่อหุ้มปอด (ร้อยละ 0.0 และ ร้อยละ 3.8) การเพาะเชื้อของน้ำและเนื้อเยื่อหุ้มปอด (ร้อยละ 15.4 และ ร้อยละ 92.3) โดยมีค่า PPV, NPVของผลการเพาะเชื้อเนื้อเยื่อหุ้มปอดร้อยละ 100 และ 90.5 และของ PCR เนื้อเยื่อหุ้มปอด ร้อยละ100 และ 86.9 ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาในประเทศไทย โดย Promkiamon และคณะ[13] ทำการศึกษาเปรียบเทียบการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดด้วยวิธีการตรวจ ADA และ PCR เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานในผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด 45 ราย ของโรงพยาบาลศิริราช ตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม 2539 พบว่า ADA ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 91.4, 82.7 PCR ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 2.9, 100 ส่วนความไวของพยาธิวิทยาเนื้อเยื่อหุ้มปอด เพาะเชื้อน้ำเยื่อหุ้มปอด เพาะเชื้อจากเนื้อเยื่อหุ้มปอด และการย้อม AFB น้ำเยื่อหุ้มปอดร้อยละ 85.7, 48.6, 5.7, 0 โดยไม่ระบุความจำเพาะ

การศึกษาโดย Reechaipichitkul และคณะ[36] เพื่อประเมินความไวของ PCR และ nested PCR ในการวินิจฉัยโรคเยื่อหุ้มปอดของผู้ป่วยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ.ขอนแก่น 36 ราย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2541 ถึง เดือนกันยายน 2542 พบว่าความไวและความจำเพาะของ PCR ร้อยละ 50 และ 61, nested PCR ร้อยละ 72 และ 53, การย้อม AFB ร้อยละ 6 และ 79 การเพาะเชื้อวัณโรคร้อยละ 17 และ 100 การตรวจชิ้นเนื้อเยื่อหุ้มปอดทางพยาธิวิทยาร้อยละ 62 และ 100 ตามลำดับ สรุปว่าวิธี PCR ให้ความไวในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอดสูงกว่าวิธีดั้งเดิม แต่ความจำเพาะค่อนข้างต่ำ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากปริมาณเชื้อวัณโรคบริเวณที่มีการอักเสบของเยื่อหุ้มปอดมีปริมาณน้อย จึงทำให้การวินิจฉัยโดยวิธีปัจจุบัน เช่น การย้อม AFB การเพาะเชื้อและการตรวจทางเนื้อเยื่อ

วิทยา ยังไม่สามารถใช้เป็น gold standard ได้ ในขณะที่การใช้วิธี BDProbeTecET System ในการวินิจฉัยวัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis) นั้นมีความไวและความจำเพาะสูง และยังไม่เคยมีการนำมาศึกษาถึงความสามารถในการวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด (tuberculous pleuritis) มาก่อนทั้งในและต่างประเทศ จึงน่าจะมีการศึกษาวิจัยขึ้น เพื่อศึกษาถึงความไวและความจำเพาะของวิธีดังกล่าว เพราะเป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็ว (ภายใน 24 ชั่วโมง) ซึ่งจะทำให้สามารถตัดสินใจให้การรักษาได้รวดเร็วขึ้น อันจะส่งผลถึงการบรรลุวัตถุประสงค์หลักขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในอันที่จะวินิจฉัยวัณโรคให้รวดเร็วที่สุด เพื่อที่จะให้ยาต้านวัณโรค เป็นการป้องกันการแพร่กระจายทั้งในและนอกโรงพยาบาล โดยเฉพาะในประเทศไทยซึ่งมีอุบัติการณ์ของวัณโรคสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย