บทความทั่วไป: การตรวจวินิจฉัยวัณโรค จากความรู้ สู่นวัตกรรมเพื่อชุมชน

Review article: Tuberculosis diagnosis: From knowledge to innovation in public health

ชญาดา สิทธิเดช ธารินเจริญ*

*Chayada Sitthidet Tharinjaroen**

แขนงวิชาจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

Division of Clinical Microbiology, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, Thailand

** ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: chayada.si@cmu.ac.th)*

** Corresponding author (Email: chayada.si@cmu.ac.th)*

Received September 2016

Accepted as revised December 2016

Abstract

Tuberculosis (TB) is a serious global infectious disease caused by inhalation of droplets containing bacterial cells classified as *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC). Among MTBC, *M. tuberculosis* has been known as the main causal agent of TB. MTBC infection usually exhibits pulmonary tuberculosis, but extrapulmonary tuberculosis can also be detected among TB cases. Acid fast stain, culture method and biochemical tests are standard protocols. However, MTBC is a slow growing organism and sometime generates controversial results of the biochemical tests. These result in inaccurate and delayed diagnosis and treatment that lead to inefficient control of TB. Thus, rapid and accurate TB diagnosis method and drug susceptibility test are essential. Previously, alternative techniques were newly developed, for example, fluorescence stain with increased sensitivity for directly detection MTBC in sputum specimen. The automated liquid culture system with reduced culture time among TB-positive samples. In addition, in order to increase sensitivity and specificity while reducing time of diagnosis, several molecular techniques were developed such as GeneXpert MTB/RIF, Line probe and Urinary LAM. Recently, a novel diagnostic kit so called “IMS-PCR-CTPP” was developed based on the improvement of *Mycobacterium* binding in direct specimen using monoclonal antibody coated immunomagnatic beads prior to bacterial identification using PCR-CTPP targetting the novel target gene, *lepB*. Unlike previously reported techniques, it offers simultaneous determination of MTBC and *Mycobacterium bovis* infection. Obviously, there are various methods currently available for diagnosis of TB, however, they possess distinct advantages and limitations. Therefore, applying the combination of standard and new techniques will significantly improve accuracy and reduce time of TB diagnosis, which is crucial for effective treatment and control of TB.

Journal of Associated Medical Sciences 2017; 50(1): 1-21. Doi: 10.14456/jams.2017.1

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, tuberculosis, tuberculosis diagnostic

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) โดยมี *M. tuberculosis* เป็นเชื้อที่พบได้มากที่สุด ติดต่อผ่านการหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่เข้าไป สามารถเกิดพยาธิสภาพได้ทั้งที่ปอด และบริเวณอวัยวะอื่นๆ การย้อมสีทนกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบชีวเคมีนับเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยมาตรฐาน แต่เนื่องจาก MTBC เป็นเชื้อในกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า และบางครั้งการทดสอบทางชีวเคมีอาจให้ผลไม่แน่นอน ทำให้การวินิจฉัยและการรักษาผิดพลาดและล่าช้า นำไปสู่ปัญหาในการควบคุมการแพร่ระบาดของวัณโรคที่ไม่มีประสิทธิภาพ วิธีการตรวจวินิจฉัย และการตรวจหาความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค ที่รวดเร็ว และถูกต้อง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ที่ผ่านมามีรายงานเทคนิคใหม่ๆ ที่ใช้เป็นทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค เช่น การย้อมตัวเชื้อด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ช่วยเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจเสมหะ การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยอาศัยเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติที่ช่วยลดระยะเวลาในการเจริญของเชื้อจากตัวอย่างที่ให้ผลบวก นอกจากนี้ เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะ รวมถึงระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัย เทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ จึงได้รับการพัฒนาขึ้น เช่น การใช้ GeneXpert MTB/RIF assay การใช้ Line probe assay รวมถึงการตรวจหาโปรตีนของเชื้อจากปัสสาวะ เร็วๆ นี้มีรายงานการใช้ชุดตรวจที่อาศัยเทคนิค IMS-PCR-CTPP ซึ่งเป็นการใช้อนุภาคแม่เหล็กที่เคลือบด้วยแอนติบอดีจำเพาะกับเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* เพื่อเพิ่มโอกาสในการจับกับเชื้อในสิ่งส่งตรวจ ก่อนนำไปตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี PCR-CTPP ที่มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมาย *lepB* วิธีนี้แตกต่างจากเทคนิคที่มีรายงานมาก่อน เพราะสามารถระบุการติดเชื้อ MTBC และ *Mycobacterium bovis* ได้ในคราวเดียวกัน จะเห็นได้ว่าวิธีการที่ใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคในปัจจุบันนั้นมีความหลากหลาย มีข้อดี และข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการประยุกต์ใช้วิธีมาตรฐานร่วมกับเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแบบใหม่จะช่วยเพิ่มความถูกต้อง และลดระยะเวลาในการวินิจฉัยวัณโรคได้อย่างมาก ซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญในการรักษาผู้ป่วย และการควบคุมวัณโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

Journal of Associated Medical Sciences 2560; 50(1): 1-21. Doi: 10.14456/jams.2017.1

คำสำคัญ: เชื้อมัยโคแบคทีเรีย วัณโรค การวินิจฉัยวัณโรค

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขทั่วโลก ประมาณการณ์ว่ามีผู้ติดเชื้อวัณโรคถึงหนึ่งในสามของประชากรทั่วโลก วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) complex (MTBC) โดย *M. tuberculosis* นับเป็นเชื้อที่พบได้มากที่สุด ติดต่อผ่านทางการหายใจเอาละอองฝอยที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่เข้าไป เป็นโรคติดต่อรุนแรงและเรื้อรังที่ก่อโรคได้กับอวัยวะทุกส่วนของร่างกาย แต่ที่พบมากและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอยู่ในขณะนี้ก็คือ วัณโรคปอด (pulmonary tuberculosis) และยังสามารถพบได้บริเวณอื่นๆ (extrapulmonary tuberculosis) เช่น ต่อมน้ำเหลือง กระดูก เยื่อหุ้มสมอง ได้ วัณโรคสามารถก่อโรคได้ในคนทั่วไป แต่มักพบก่อโรคในผู้สูงอายุ ผู้ที่ร่างกายอ่อนแอจากการเป็นโรคอื่น ๆ มาก่อน เช่น หวัด หัด ไอกรน ผู้ติดยาเสพติด ผู้ป่วยโรคเอดส์ รวมถึงผู้ที่มีประวัติใกล้ชิดกับคนที่เป็นโรค เช่น นอนห้องเดียวกัน หรืออยู่บ้านเดียวกัน หนึ่งในสิบของผู้ที่ได้รับเชื้อเท่านั้นที่พัฒนาเป็นวัณโรค ส่วนมากมักอยู่ในระยะแฝง ปัจจุบันมีรายงานการเพิ่มขึ้นของวัณโรคที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม Non-tuberculosis mycobacteria (NTM) ซึ่งมีอาการคล้ายกัน แต่การรักษาแตกต่าง รวมทั้งการติดเชื้อวัณโรคชนิดดื้อยาหลายขนาน (multidrug-resistant *M. tuberculosis* หรือ MDR-TB) ที่พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง และต้องใช้เวลาในการรักษานานกว่าการติดเชื้อวัณโรคปกติ ในปี 2015 องค์อนามัยโลกรายงานว่าพบผู้ติดเชื้อวัณโรค 9.6 ล้านคนทั่วโลก โดยที่ 6 ล้านคนเป็นผู้ติดเชื้อรายใหม่ นอกจากนี้ ยังพบรายงานการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อวัณโรคถึง 1.5 ล้านคน (ในคนทั่วไป 1.1 ล้านคน และเป็นผู้ป่วยโรคเอดส์ 0.4 ล้านคน) สำหรับประเทศไทยพบรายงานผู้ติดเชื้อวัณโรครายใหม่และเป็นกลับซ้ำรวมกันประมาณ 67,722 ราย จากประชากรทั้งสิ้น 67 ล้านคน[1]

การวินิจฉัยวัณโรค

การวินิจฉัยวัณโรคระยะลุกลาม (active tuberculosis) เป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก กล่าวคือ หากมีการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคที่ถูกต้องและรวดเร็ว จะทำให้การรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถควบคุมการแพร่กระจายของโรคได้

ในการวินิจฉัยผู้ป่วยที่ติดเชื้อวัณโรคนั้น ต้องพิจารณาหลายปัจจัยร่วมกัน[2] เช่น

- ภาวะเสี่ยงในการติดเชื้อ เช่น ผู้สูงอายุ ผู้ที่ใกล้ชิดกับผู้ป่วยวัณโรค ผู้ติดเชื้อเอดส์ ผู้ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) เช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้าย ผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งเป็นกลุ่มบุคคลที่มีโอกาสติดเชื้อวัณโรคมากกว่าคนทั่วไปที่มีร่างกายแข็งแรง
- อาการแสดง เช่น อาการไอเรื้อรัง น้ำหนักลด อ่อนเพลีย
- ผลเอ็กซเรย์ปอด (chest X-ray) ในผู้ป่วยวัณโรคปอด สามารถพบรอยโรคเป็นฝ้าขาวบริเวณปอด
- ผลการตรวจทางจุลชีววิทยา (microbiologic examination) ประกอบด้วย ผลการย้อมเสมหะด้วยสีทนกรด (acid fast stain) เชื้อวัณโรคติดสีแดงเป็นรูปแท่ง ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture) และการทดสอบความไวของเชื้อวัณโรคต่อยารักษาวัณโรค (drug susceptibility testing)
- ผลการตรวจผิวหนัง (tubulin skin test) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่อการถูกกระตุ้นด้วยเชื้อวัณโรค กล่าวคือ หากบุคคลได้รับเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกาย ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจะมีการตอบสนองเพื่อทำลายเชื้อ รวมไปถึงมีการพัฒนาเซลล์ที่จดจำเชื้อวัณโรค (memory T cell) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน purified protein derivatives (PPD) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดจากเชื้อวัณโรค โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง จะมีการตอบสนองของร่างกายเกิดขึ้นเป็นลักษณะตุ่มนูนแดง (induration) ตรงบริเวณที่ถูกกระตุ้น โดยต้องอ่านผลการทดสอบภายในเวลา 48-72 ชั่วโมง ซึ่งมีเกณฑ์วิกฤตอยู่ที่ 10 มิลลิเมตร (มม.) (ไม่รวมบริเวณที่เป็นรอยแดง) หากผู้ทดสอบให้ผลเส้นผ่านศูนย์กลางผิวหนังที่นูนหนาขนาดมากกว่า หรือเท่ากับ 10 มม. ถือว่าให้ผลบวกกับการทดสอบ ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วย HIV หรือผู้ที่มีประวัติได้รับยากดภูมิคุ้มกันใช้เกณฑ์วิกฤตที่ 5 มม.[3] วิธีนี้อาจให้ผลบวกปลอมได้ หากมีการเกาบริเวณที่ฉีดทดสอบ หรือ มีการติดเชื้อในกลุ่ม NTM หรือ ผู้ที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน เป็นต้น วิธีนี้เป็นเพียงการทดสอบว่าผู้ป่วยเคยได้รับเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายหรือไม่ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าผู้ป่วยกำลังอยู่ในการติดเชื้อระยะลุกลามหรือไม่

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความถูกต้องในการวินิจฉัยทางจุลชีววิทยา คือ สิ่งส่งตรวจ โดยที่สิ่งส่งตรวจที่นิยมใช้สำหรับการวินิจฉัยวัณโรค คือ เสมหะ (องค์การอนามัยโลกแนะนำให้เก็บในตอนเช้าอย่างน้อย 2 วันติดต่อกัน[4]) เนื่องจากวัณโรคพบก่อโรคมากที่ปอด เสมหะที่เก็บได้ควรมีลักษณะเหนียวข้น ไม่มีน้ำลายปน แต่มักพบปัญหาการเก็บเสมหะในผู้ป่วยบางประเภท เช่น เด็ก หรือผู้ที่ไม่สามารถขับเสมหะออกมาได้ จึงอาจมีการใช้น้ำล้างปอด (bronchoalveolar lavage) หรือ น้ำในเยื่อหุ้มปอด (pleural effusions) แทนเสมหะในผู้ป่วยกลุ่มนี้ แต่หากผู้ป่วยเป็นวัณโรคชนิดนอกปอด อาจมีการเก็บสิ่งส่งตรวจจากอวัยวะที่มีการติดเชื้อ เช่น เนื้อเยื่อ เมื่อมีการติดเชื้อในอวัยวะต่างๆ ปัสสาวะ เมื่อมีการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง เมื่อมีการติดเชื้อในระบบประสาทหรือสมอง หรือ เลือด เมื่อมีการติดเชื้อในกระแสเลือด (haematogenous TB) เป็นต้น

วิธีมาตรฐาน (gold standard) ในปัจจุบันที่ใช้ในการวินิจฉัยเชื้อวัณโรค ประกอบด้วย วิธีการวินิจฉัยเบื้องต้น คือ การย้อมสีทนกรดจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจที่ได้จากผู้ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อวัณโรค โดยที่การวินิจฉัย อาศัยคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของเชื้อแต่ละตัว ด้วยวิธีการทางชีวเคมี เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค และในขั้นสุดท้ายเป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา

1. การเตรียมสไลด์และการย้อมสีทนกรด (microscopic examination and acid fast staining)

โดยทั่วไปนิยมทดสอบโดยตรงกับสิ่งส่งตรวจที่เป็นเสมหะก่อน เพื่อช่วยในการวินิจฉัยเชื้อวัณโรคเบื้องต้น ขั้นตอนแรก คือ การเตรียมสไลด์เพื่อใช้ในการเกลี่ยเชื้อ (smear) โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) หรือ ไม้ที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมาหักเพื่อให้เสมหะเกาะติดดี เขี่ยสิ่งส่งตรวจเสมหะ แล้วนำมาเกลี่ยบนสไลด์ที่สะอาด ปราศจากคราบไขมันหรือฝุ่นละอองต่างๆ จากนั้นทิ้งสไลด์ให้แห้ง ห่วงเขี่ยเชื้อที่นำมาเขี่ยเสมหะแล้ว ให้นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มลงในขวดที่บรรจุทรายและมีการเติม 70% แอลกอฮอล์ ก่อนนำไปเผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ หากใช้ไม้ที่ปราศจากเชื้อมาเขี่ยเสมหะสามารถทิ้งลงในถุงขยะติดเชื้อก่อนนำไปเผาเพื่อฆ่าเชื้อเช่นกัน เมื่อสไลด์แห้งแล้ว นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอย่างน้อย 2-3 ครั้งเพื่อตรึงเชื้อให้ติดกับแผ่นสไลด์ก่อนนำไปย้อมสีทนกรด ซึ่งแบ่งเป็น 2 วิธี วิธีที่หนึ่ง เรียกว่า

วิธี Ziehl-Neelsen stain (Z-N stain)[5] วิธีนี้ เชื้อ *M. tuberculosis* ในเสมหะถูกย้อมด้วยสาร Ziehl Carbolic Fuchsin โดยอาศัยความร้อนเพื่อพาสีเข้าไปในเซลล์ วิธีที่สอง เรียกว่า Kinyoun stain วิธีนี้ใช้สีชนิดเดียวกัน แต่เพิ่มความเข้มข้นของสีเป็น 3% และไม่ใช้ความร้อน จึงเพิ่มความปลอดภัย ทั้งสองวิธีเริ่มต้นจากการย้อมเชื้อด้วยสี Carbol fuchsin เชื้อที่อยู่บนสไลด์จะติดสีแดงในขั้นตอนนี้ จากนั้นล้างสีออกด้วย 3% acid alcohol (กรดไฮโดรคลอลิก 3 มิลลิลิตรใน absolute ethanol 97 มิลลิลิตร) เชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* มีผนังเซลล์ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป จึงมีคุณสมบัติทนกรดทำให้สีไม่ถูกชะออกไปหลังการเติมกรด แตกต่างจากแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ทนกรด สีแดงของ carbol fuchsin จะหลุดออกจากตัวเชื้อ หลังจากนั้นเติมสี methylene blue ที่มีสีน้ำเงินลงไป เชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* มีสีของ carbol fuchsin อยู่แล้วจึงไม่ติดสี methylene blue ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มที่ไม่ทนกรดจะรับเอาสี methylene blue เข้าไปในเซลล์ ทำให้ตัวเชื้อติดสีน้ำเงิน ล้างสีส่วนเกินออก ทิ้งสไลด์ให้แห้งแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า นับจำนวนเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นแท่งติดสีแดง และแปลผลตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกและ International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)[6] ดังนี้

AFB count	Report
No AFB in at least 100 fields	0 / negative
1-9 AFB in 100 fields	number count
10-99 AFB in 100 fields	+
1-10 AFB per field (at least 50 fields)	++
>10 AFB per field (at least 20 fields)	+++

Table 1 Summary of advantages and limitations of methods developed for tuberculosis detection.

Methods	Advantages	Limitations
AFB stain	Simple, rapid, cheap, aviable for all laboratory	Low sensitivity, unable to differentiate between MTBC, NTM, live and dead cell
Culture	Standard method, allowing phenotypic DST determination	Time consuming, BSL3 requirement
Biochemical test	Standard method, cheap	Time consuming, controvesy results, BSL3 requirement
Fluorochrome stain	Increased sensitivity compared to AFB stain	Fluorescence microscope and technician skill requirement, expensive
Automated liquid culture system	Decreased labor and time for positive culture report, increased specificity and sensitivity, allowing DST determination	Expensive, restricted culture media and instrument, problem with biological and radioactive waste management
GeneXpert MTB/RIF assay	High sensitivity and specificity, RIF susceptibility, safe, rapid, approved by WHO	Requirement of specifically imported instrument and reagents, expensive and unaffordable in some countries
Line probe assay	High specificity and sensitivity, allowing species identification and/ or genotypic DST determination	Complexicity, requirement of technician skill for interpretation, specifically imported instrument and reagents, expensive
LAMP test	Rapid, high specificity and sensitivity	Requirement of special designed specific primer and thermostabilizer
MODS	Decreased labor and time for positive culture report, high sensitivity and specificity, allowing DST determination	Requirement of medium supplements and technician skill

Table 1 Summary of advantages and limitations of methods developed for tuberculosis detection. (continued)

Methods	Advantages	Limitations
IGRA's	Potential identification of latent TB	Expensive, inefficient to diiferentiate between active and latent TB, unsuitable for treatment monitoring
Urinary LAM	Feasible sample collection in both children and adult, rapid, no need BSL3	Low sensitivity
Flow cytometry	Accuracy, rapid	Requirement of technician skill, BSL3 and specifically imported instrument and reagent, expensive
Mycobacteriophage Assay	Rapid, allowing DST determination	Requirement of technician skill, BSL3, and cell culture
IMS-CTPP	High sensititvity and specificity, allowing simultaneous detection and identification of MTBC and *M. bovis* infection	Requirement of Thermocycler and post PCR assay
MALDI-TOF	Rapid and high accuracy	Requirement of update database and specifically imported instrument and reagent, expensive

ข้อดีของการย้อมสีทนกรด คือ เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ง่าย ราคาประหยัด และไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์ชนิดพิเศษ มีความจำเพาะสูงถึง 98% แต่ข้อเสีย คือ มีความไวต่ำ ต้องมีปริมาณเชื้อ 5,000-10,000 ตัวในปริมาณเสมหะ 1 มิลลิลิตร จึงจะให้ผลบวก[7] วิธีนี้ไม่สามารถแยกเชื้อที่มีชีวิตออกจากเชื้อที่ไม่มีชีวิตได้ นอกจากนี้ ยังพบว่ามีเชื้ออื่นๆ ที่สามารถให้ผลบวกด้วยการย้อมสีทนกรด เช่น เชื้อในกลุ่ม NTM, *Nocardia* และ *Rhodococcus equi* เป็นต้น ในบางกรณี เช่น ผู้ป่วยเด็ก ผู้สูงอายุ หรือผู้ป่วยบางรายที่ไม่สามารถขับเสมหะออกมาได้ จะทำให้ไม่สามารถทำการวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยวิธีนี้ได้ จึงอาจใช้น้ำล้างปอดเป็นตัวอย่างส่งตรวจแทน โดย decontaminate และย้อมสีเช่นเดียวกับตัวอย่างที่เป็นเสมหะ

2. การเพาะเลี้ยงเชื้อและการระบุชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ (culture and identification)

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. tuberculosis* มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่ามีเชื้อวัณโรคอยู่ในสิ่งส่งตรวจจริง และเพื่อให้ได้เชื้อวัณโรคสำหรับทดสอบหาความไวต่อยาที่ใช้ในการรักษา เมื่อเก็บเสมหะจากผู้ป่วยได้แล้ว เตรียมสไลด์สำหรับย้อมสีทนกรดดังกล่าวข้างต้น เสมหะที่เหลือนำเข้าสู่ขั้นตอน decontamination เนื่องจากในตัวอย่างเสมหะมักพบการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินหายใจปนอยู่กับเชื้อที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรควัณโรคซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าเชื้อที่เป็นเชื้อประจำถิ่น การ decontamination จึงเป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่นที่ปนมากับตัวอย่างเสมหะ มีขั้นตอนดังนี้

1. ละลายเสมหะด้วยสาร N-acetyl-L-cysteine ซึ่งสามารถทำลายเยื่อเมือกต่างๆ ที่ปนมากับเสมหะ จึงช่วยลดความหนืดและเหนียวข้นของเสมหะ และ Decontamination ด้วย 4% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อประจำถิ่นที่ปนมากับเสมหะ
2. ทำให้เป็นกลาง (neutralization) ด้วยฟอตเฟสบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) หรือน้ำที่ปราศจากเชื้อ (sterile water) เพื่อเปลี่ยนสภาวะของเสมหะจากด่างให้เป็นกลาง
3. ปั่นที่ 3,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยต้องมีภาชนะใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิดสนิท เพื่อปั่นให้เชื้อตกลงมาอยู่บริเวณก้นหลอด แยกส่วนที่เป็นตะกอน (sediment) ออกจากส่วนที่เป็นน้ำ (supernatant) และเก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้
4. ทดสอบตะกอนที่เก็บได้ ด้วยการย้อมสีทนกรด การเพาะเลี้ยงเชื้อ และการทดสอบความไวต่อยาต่อไป

เชื้อ *M. tuberculosis* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งแบบที่ผสมไข่ เช่น อาหาร Lowenstein-Jensen (LJ medium), Ogawa หรือ ผสมสารอาหารพิเศษ เช่น Middlebrook เพื่อช่วยการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญช้า อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคมีทั้งแบบอาหารแข็ง และอาหารเหลว แม้เชื้อวัณโรคสามารถเจริญในอาหารเหลวได้ดีกว่าแต่มีอัตราการปนเปื้อนสูงกว่าการเพาะเชื้อในอาหารแข็ง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เชื้อ *M. tuberculosis* จะสามารถสังเกตเห็นโคโลนีได้ภายในประมาณ 4-8 สัปดาห์ ลักษณะโคโลนีของเชื้อในกลุ่ม MTBC แตกต่างจากแบคทีเรียทั่วไป คือ ลักษณะโคโลนีมีผิวขรุขระ คล้ายดอกกะหล่ำ สีขาวครีม หากเป็นเชื้อในกลุ่ม NTM จะมีบางสายพันธุ์ที่ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตในช่วง 25-37 องศาเซลเซียส ซึ่งจะพบโคโลนีผิวเรียบ เป็นมันวาว มีสีเหลือง สีส้ม (Figure 1) ข้อดีของวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ มีความจำเพาะสูงถึง 99% และมีความไวมากกว่าการย้อมสีทนกรด สามารถให้ผลบวก คือ พบการเจริญเติบโตของเชื้อได้หากในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณเชื้อที่ 10-100 ตัวในปริมาตรเสมหะ 1 มิลลิลิตร[7] วิธีนี้สามารถใช้ในการหาความไวต่อยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อวัณโรค แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเป็นวิธีที่ต้องใช้แรงงาน ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน เนื่องจากเชื้อมีการเจริญเติบโตช้า และใช้ห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัย

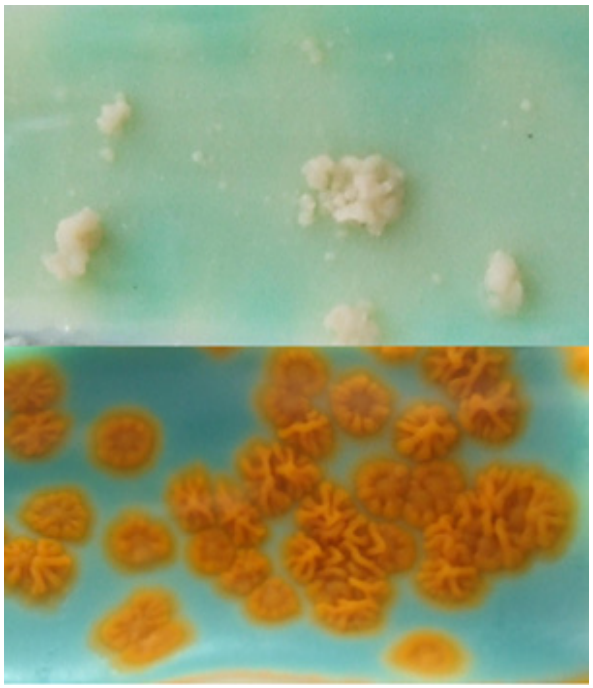

Figure 1. *Colony morphology of Mycobacterium spp. cultured on Lowenstein-Jensen medium. M. tuberculosis colonies are white, rough and cauliflower-like colonies (upper), which is different from the rough orange colonies of Mycobacterium phlei (lower).*

3. การระบุชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ (identification)

หลังจากที่เพาะเลี้ยงเชื้อจนสามารถสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อขึ้นด้วยตาเปล่าแล้ว เบื้องต้นสามารถระบุชนิดของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้จากการสังเกตระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต การสร้างเม็ดสี และลักษณะโคโลนีทางกายภาพ กล่าวคือ เชื้อ *M. tuberculosis* เจริญช้ากว่า 7 วัน อยู่ในช่วง 4-8 สัปดาห์ ลักษณะโคโลนีมีผิวขรุขระ คล้ายดอกกะหล่ำ สีขาวครีมคล้ายฟางข้าว เมื่อขูดโคโลนีมาย้อมสีทนกรดมักหลุดง่าย เป็นก้อน แตกตัวยาก ติดสีแดงรูปร่างแท่งโค้งเล็กน้อย ในขณะที่เชื้อในกลุ่ม NTM บางสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตภายใน 7 วัน บางสายพันธุ์ใช้เวลาในการเจริญมากกว่า 7 วัน นอกจากนั้น เชื้อในกลุ่ม NTM มักมีผิวโคโลนีเรียบ เป็นมันวาว มีสีเหลืองเข้ม หรือสีส้ม แต่วิธีนี้ต้องอาศัยความสามารถ ความชำนาญ และประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงาน ดังนั้น จึงต้องมีการแยกเชื้อชนิดหรือสายพันธุ์ของเชื้อจากลักษณะทางชีวเคมี ชีวเคมีที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria ได้แก่

1. Niacin (Nicotinic acid)[8]

Niacin เป็นสารประกอบที่เกิดจากการเกิดเมแทบอลิซึมในเซลล์ของเชื้อทุกตัวในกลุ่ม Mycobacteria มีเพียงบางชนิดของเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria เท่านั้นที่มีความสามารถในการใช้เอนไซม์เพื่อเปลี่ยน niacin ให้เป็น nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) เชื้อ *M. tuberculosis* ขาดคุณสมบัตินี้จึงเกิดการสะสมของ niacin อยู่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เมื่อทดสอบกับสาร aniline และ cyanogen bromide จะเกิดสีเหลือง (ผลบวก) ขึ้นกับน้ำยาที่ใช้ทดสอบ พบว่า 98% ของเชื้อ *M. tuberculosis* ให้ผลบวก และเมื่อทดสอบกับเชื้อในกลุ่ม NTM ทุกตัวจะ ให้ผลลบ ยกเว้น *Mycobacterium simiae*

2. Nitrate reduction[9]

เชื้อในกลุ่ม Mycobacteria มีเอนไซม์ที่ชื่อว่า nitroreductase ที่เปลี่ยน nitrate เป็น nitrite จึงสามารถพบสาร nitrite อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทดสอบโดยเติมสาร sulfanilamide และ n-naphthylethylendiamine จะเกิดสารประกอบ diazonium สีชมพูแดง โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณ nitrite ที่พบอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อ *M. tuberculosis* มีความสามารถในการเปลี่ยน nitrate ไปเป็น nitrite ได้มากกว่าเชื้ออื่นๆ ในกลุ่ม Mycobacteria จึงนิยมใช้

หลักการนี้แยกวินิจฉัยเชื้อ *M. tuberculosis* ส่วน *M. bovis* มักให้ผลบวกอ่อนๆ ในขณะที่ *M. africanum* ให้ผลลบ นอกจากนั้น ยังมีการประยุกต์ใช้หลักการนี้เพื่อตรวจหาความไวของเชื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา วิธีนี้มีค่าความไวและความจำเพาะในการตรวจการดื้อต่อยา Rifampicin (RIF) เท่ากับ 97% และ 100% และมีค่าเท่ากับ 97% และ 99% ในการตรวจหาการดื้อต่อยา Isoniazid (INH)[10] จึงได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในห้องปฏิบัติการมาตรฐานขนาดใหญ่[11]

3. การทดสอบ Catalase[12]

เชื้อในกลุ่ม Mycobacteria มีเอนไซม์ catalase ซึ่งสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็น น้ำ (H_2O) และก๊าซออกซิเจน (O_2) ได้ แบ่งเป็น 2 วิธี คือ

3.1 Semiquantitative catalase test เป็นการตรวจหาเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยหลักการคือ เชื้อในกลุ่ม Mycobacteria มีเอนไซม์ catalase ที่มีความสามารถทำให้เกิดปริมาณก๊าซออกซิเจนได้แตกต่างกัน โดยเฉพาะเชื้อพวก *M. tuberculosis, M. marinum, M. avium, M. xenopi* และ *M. gastri* ทำให้เกิดก๊าซออกซิเจนได้น้อยกว่า 45 มม. แตกต่างจาก *M. kansansii, M. simiae* และกลุ่ม Scotochromogens ทั้งหมด กลุ่ม nonphotochromogenic ที่ไม่ก่อโรค รวมถึงกลุ่ม rapid growers mycobacteria ที่ให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนมากกว่า 45 มม. การทดสอบนี้ใช้ 30% H_2O_2 และวัดความสูงของก๊าซออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในหน่วยมิลลิเมตร

3.2 Heat labile catalase test หลักการคือ Mycobacteria บางตัว เช่น *M. tuberculosis*, *M. bovis, M. gastri* และ *M. haemophilum* จะสูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ catalase เมื่อถูกความร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แตกต่างกับเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria ตัวอื่นๆ ที่สามารถคงคุณสมบัติของเอนไซม์ catalase เมื่อถูกความร้อนที่อุณหภูมิเดียวกัน การทดสอบนี้ใช้ 30% H_2O_2 เช่นเดียวกับ semiquantitative catalase test แต่ต้องมีการบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนทดสอบกับน้ำยา 30% H_2O_2 แล้วสังเกตฟองก๊าซออกซิเจนที่เกิดขึ้น

4. Para-nitrobenzoic acid (PNB)[13]

เป็นการทดสอบอย่างง่าย เพื่อใช้แยกเชื้อในกลุ่ม MTBC ออกจาก NTM โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ Mycobacteria ลงบนอาหาร Middle brook 7H10 ที่ผสม PNB ความเข้มข้น 500 µg/mL เชื้อในกลุ่ม MTBC ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่มีการผสม PNB ในขณะที่เชื้อกลุ่ม NTM สามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าเชื้อ *M. gastri* และ *M. kansasii* และ *M. marinum* บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี PNB[14]

5. Tween 80 hydrolysis[15]

เป็นการตรวจหาเอนไซม์ lipase ซึ่งสามารถย่อย oleic acid จาก Tween 80 และเปลี่ยนสีของ indicator (neutral red) จากสีเหลืองส้มไปเป็นสีชมพูแดง ดังนั้น หากให้ผลบวกจะสังเกตอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง ภายใน 5-10 วัน หลังจากบ่มเชื้อไว้ใน Tween 80 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5-10% CO_2 วิธีนี้ใช้แยกเชื้อในกลุ่ม slow growing *Mycobacterium* (Scotochromogen) *M. gordonae* ซึ่งให้ผลบวก ออกจาก *M. scrofulaceum* ที่ให้ผลลบ และยังสามารถแยกเชื้อ *M. kansasii* ที่จะให้ผลบวกภายใน 24 ชั่วโมงได้อีกด้วย

6. Arylsulfatase[16]

Arylsulfatase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเชื้อ Mycobacteria เกือบทุกสายพันธุ์ เอนไซม์นี้จะย่อย phenolphthalein disulfite ให้เป็น free phenolphthalein ซึ่งทำปฏิกิริยากับ sodium bicarbonate (Na_2CO_3) เกิดเป็นสีชมพูแดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน (สำหรับกลุ่ม rapid grower เช่น *M. fortuitum M. chelonae*) หรือ 14 วัน (สำหรับกลุ่ม slow grower เช่น *M. marinum M. szulgai*) ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มี CO_2 หากอาหารปรากฏสีชมพูแสดงว่าให้ผลบวกในการทดสอบ เชื้อในกลุ่ม MTBC จะไม่มีเอนไซม์ Arylsulfatase

7. Urease[17]

เป็นการตรวจหาเอนไซม์ urease ที่สร้างจากเชื้อ เอนไซม์ urease ย่อย urea เป็น ammonia และ carbon dioxide ทดสอบโดยบ่มตัวเชื้อกับ urea broth เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มี CO_2 ในอาหารที่มี phenol red เป็น pH indicator ในสภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดจะทำให้สีของ phenol red เปลี่ยนเป็นสีเหลือง แตกต่างจากในสภาวะด่างที่จะทำให้สีของ phenol red มีสีชมพูแดง หากเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ urease จะย่อย urea ในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิด ammonia ทำให้ pH สูงขึ้น สีของ phenol red เปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าให้ผลบวก

8. Pyrazinamidase[18]

เป็นการตรวจวัดเอนไซม์ pyrazinamidase ที่ย่อย pyrazinamide เป็น pyrazinoic acid และ ammonia การทดสอบทำโดยบ่มเชื้อไว้ในอาหาร LJ slant ที่มีสภาวะเป็นกรดเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภุมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากครบ 4 วัน เติม 1% ferric ammonium sulphate และบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นอ่านผล หากให้ผลบวกจะเห็นแถบสีชมพูบริเวณส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ หากส่วนบนของอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงใสให้บ่มอาหารดังกล่าวไว้ที่ 2-8 องศาเซลเซียส ต่ออีกเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และตรวจสอบแถบสีส่วนบนของอาหารอีกครั้ง หากยังใสอยู่แสดงว่าผลการทดสอบเป็นลบ เชื้อในกลุ่ม MTBC ส่วนใหญ่ให้ผลเป็นบวก ยกเว้น *M. bovis* ซึ่งพบรายงานการดื้อต่อยา pyrazinamide โดยธรรมชาติอยู่แล้ว ส่วนเชื้อในกลุ่ม NTM ที่ให้ผลเป็นลบ ได้แก่ *M. kansasii, M. simiae, M. szulgai, M. gastri* และที่ให้ผลเป็นบวก ได้แก่ *M. marinum, M. avium, M. intracellulare, M. xenopi, M. malmoense, M. flavescens* ดังนั้นจึงสามารถใช้ผลการทดสอบ pyrazinamidase จำแนกเชื้อ *Mycobacterium* บางสปีชีส์ ได้

9. Iron uptake[19]

เชื้อ Mycobacteria บางสปีชีส์สามารถดูดซึมเหล็ก (iron) จาก ferric ammonium citrate และเปลี่ยนกลายเป็น iron oxide ได้ การทดสอบ iron uptake ช่วยวินิจฉัยเชื้อ *M. fortuitum* โดยบ่มเชื้อที่สงสัยไว้บน LJ slant ที่ผสมสาร ferric ammonium citrate เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ผลบวกจะเห็นสีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม

ข้อดีของวิธีการทดสอบทางชีวเคมี คือ สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ถึงระดับสปีชีส์ และถือเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบัน แต่มักพบปัญหาความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เชื้อวัณโรคในแต่ละสายพันธุ์มีการใช้อาหารชีวเคมีที่แตกต่างกัน และใช้ระยะเวลานานในการออกผล เนื่องจากต้องอาศัยโคโลนีของเชื้อเป็นตัวทดสอบ นอกจากนั้นสารเคมีบางตัวที่ใช้เป็นสารอันตรายและมีราคาแพง ดังนั้นห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลทั่วไปจึงไม่นิยมทำการทดสอบ

3. การทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค

หลังจากกระบวนการย่อยและฆ่าเชื้อปนเปื้อนในเสมหะ ตะกอนที่ได้จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งทดสอบความไวต่อยาของเชื้อวัณโรค โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีที่เรียกว่า “Proportion method” เริ่มจากปรับเชื้อ *Mycobacterium* ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No.1 ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^7 CFU/mL จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีปริมาณเท่ากับ 10^4 และ 10^2 CFU/mL นำเชื้อที่เจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร LJ medium ที่ผสมยาดังนี้ Streptomycin 2.0 µg/mL, INH 0.2 µg/mL, INH 1.0 µg/mL, RIF 1.0 µg/mL, Ethambutol 5.0 µg/mL[20] และอาหาร LJ medium ที่ไม่ผสมยา นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-8 สัปดาห์ อ่านและบันทึกผล โดยพิจารณาจากจำนวนโคโลนีของเชื้อระหว่างอาหารที่มีและไม่มียา หากพบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อในอาหารที่มียาผสมอยู่ มีจำนวนมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 1 เมื่อเทียบกับอาหารที่ไม่มียาผสมอยู่ ถือว่าเชื้อ Mycobacteria นั้นดื้อต่อยาชนิดที่ทดสอบ และผลของเชื้อที่ไวต่อยาเมื่อยาสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อได้มากกว่า 99% (หรือเชื้อเติบโตได้น้อยกว่า 1%) วิธีนี้ยังคงใช้ในประเทศกำลังพัฒนา เนื่องจากง่ายและมีราคาถูก แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้ระยะเวลานานในการออกผล[21] และต้องการห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัย เนื่องจากต้องสัมผัสกับเชื้อปริมาณสูงมาก

วิธีการตรวจวินิจฉัยแบบใหม่

จากคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่ต้องอาศัยเวลาในการเจริญและวิธีตรวจมาตรฐานตามที่ได้กล่าวไปแล้วนั้น ทำให้การตรวจวินิจฉัยวัณโรคล่าช้า ส่งผลต่อการรักษาและการควบคุมโรค อีกทั้งมีความต้องการวิธีตรวจใหม่ๆ ที่มีความสะดวก รวดเร็ว สามารถแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดจากวิธีเดิมที่ใช้อยู่ เช่น แยก *M. tuberculosis* จาก NTM ได้ สามารถตรวจวินิจฉัยในผู้ติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยเด็กได้ สามารถตรวจการดื้อยาพร้อมกันในคราวเดียวและสามารถตรวจในกรณีที่เป็นการติดเชื้อแบบ extrapulmonary tuberculosis อีกทั้งวิธีเดิมบางวิธีนั้นไม่สามารถแยกระหว่างวัณโรคในระยะลุกลามหรือวัณโรคในระยะแฝง ซึ่งมีความสำคัญด้านการป้องกันและควบคุมไม่ให้กลุ่มวัณโรคในระยะแฝงพัฒนาไปเป็นวัณโรคในระยะลุกลามได้[22,23]

ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคขึ้นมาจำนวนมากและมีหลักการแตกต่างกันไป ดังต่อไปนี้

1. Fluorochrome stain[23]

เป็นวิธีตรวจคัดกรองแบบรวดเร็วเพื่อหา acid-fast bacteria (AFB) ในสิ่งส่งตรวจ โดยย้อมตัวเชื้อ Mycobacteria ในเสมหะโดยตรงด้วยสี Auramine-O หรือ Rhodamine B สีจะเข้าไปจับกับ mycolic acid ของตัวเชื้อทำให้ติดสีเหลืองสะท้อนแสงเมื่อดูภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ วิธีนี้มีความไวกว่าการย้อมด้วยวิธีมาตรฐาน Z-N stain แต่ความจำเพาะเท่ากับวิธีตรวจด้วยกล้องธรรมดา จึงทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่ความถูกต้องแม่นยำเพิ่มมากขึ้นและมี turnaround time สั้นกว่าวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานเนื่องจากไขมันหรือเศษผงอาจติดสีคล้ายตัวเชื้อ นอกจากนั้นต้องใช้สี และเครื่องมือพิเศษ ได้แก่ กล้องฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาแพง และอายุการใช้งานหลอด Mercury vapor ที่สั้น (ประมาณ 200 ชั่วโมง) จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการเฉพาะทางที่วิเคราะห์สิ่งส่งตรวจเป็นจำนวนมากและควรมีการควบคุมคุณภาพเพื่อทดสอบความถูกต้อง อย่างไรก็ตาม สิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้ควรย้อมซ้ำด้วย carbol fuchsin staining methods เพื่อยืนยันผลบวก นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้กล้อง Light-Emitting Diodes (LEDs) ที่มีราคาถูกกว่ากล้องฟลูออเรสเซนต์ทดแทนได้ ร่วมกับอายุการใช้งานของ LEDs ที่มากกว่า 50,000 ชั่วโมง จึงเหมาะสมกับการใช้งานในเขตพื้นที่ห่างไกล (peripheral area)[24-27]

2. Automated liquid culture system

เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้อระบบอัตโนมัติ อาศัยการตรวจจับการเจริญเติบโตของเชื้อภายในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถศึกษาความไวต่อยาของเชื้อได้ โดยเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในหลอดที่มียาเทียบกับหลอดที่ไม่มียา (growth control) ซึ่งได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลกให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจหาการดื้อยาของ first line drug[10, 27] และ second line drug[28] ระบบเครื่องเพาะเลี้ยงเชื้ออัตโนมัติมีหลักการที่แตกต่างกัน เช่น เครื่อง BACTEC 460 system และ BACTEC MGIT 960 system เป็นต้น

2.1 เครื่อง BACTEC 460 system

เป็นวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเหลวแบบกึ่งอัตโนมัติ (semi-automated culture system) โดยอาศัยหลักการ Radiometric detection ถูกพัฒนาขึ้นในปี 1969 โดย Deland และ Wagner[29] สิ่งส่งตรวจจะถูกฉีดในหลอดเพาะเลี้ยงที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Middle brook 7H9 broth base) ซึ่งมีสารกัมมันตภาพรังสี ^{14}C ในรูปของเกลือ palmitate และ PANTA antibiotic mixture (P: polymyxin B, A: amphotericin B, N: nalidixic acid, T: trimethoprim, A: azlocillin) ซึ่งเป็นส่วนผสมของยาปฏิชีวนะที่ใช้ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนในสิ่งส่งตรวจ หากในสิ่งส่งตรวจมีเชื้อ mycobacteria เชื้อจะใช้เกลือ palmitate ในการเจริญเติบโตและเกิด decarboxylation กับ ^{14}C ปล่อย $^{14}CO_2$ ออกมา[30] ตัวเครื่องสามารถวัดและแสดงเป็นค่า growth index (GI) ค่า GI ที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงอัตราการเติบโตของเชื้อในอาหารที่เพิ่มขึ้น ข้อดีของการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวด้วยเครื่อง BACTEC 460 นี้ คือ มีความจำเพาะ (99.9%) และมีความไว (85.8%) สูงต่อเชื้อ mycobacteria

สามารถทดสอบ primary isolation และทดสอบการดื้อยา (drug susceptibility test) จากสิ่งส่งตรวจได้ (clinical specimen) ให้ผลทดสอบรวดเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อด้วย solid media (สามารถออกผลภายใน 10 ถึง 18 วัน ในขณะที่ผลจากการเพาะเลี้ยงด้วย solid media เช่น LJ medium จะใช้เวลา 3 ถึง 5 สัปดาห์)[31] นอกจากนี้ด้วยการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวยังเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ Mycobacteria สายพันธุ์ที่ขึ้นได้ดีในอาหารเหลว ได้แก่ *Mycobacterium genavense*[32] ข้อด้อยคือมีราคาแพงและเป็นอันตรายจากการใช้สารกัมมันตภาพรังสี รวมทั้งการควบคุมและกำจัดขวดเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการใช้งานแล้ว

2.2 เครื่อง BACTEC MGIT 960 system

เป็นระบบอัตโนมัติที่พัฒนามาจาก BACTEC 460 system โดยใช้หลักการ non-radiometric technique สิ่งส่งตรวจทั้งจาก pulmonary และ extra-pulmonary tuberculosis (ยกเว้นเลือด) จะถูกเพาะเลี้ยงในหลอด Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) ซึ่งมีอาหาร Middlebrook 7H9 broth base ผสมกับ OADC enrichment (O: oleic acid สำหรับกระตุ้น metabolic, A: albumin สำหรับจับ free fatty acid, D: dextrose เป็นแหล่งพลังงาน, C: catalase สำหรับทำลาย peroxides ที่เกิดขึ้นในอาหาร) และ PANTA antibiotic mixture เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ โดยมีสารฟลูออเรสเซนต์ที่ไวต่อออกซิเจน (O_2: oxygen-quenched fluorochrome) อยู่ก้นหลอด เมื่อเชื้อใช้ออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต สารฟลูออเรสเซนต์ในหลอดจะถูกวัดด้วย sensors (UV transilluminator lamp) โดยผลฟลูออเรสเซนต์ที่ได้แปรผันตรงกับปริมาณของออกซิเจนที่ถูกใช้เพื่อการเจริญเติบโต ผลการเจริญของเชื้อในหลอดจะถูกวัดทุกๆ 60 นาที เมื่อค่าการเรืองแสงถึงเกณฑ์ตามกำหนดแสดงถึงการเพิ่มจำนวนของเชื้อมีจำนวนประมาณ 10^5 ถึง 10^6 CFU/mL ภายในหลอด เครื่องจะส่งสัญญาณเตือนเป็นผลบวกจึงสามารถติดตามผลได้อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะแรกและทุกชั่วโมง ทำให้ออกผลทดสอบได้รวดเร็วกว่าระบบ BACTEC 460 system สามารถให้ผลที่รวดเร็วภายใน 3-10 วัน ลดปัญหาแรงงานเพราะใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุม และยังมีความจำเพาะและความไวสูง (ความจำเพาะเท่ากับ 99.6% และความไวเท่ากับ 81.5%[31] นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบการดื้อยาได้เช่นเดียวกัน

3. Polymerase chain reaction (PCR) & Gene probe

มีหลักการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อที่สงสัย (nucleic acid amplification (NAA) assays) โดยออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับสารพันธุกรรม (DNA หรือ RNA) ของเชื้อที่ต้องการตรวจหา เช่น 16S rDNA ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นแรก (denaturation) เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 95-97 องศาเซลเซียส เพื่อแยกสาย DNA ออกจากกันให้เป็นเส้นเดี่ยว ขั้นตอนที่ 2 (annealing) เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมในการให้ primer ไปเกาะที่ตำแหน่งจำเพาะ และขั้นที่สาม (extension) เป็นขั้นตอนที่ใช้อุณหภูมิประมาณ 70-72 อาศาเซลเซียส เพื่อต่อสายของ DNA คู่สม ในขั้นตอนนี้มีการใช้เอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวช่วยในปฏิกิริยา ในการทำ PCR จะมีการวนรอบซ้ำของ 3 ขั้นตอนนี้ จำนวนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะเป็นจำนวน 2^n เมื่อ n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยา การตรวจสอบ PCR product ที่เกิดขึ้น ใช้วิธี gel electrophoresis วิธี PCR นี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ใช้ได้ดีแม้มีปริมาณเชื้อน้อย แต่เป็นวิธีที่ต้องอาศัยเครื่องมือ Thermocycler ซึ่งมีราคาแพง ปัจจุบันมีนักวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยอาศัยหลักการนี้ แต่มีรายละเอียดของวิธีการที่แตกต่างกัน

ยกตัวอย่างเช่น

3.1 GeneXpert MTB/RIF assay[22, 23, 33]

เป็นเครื่องอัตโนมัติใช้หลักการ Real-time PCR เช่นเดียวกับการทำ PCR แต่มีวิธีการตรวจหา PCR product ด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ และสามารถตรวจหาได้ในทันทีที่มีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยไม่ต้องเสียเวลาในการทำ gel electrophoresis วิธีนี้ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ในตัวอย่างได้โดยตรง โดยใช้ *rpoB* เป็นยีนเป้าหมาย ซึ่งเป็นยีนที่พบจำเพาะในกลุ่มของเชื้อ MTBC พร้อมทั้งยังสามารถตรวจการดื้อต่อยา RIF ในตัวอย่างได้ โดยออกแบบ primer เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *rpoB* ในตำแหน่งที่ 81-bp (81-bp rifampin resistance-determining region) พบว่า 95% ของการดื้อยา RIF สัมพันธ์กับการเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าว[34] จากการศึกษาพบว่า ในสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นบวก (smear positive) และให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก การทดสอบมีค่าความไวเท่ากับ 98.2% และในสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลการย้อมสีทนกรดเป็นลบ (smear negative) แต่ให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก การทดสอบมีค่าความไวเท่ากับ 72.5% มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 99.2%[35] ข้อดีของการตรวจด้วยวิธีนี้ คือ มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้งานง่าย เป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานเนื่องจากเป็นระบบปิด กล่าวคือ ผู้ปฏิบัติงานเพียงนำสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ได้จากผู้ป่วยมาผสมกับน้ำยาที่ใช้ในการย่อยเสมหะ จากนั้นจึงนำไปหยอดลงในตลับเพื่อทดสอบต่อโดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ วิธีนี้ให้ผลรวดเร็วทั้งการวินิจฉัยและผลการดื้อต่อยา RIF (สามารถรายงานผลได้ภายใน 2 ชั่วโมง) เป็นวิธีที่องค์การอนามัยโลกยอมรับ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้สามารถตรวจหาการดื้อต่อยา RIF ได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ต้องอาศัยเครื่องอัตโนมัติที่จำเป็นต้องได้รับการบำรุงรักษาและใช้น้ำยาเฉพาะซึ่งมีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

3.2 Line probe assays

เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* และตรวจหาการดื้อยา โดยใช้หลักการของ PCR และ hybridization วิธีการหลักๆ คือ ขั้นตอนแรกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *M. tuberculosis* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่ติดฉลากด้วย biotin (biotinylated primer) จากนั้น นำ PCR product ที่ได้ไปทดสอบกับแถบที่ตรึงด้วย probes จำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมหรือยีนที่กำหนดการดื้อยาของเชื้อด้วยเทคนิค hybridization หากมีสารพันธุกรรมของเชื้อในสิ่งส่งตรวจ จะมีการจับอย่างจำเพาะของ PCR product และ probe (hybridization) บนแถบ หลังจากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี colorimetric development สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นและแปลผลตามคำแนะนำของบริษัท ตัวอย่างชุดทดสอบที่ใช้หลักการนี้ ได้แก่ INNO-LiPA®kit (Innogenetics, เบลเยี่ยม) และ GenoType® assay (Hain Lifescience, เยอรมัน) ชุดตรวจ INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 kit สามารถวินิจฉัยแยกเชื้อ Mycobacteria ในระดับ สปีชีส์ ได้ดังนี้ *M. tuberculosis complex, M. kansasii, M. xenopi, M. gordonae, M. genavense, M. simiae, M. marinum and M. ulcerans, M. celatum, M. avium-M. intracellulare complex* (MAIS), *M. avium, M. intracellulare, M. rofulaceum, M. haemophilum, M. chelonae complex, M. fortuitum* complex และ *M. smegmatis* ตรวจหายีนในส่วน 16S-23S ribosomal rRNA spacer region ของเชื้อ[36] นอกจากนี้ยังมีชุดทดสอบ INNO-LiPA Rif. TB ที่สามารถตรวจวินิจฉัย MTBC และการดื้อยา RIF โดยตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีน *rpoB* ไปพร้อมกัน[37] วิธีนี้เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อมาแล้ว แต่ยังไม่แนะนำให้ใช้กับสิ่งส่งตรวจโดยตรง สำหรับชุดตรวจ GenoType® assay สามารถ

วิเคราะห์แยกเชื้อ MTBC และเชื้อในกลุ่ม NTM ได้[38] ชุดทดสอบ GenoType® MTBDRplus สามารถตรวจหา MTBC ควบคู่ไปกับการดื้อต่อยา RIF และ INH ได้ โดยตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *rpoB* การกลายพันธุ์บนยีน *katG* (ส่งผลให้เชื้อดื้อต่อยาในระดับ high-level isoniazid resistance) และการกลายพันธุ์บนยีน *inhA* (ส่งผลให้เชื้อดื้อยาในระดับ low-level isoniazid resistance) ชุดตรวจนี้สามารถใช้ได้กับเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเชื้อมาก่อนรวมถึงจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง วิธีการนี้ได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลกให้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับตรวจการดื้อยาของ first line drug[10,26] ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว (ให้ผลภายใน 3-4 ชั่วโมง) และยังมีความไว และความจำเพาะสูงอีกด้วย (ปริมาณเชื้อในเสมหะที่ตรวจพบได้ 1-10 bacilli/mL) เร็วๆ นี้ มีการพัฒนาชุดตรวจเพื่อใช้วิธีนี้ในการทดสอบความไวต่อยาในกลุ่ม second line drug เช่น ยาในกลุ่ม fluoroquinolones, aminoglycoside และ cyclic peptide เป็นต้น อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีราคาแพง บางชุดทดสอบสามารถนำมาใช้ได้กับตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการเพาะเชื้อเท่านั้น และยังต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการแปลผล

3.3 Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค PCR อาศัยการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมโดยใช้ primer จำนวน 6 เส้น ที่มีความจำเพาะกับ 16S rDNA ใน 6 ตำแหน่งของเชื้อวัณโรค ได้แก่ outer primers (F3 และ B3), forward inner primer (FIP(F1c และ F2)), backward inner primer (BIP(B1 และ B2c)), และ loop primers (loop F และ loop B)[39] ร่วมกับเอมไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่ทำหน้าที่แยกสายคู่ของ DNA และเติม dNTPs ได้ที่อุณภูมิคงที่ระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส กระบวนการเพิ่มจำนวนมี 2 ขั้นตอนหลัก เริ่มต้นคือ initial และ cycling step ขั้นตอนนี้จะเกิดการแยกของสาย DNA เพื่อให้ outer และ inner primer จะเข้าจับ DNA เป้าหมายอย่างจำเพาะ จากนั้นเติมเบสคู่สมตามแม่แบบ DNA บริเวณปลายมีส่วน hanging ซึ่งโค้งเข้ามาเกิดเป็นปลาย loop ทั้งสองข้างและเกิดโครงสร้างคล้ายดัมเบลขึ้น (dumbbell-shaped DNA structures) โครงสร้างดัมเบลนี้จะถูกใช้เป็นต้นแบบเพื่อเพิ่มจำนวน จนมีลักษณะเป็นลูกโซ่เป็นจำนวนมากในขั้นตอน elongation และ recycling ทำให้สามารถดูผลบวกได้ด้วยตาเปล่า หรือตรวจวัดด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR Green จุดเด่นของวิธีการนี้คือ เป็นการเพิ่มสารพันธุกรรมของเชื้อแบบใช้อุณหภูมิเดียว (isothermal) จึงเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยเครื่อง Thermocycler นอกจากนี้ ยังตรวจวัดสารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น (PCR product) ได้หลายวิธี ทำให้วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะสูงถึง 97% และ 99% ตามลำดับ ให้ผลตรวจที่รวดเร็ว (ภายใน 1 ชั่วโมง) และสามารถทดสอบจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง เช่น เสมหะ มีรายงานว่าให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ[39] อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังต้องอาศัยเครื่องมือที่สามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการทดสอบ

4. Microscopic observation broth drug susceptibility (MODS)[40]

อาศัยการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ *M. tuberculosis* กล่าวคือ การเกิด Micro-colony และการสร้าง cord and tangle formation ที่จำเพาะของเชื้อ *M. tuberculosis* (Figure 2) ใน microtitre plates ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วย Middlebrook 7H9 broth, OADC enrichment และ PANTA antibiotic mixture ซึ่งช่วยเพิ่มความไวและทำให้เชื้อสามารถเติบโตได้เร็วกว่าในอาหารแข็ง[41] วิธีการ คือ นำสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการ decontaminate แล้วมาเพาะเลี้ยงในหลุมทดสอบ (24-well plate) ที่ประกอบด้วยหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเดียวและหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมยาอยู่ด้วย ได้แก่ RIF และ INH ปิดฝา นำใส่ถุง zip-lock และบ่มที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ สังเกตการสร้าง cord และ tangle formation ที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว วิธีนี้สามารถตรวจ *M. tuberculosis* จากสิ่งส่งตรวจเสมหะในเวลาเฉลี่ย 9 วัน มีค่าความไวอยู่ที่ 92%[42] วิธีนี้ได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลกให้ใช้ในห้องปฏิบัติการมาตรฐานขนาดใหญ่[10] มีความไว 98% และความจำเพาะ 99% ในการตรวจหาการดื้อยา RIF ของเชื้อ *M. tuberculosis* และมีความไว 91% เมื่อตรวจหาการดื้อยา INH แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ต้องมีการเติมสารอาหารและยาเพิ่มซึ่งมีราคาแพง ต้องทดสอบในห้องปฏิบัติการที่มีระบบชีวนิภัยระดับ 3 (Biosafety level 3: BSL3) และยังต้องอาศัยผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญในการสังเกตลักษณะ cord formation จึงทำให้วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมอย่างใช้แพร่หลายมากนัก เป็นที่น่าสนใจว่าในปี 2015 ได้มีการพัฒนาวิธี MODS ในรูปแบบอัตโนมัติ (Auto-MODS Assay)[43] โดยการใช้ 2.0-mL screw-cap tubes แทนการใช้ 24 well-plate เพื่อลดความเสี่ยงในการสัมผัสเชื้อและป้องกันการปนเปื้อนเชื้ออื่นในการทดสอบ นอกจากนี้ยังเพิ่มการทดสอบที่มีการผสมสาร PNB ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้แยกเชื้อ *M. tuberculosis* และ NTM ออกจากกัน โดย *M. tuberculosis* ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมสารนี้ บันทึกการสังเกตการเจริญของเชื้อด้วยกล้องอัตโนมัติเพื่อเพิ่มความปลอดภัย และลดการใช้แรงงานบุคลากรในการอ่านผล วิธีนี้มีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 95.9% และ 97.1% ตามลำดับ

5. Interferon-gamma release Assays (IGRA's)[23]

เป็นวิธีตรวจเลือดเพื่อวินิจฉัยผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (latent tuberculosis infection) หรือผู้ที่สงสัยว่าเคยมีประวัติได้รับเชื้อวัณโรค อาศัยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อโดยวัดระดับ interferon-gamma (IFN-γ) ที่หลั่งมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell lymphocyte โดยมีหลักการคือ หากผู้ที่สงสัยอยู่ในระยะแฝงหรือเคยมีประวัติได้รับเชื้อวัณโรค เมื่อได้รับการกระตุ้นซ้ำด้วยแอนติเจนจำเพาะของเชื้อ *M. tuberculosis* ได้แก่ early secretory antigenic target-6 (ESAT-6), culture filtrate protein 10 (CFP-10), tuberculosis 7.7 antigen[44,45] จะมีการหลั่งสาร IFN-γ จากลิมโฟซัยท์ที่เคยมีการตอบสนองต่อเชื้อ จึงช่วยบ่งชี้บอกว่าผู้ป่วยรายนี้เคยได้รับเชื้อวัณโรคมาก่อนหรืออยู่ในระยะแฝง ปัจจุบันมีชุดสำเร็จรูปจำหน่ายใช้ทดสอบ IGRA's เช่น QuantiFERON®TB Gold Test (Cellestis/Qiagen, ออสเตรเลีย) และ T-SPOT®.TB Test (Oxford Immunotec, อังกฤษ) วิธี QuantiFERON®TB Gold อาศัยหลักการ enzyme-linked immunosorbent assay กล่าวคือ นำเลือดครบส่วนมากระตุ้นการหลั่ง IFN-γ ด้วย ESAT-6, CFP-10 และ TB7.7 antigen ปั่นเก็บส่วนใสตรวจวัดปริมาณ IFN-γ ด้วยวิธี ELISA รายงานค่า IFN-γ ในหน่วยของ international units (IU) per milliliter (IU/mL) ส่วนวิธี T-SPOT®.TB อาศัยหลักการ enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay นำเลือดของผู้ทดสอบมาปั่นแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และเพาะเลี้ยงบน Tissue culture plate ที่ติดด้วย anti- IFN-γ จากนั้นกระตุ้น PBMCs ด้วย ESAT-6 และ CFP-10 antigen และตรวจวัด IFN-γ โดยนับ spot-forming cells ที่เกิดขึ้น รายงานผลเป็นจำนวนของเม็ดเลือดขาวที่หลั่ง IFN-γ (IFN-γ-producing T cells) ความ

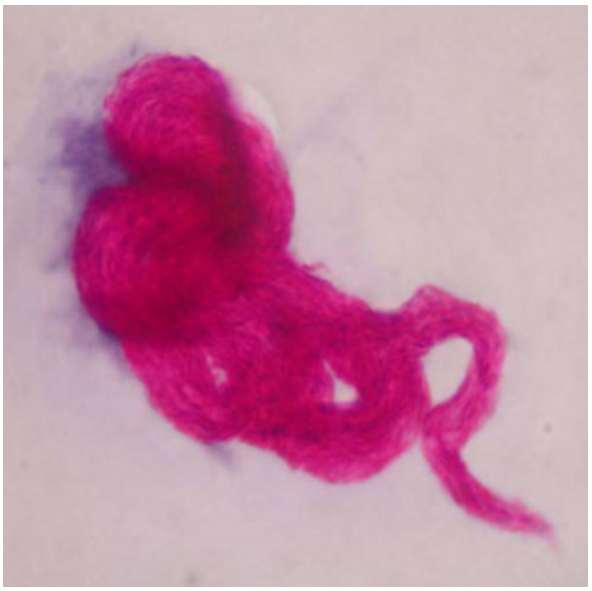

Figure 2. *Acid fast stain of cord formation of Mycobacterium tuberculosis under microscope (x100).*

จำเพาะของวิธี IGRA's ต่อการวิเคราะห์ผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงมีค่ามากกว่า 95% ความไวของวิธี T-SPOT®.TB มีค่าเท่ากับ 90% และของวิธี QuantiFERON®TB Gold มีค่าเท่ากับ 80% แต่หากทดสอบตัวอย่างเลือดเป็นผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และเด็ก พบว่า ความไวของชุดทดสอบลดลง[46] ข้อดีของวิธี IGRA's คือ สามารถตัดปัญหาผลบวกปลอมจากการได้รับวัคซีน BCG หรือการติดเชื้อในกลุ่ม NTM ได้ ให้ผลรวดเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างผู้ที่มีการติดเชื้อแบบลุกลาม หรืออยู่ในระยะแฝงได้ โดยเฉพาะในประเทศที่พบการระบาดของเชื้อสูง ซึ่งมักพบผู้ป่วยระยะแฝงจำนวนมาก อีกทั้งไม่สามารถใช้ในการติดตามผลการรักษาได้[47] วิธีนี้เป็นวิธีที่ต้องอาศัยเครื่องมือและอุปกรณ์เฉพาะราคาแพง ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญ มักใช้เป็นการทดสอบเพื่อวินิจฉัยผู้ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดโรค นิยมตรวจในประเทศที่มีอุบัติการณ์ของวัณโรคต่ำถึงปานกลาง เช่น เพื่อตรวจคัดกรองคนเข้าเมือง[48]

6. Urinary lipoarabinomannan (LAM)[23]

อาศัยการตรวจหา Lipoarabinomannan (LAM) ซึ่งเป็น glycolipid ในส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria ที่ปนออกมากับปัสสาวะของผู้ป่วย LAM เป็น lipopolysaccharide ที่ถูกหลั่งออกมาเป็นปริมาณมากจาก infected alveolar macrophages และจากบริเวณรอยโรคในผู้ป่วยที่อยู่ในระยะติดเชื้อ และแพร่เข้าสู่กระแสเลือด (systemic circulation) ได้ และเนื่องจากมีขนาดเล็ก (17.3 kD) ใกล้เคียงกับ myoglobin ทำให้สามารถผ่านระบบปัสสาวะออกมาได้ นอกจากนี้ LAM ยังมีคุณสมบัติทนความร้อน (heat-stable) ทำให้ไม่สลายง่ายในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย วิธีนี้จึงสามารถใช้บ่งชี้ในการแยกผู้ที่มีการติดเชื้อแบบลุกลามกับผู้ที่มีการติดเชื้อในระยะแฝงได้ ชุดตรวจที่มีการวางขายในปัจจุบัน เช่น Alere Determine™ TB LAM Ag test ('TB LAM' test, Alere, Waltham, MA) ซึ่งอาศัยหลักการ lateral flow immunochromatographic assay วิธีการคือ หยดตัวอย่างปัสสาวะลงบนแถบทดสอบที่ติดฉลากด้วย anti-LAM ในส่วนของ test band หากในปัสสาวะมี LAM อยู่ทำปฏิกิริยาเกิดเป็นแถบสีขึ้นเทียบกับ Reference scale card นอกจากนี้ยังมีวิธี MTB ELISA (Chemogen Inc, สหรัฐอเมริกา) และ Clearview(R) TB (Inverness, สหราชอาณาจักร) ซึ่งอาศัยหลักการ ELISA ในการตรวจหา LAM ในปัสสาวะ แต่ไม่เป็นที่นิยมเพราะก่อนการทดสอบต้องเตรียมปัสสาวะก่อนด้วยการให้ความร้อน (heating) ที่ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปั่นที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จึงนำเอาส่วน supernatant ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะค่อนข้างสูง (96-100%) แต่มีความไวต่ำ (74-81%)[49] ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถใช้ตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่เก็บง่าย สะดวกทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ การทดสอบไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญและไม่ต้องอาศัยเครื่องมือหรือตู้ชีวนิรภัยในการปฏิบัติงาน มีราคาถูก ให้ผลที่รวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าให้ผลการทดสอบที่ดีในผู้ติดเชื้อ HIV ที่พบร่วมกับการติดเชื้อวัณโรค[50] แต่วิธีที่มีความไวต่ำ ไม่เหมาะสำหรับใช้ในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อวัณโรคที่ไม่พบการติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย วิธีนี้จึงถูกแนะนำโดยองค์การอนามัยโลกให้ใช้เป็นชุดตรวจคัดกรองหาผู้ป่วยที่อยู่ในระยะลุกลาม หรือในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย[51]

7. Flow cytometry assay

อาศัยการตรวจคุณลักษณะของเซลล์ที่ต้องการศึกษาในแต่ละเซลล์ โดยยิงแสงเลเซอร์ไปยังเซลล์ สามารถบอกได้ทั้งขนาดและองค์ประกอบภายในเซลล์ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหาเครื่องหมาย (marker) บนผิวเซลล์ได้โดยการย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ติดกับแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนบนผิวเซลล์ที่ต้องการทดสอบ จากหลักการดังกล่าวจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรค โดยตรวจหา marker บนผิว T-cell ที่มีตอบสนองอย่างจำเพาะต่อ *M. tuberculosis* ซึ่งพบรายงานการใช้ marker ต่างๆ เช่น CD3, CD4, CD8, interleukin 2 (IL-2), tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interferon gamma (IFN-γ), MHC class I และ MHC class II tetramer complex[52] Streitz และคณะ[53] ศึกษา T-cell lymphocyte ของผู้ป่วยวัณโรคที่ถูกกระตุ้นด้วย *M. tuberculosis* specific

ESAT-6 protein แล้วตรวจหา CD27 และระดับ IFN-γ ด้วยวิธีการ flow cytometry พบว่า T-cell ของผู้ป่วยลดการแสดงออกของ CD27 และมีการสร้าง IFN-γ เพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าความจำเพาะและความไวของการทดสอบเท่ากับ 100% และจากการศึกษาของ Harari และคณะ[54] ที่เปรียบเทียบ IL-2, IFN-γ และ TNF-α ในผู้ป่วยวัณโรคชนิดลุกลามและแบบแฝง พบการเพิ่มขึ้นของระดับ TNF-α ในผู้ป่วยวัณโรคชนิดลุกลามอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างทั้งสิ้น 101 ตัวอย่าง ให้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 67%, 92%, 80% และ 92.4% ตามลำดับ นอกจากนี้ Rozot และคณะ[55] ตรวจวัด CD3, CD4, CD8, IFN-γ, TNF-α, และ IL-2 บน PBMCs ของผู้ป่วยวัณโรคที่ถูกกระตุ้นด้วย *M. tuberculosis* specific ESAT-6 หรือ CFP protein พบว่าหากตรวจวัด *M. tuberculosis*-specific CD4 T cells producing TNF-α ร่วมกับ *M. tuberculosis* -specific CD8 T-cell responses ได้ค่าสูง บ่งบอกได้ว่าผู้ป่วยอยู่ในระยะลุกลามโดยมีค่าความไวและความจำเพาะเท่ากับ 81.1% และ 86.5% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธี flow cytometry นี้เป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ สามารถใช้ประยุกต์หา biomarker เพื่อช่วยในการตรวจวินิจฉัยได้ อย่างไรก็ตาม ยังต้องอาศัยเครื่องมือและน้ำยาเฉพาะที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานเนื่องจากเป็นการทดสอบกับเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ จึงต้องปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการชีวนิรภัยระดับ 3 อีกทั้งต้องอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

8. Mycobacteriophage assay

อาศัยหลักการของ phage virus ที่จำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* (mycobacteriophage) เพื่อใช้วินิจฉัยเชื้อวัณโรคที่ยังมีชีวิตในสิ่งส่งตรวจ แบ่งได้เป็นสองแบบ ได้แก่ phage-amplified biological assay (PhaB) และ luciferase reporter phages (LRPs) วิธี PhaB อาศัยการใช้ Mycobacteriophage ที่จำเพาะกับ *M. tuberculosis* ในสิ่งส่งตรวจเสมหะที่ผ่านการ decontaminate แล้ว เพื่อให้เกิดการติดเชื้อ phage ใน *M. tuberculosis* จากนั้นกำจัด phage ที่เหลืออยู่ด้านนอก แล้วเก็บ phage ที่ถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ตรวจโดยนำ phage ที่ได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี detector cell เช่น *M. smegmatis* (ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคและมีการเจริญเติบโตเร็วภายใน 24 ชั่วโมง) หากในสิ่งส่งตรวจมีเชื้อ *M. tuberculosis* อยู่ phage จะทำให้เกิดการติดเชื้อใน *M. smegmatis* ได้เช่นกัน เมื่อ phage เพิ่มจำนวนทำให้เกิดการแตกของเซลล์แบคทีเรียเกิดเป็นจุดใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชุดตรวจที่อาศัยหลักการนี้ ได้แก่ FASTPlaqueTB™ (Biotec Laboratories Ltd., Ipswich, สหราชอาณาจักร) วิธีนี้สามารถบอกได้ว่าในสิ่งส่งตรวจเสมหะมีเชื้อที่มีชีวิตปนเปื้อนอยู่ ให้ผลรวดเร็ว สามารถออกผลภายใน 2 วัน และยังสามารถตรวจการดื้อยาได้ แต่ก็สามารถพบการปนเปื้อนสูงจนบางครั้งไม่สามารถสรุปผลได้ ส่วนวิธี LRPs อาศัย Mycobacteriophage ที่มียีน fflux (firefly luciferase) อยู่ภายใน ที่สามารถเปล่งแสงได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย luciferin และ cellular ATP เมื่อในสิ่งส่งตรวจมี *M. tuberculosis* อยู่ Mycobacteriophage จะทำให้เกิดการติดเชื้อ และเมื่อกระตุ้นด้วย luciferin เชื้อ *M. tuberculosis* ดังกล่าวจะเกิดการเปล่งแสงและตรวจวัดได้ ทั้งสองวิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์หาการดื้อต่อยาของเชื้อได้โดยเพิ่มขั้นตอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมกับยาที่ต้องการทดสอบก่อนที่นำไปบ่มร่วมกับ Mycobacteriophage เพื่อทดสอบว่ามีการติดเชื้อหรือไม่[56] วิธี Mycobacteriophage นี้มีค่าความจำเพาะประมาณ 99% และค่าความไวประมาณ 98%[57]

9. การใช้ Immunomagnetic ร่วมกับ PCR with confronting two pair primers (IMS-PCR-CTPP)[58]

วิธีนี้อาศัยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยเคลือบผงแม่เหล็กด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน mycobacterial antigen 85B (Ag85B) ของเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* เพื่อช่วยเพิ่มโอกาสการพบเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ โมโนคอลนอล แอนติบอดี สามารถจับได้ทั้งเชื้อในกลุ่ม MTBC และ NTM หลังจากนั้นจึงนำไปทดสอบต่อเพื่อวินิจฉัยเชื้อในกลุ่ม MTBC โดยนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี PCR with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) ที่ออกแบบ primer ให้มี

ความจำเพาะกับยีนเป้าหมายใหม่คือ ยีน *lep*B ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม MTBC เท่านั้น นอกจากนี้ primer ยังสามารถระบุการติดเชื้อ *M. bovis* ได้อีกด้วย (Figure 3) การศึกษาของ Tharinjaroen และคณะ[59] พบว่า ยีน *lep*B สามารถพบได้ในแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ *lep*B กำหนดการสร้างโปรตีน Type I signal peptidase ที่เป็นเอนไซม์ที่สำคัญและจำเป็นสำหรับการมีชีวิตอยู่ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ รวมทั้งเชื้อในกลุ่ม Mycobacteria ด้วยเช่นกัน จากการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในกลุ่ม MTBC พบว่า ยีน *lep*B มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เป็นที่น่าสนใจว่า ในเชื้อ *M. bovis* ลำดับเบสตำแหน่งที่ 766 ของยีนนี้มีความแตกต่างจากเชื้อตัวอื่นๆ ในกลุ่ม MTBC กล่าวคือมีการเปลี่ยนจากเบสกัวนีน (guanine) เป็นอะดีนีน (adenine) (G766A) จึงสามารถประยุกต์ใช้วิธี PCR-CTPP ในการตรวจพิสูจน์เชื้อกลุ่ม MTBC และระบุการติดเชื้อ *M. bovis* ได้ในคราวเดียวกัน วิธี PCR-CTPP สามารถตรวจพบเชื้อวัณโรคได้อย่างน้อยที่สุด 12-120 ตัว และเมื่อทดสอบวิธีนี้กับสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากโคโลนีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 95% ความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าทำนายผลบวกเท่ากับ 100% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 95% นอกจากนี้ เมื่อประเมินวิธีนี้กับสิ่งส่งตรวจเสมหะโดยตรงเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่ามีค่าความไว 84% ความจำเพาะ 76% ค่าทำนายผลบวก 90% และค่าทำนายผลลบเท่ากับ 67% จะเห็นว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก ให้ผลที่ถูกต้อง รวดเร็ว มีค่าความไวและความจำเพาะสูง เมื่อนำมาพัฒนาต่อยอดร่วมกับการใช้ผงแม่เหล็กที่มีการเคลือบโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับเชื้อในกลุ่ม *Mycobacterium* (IMS-PCR-CTPP) จึงเกิดเป็นชุดตรวจวินิจฉัยวัณโรครูปแบบใหม่ขึ้น จากการทดสอบวิธี IMS-PCR-CTPP โดยใช้สิ่งส่งตรวจเสมหะทั้งสิ้น 133 ตัวอย่าง ที่ให้ผลการย้อมสี AFB เป็นลบจนถึง 3+ เทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่ามีความไว และความจำเพาะเท่ากับ 89.9% และ 88.6 % ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าวิธี IMS-PCR-CTPP นี้เป็นวิธีที่มีความถูกต้อง ความไว และความจำเพาะสูงกว่าเมื่อเปรียบกับการย้อมสี AFB ให้ผลการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ ราคาถูก สามารถลดการนำเข้าชุดตรวจสำเร็จรูปที่มีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคและระบุการติดเชื้อ *M. bovis* โดยไม่ต้องอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีที่ต้องการสภาวะที่เป็นกรดจึงไม่เป็นที่นิยมทำกันในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป

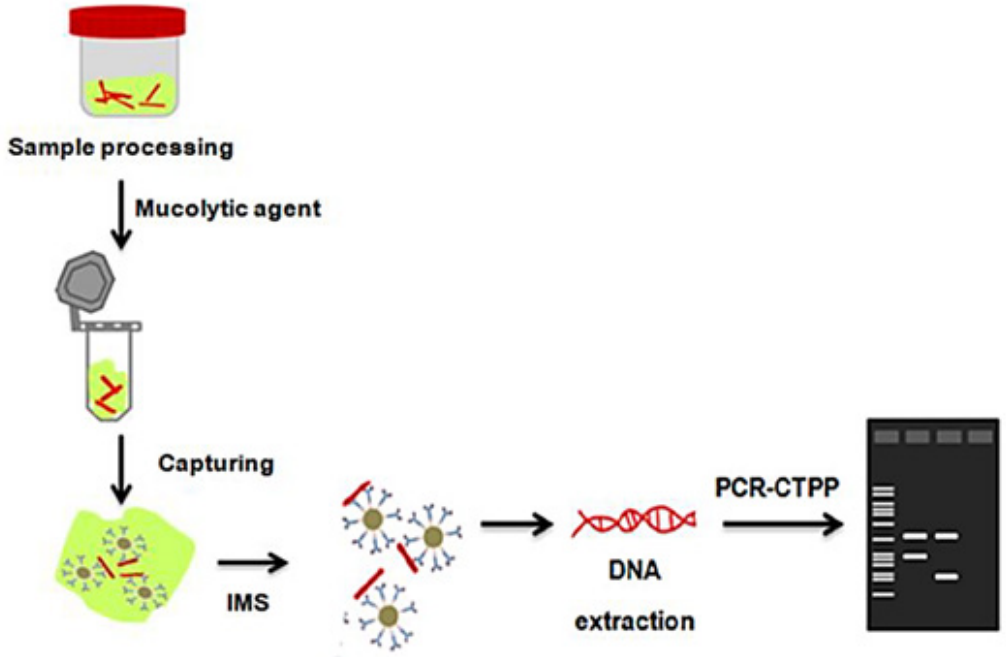

Figure 3. *Principle of immunomagnetic combined with PCR with confronting two pair primers (IMS-PCR-CTPP). Anti-Mycobacteria antibody coated magnetic beads were used to increase binding of Mycobacterium spp. presenting in clinical sample prior to detection and identification of M. tuberculosis complex and M. bovis using PCR-CTPP.*

10. Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)[60]

เป็นเครื่องมือวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร โดยการทำให้สารที่ต้องการทดสอบแตกตัวเป็นไอออนด้วยแสงเลเซอร์ ไอออนของสารจะเคลื่อนที่เข้าสู่เครื่องวัดมวลโมเลกุล (mass spectrometer) ซึ่งเป็นท่อสุญญากาศที่มีสนามไฟฟ้าไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ (detector) ระยะเวลาที่ไอออนเคลื่อนที่ไปตกกระทบกับตัวตรวจจับ เรียกกว่า time-of-flight (TOF) ซึ่งแปรผันตรงกับมวลโมเลกุลของสาร สารโมเลกุลเล็กเคลื่อนที่ไวกว่าสารโมเลกุลใหญ่จึงใช้เวลาในการเคลื่อนที่น้อยกว่า แสดงผลออกมาเป็นกราฟ mass/charge ratio (m/z) เรียกว่า peptide mass fingerprint (PMF) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัวแตกต่างกันตามชนิดของสารนั้นๆ นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในระบบ จากความรู้ดังกล่าวจึงมีการนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจเพื่อระบุชนิดของเชื้อจุลชีพต่างๆ รวมถึงเชื้อ *Mycobacterium* เช่น ในปี 2010 Lotz และคณะ[61] ทดสอบเชื้อ Mycobacteria ทั้งสิ้น 311 ตัวอย่างที่มีการเพาะเลี้ยงทั้งในอาหารแข็ง (LJ) และอาหารเหลว (MGIT) พบว่าสามารถให้ผลได้ถูกต้องคิดเป็น 97% และ 77% จากเชื้อที่เพาะเลี้ยงบน LJ และ MGIT ตามลำดับ นอกจากนั้น ยังมีการใช้ MALDI-TOF ร่วมกับการทำ sequencing เพื่อนำผลที่ได้ไปเป็นฐานข้อมูลในระบบเพื่อใช้ระบุเชื้อ *Mycobacterium* ที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษา[62] วิธีนี้ช่วยลดระยะเวลาในการระบุชนิดของเชื้อ *Mycobacterium* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เป็นวิธีที่ให้ผลที่ถูกต้องรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบยังขึ้นกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ในระบบซึ่งต้องมีการปรับฐานข้อมูลให้มีความทันสมัยอยู่เสมอ เพื่อให้การวินิจฉัยเป็นไปอย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Mycobacterium* เป็นเชื้อที่มีผนังเซลล์หนา จึงต้องมีการใช้สารเคมีรวมถึงวิธีการเฉพาะเพื่อเตรียมเชื้อก่อนทดสอบด้วยเครื่อง MALDI-TOF ซึ่งมีราคาแพง จึงอาจยังไม่เป็นที่นิยมมากนัก

บทสรุป

การติดเชื้อวัณโรคเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบรายงานการติดเชื้อเพิ่มขึ้นของวัณโรคดื้อยาหลายขนาน ร่วมกับยังไม่พบรายงานยาชนิดใหม่ที่ใช้ในการรักษาวัณโรค การวินิจฉัยที่ถูกต้อง และรวดเร็วจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรค วิธีที่ใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดที่แตกต่างกัน การประยุกต์ใช้วิธีใหม่ๆ ที่เริ่มจากการศึกษาวิจัยนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจรูปแบบใหม่ในห้องปฏิบัติการจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อวัณโรค วิธีย้อม AFB เป็นวิธีที่ง่าย สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่มีค่าความไวต่ำ ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ต้องอาศัยระยะเวลานาน รวมทั้งผลการทดสอบทางชีวเคมีบางครั้งให้ผลไม่แน่นอน ทำให้การวินิจฉัยผิดพลาด ล่าช้า ส่งผลให้การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อเป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ วิธีทางอณูชีววิทยาจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้เป็นตัวช่วยประกอบการวินิจฉัยเบื้องต้นได้ เนื่องจากให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง รวดเร็ว ดังนั้นการเลือกใช้วิธีวินิจฉัยจึงไม่ควรเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเพียงวิธีเดียว เพราะอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการวินิจฉัย ส่งผลทั้งต่อผู้ป่วย และสาธารณสุขของประเทศโดยรวม ทั้งนี้การตัดสินใจเลือกวิธีการที่เหมาะสมสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการนั้นขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น กลุ่มผู้ป่วย ความคุ้มค่าต่อการวินิจฉัยรักษา หรือ ความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน นอกจากวิธีที่เลือกใช้ในการวินิจฉัยแล้ว การเลือกสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมเพื่อเป็นตัวแทนจากบริเวณที่ติดเชื้อ จะช่วยให้การวินิจฉัยวัณโรคมีความถูกต้อง รวดเร็วยิ่งขึ้น นำไปสู่การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อวัณโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Global tuberculosis report [Internet]. World Health Organization. 2016 [cited 9 September 2016]. Available from: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, McHugh TD, Ford N, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. J Infect Dis 2012; 205 Suppl 2: S147-58
3. Cobelens FG, Egwaga SM, van Ginkel T, Muwinge H, Matee MI, Borgdorff MW. Tuberculin skin testing in patients with HIV infection: limited benefit of reduced cutoff values. Clin Infect Dis 2006; 43: 634-9.
4. Revision of the case definition for sputum smear positive pulmonary TB Background document [Internet]. World Health Oraganization. 2016 [cited 11 November 2016]. Available from: http://www.who.int/tb/laboratory/proposal_for_a_revision_of_the_case_definition_of_sputum.pdf
5. Weldu Y, Asrat D, Woldeamanuel Y, Hailesilasie A. Comparative evaluation of a two-reagent cold stain method with Ziehl-Nelseen method for pulmonary tuberculosis diagnosis. BMC Res Notes 2013; 6: 323
6. Reider HL, Deun AV, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trébucq A, et al. Table II.3. Grading scales for bright field (Ziehl-Neelsen) and fluorescence microscopy. In: Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-income countries. 2nd ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union); 2007.
7. Vignesh R, Balakrishnan P, Shankar EM, Murugavel KG, Hanas S, Cecelia AJ, et al. Value of single acid-fast bacilli sputum smears in the diagnosis of tuberculosis in HIV-positive subjects. J Med Microbiol 2007; 56: 1709-10.
8. Simner P, Stenger S, Richter E, Brown-Elliott B, Wallace R, Wengenack N. Mycobacterium: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria*. In: Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, ASM Press, 2015. p. 570-94.
9. Martin A, Cubillos-Ruiz A, Von Groll A, Del Portillo P, Portaels F, Palomino JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 123-7.
10. Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 23 December 2016]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44601/1/9789241501620_eng.pdf
11. New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2008 [cited 23 December 2016]. Available from: http://www.stoptb.org/assets/documents/global/retooling/Diagnostic_Brochure_Print_2009_Jan_29.pdf
12. Wayne LG, Diaz GA, Doubek JR. Acquired isoniazid resistance and catalase activity of myobacteria. Am Rev Respir Dis 1968; 97: 909-13.
13. Wang G, Yu X, Liang Q, Chen S, Wilson S, Huang H. Evaluation of a simple in-house test to presumptively differentiate *Mycobacterium tuberculosis* complex from nontuberculous mycobacteria by detection of p-nitrobenzoic acid metabolites. PloS one 2013; 8: e80877
14. Standard Operating Procedure (SOP) Growth on PNB medium [Internet]. Stoptb.org. 2016 [cited 1 November 2016]. Available from: http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/36_growth_on_pnb_fin.doc
15. Pradhan P. Tween 80 hydrolysis test [Internet]. Microbiology and Infectious Diseases. 2016 [cited 9 September 2016]. Available from: http://microbesinfo.com/2015/03/tween-80-hydrolysis-test/

16. Acharya T. Key biochemical methods used to distinguish Mycobacterial group [Internet]. www.microbeonline.com. 2013 [cited 9 September 2016]. Available from: http://microbeonline.com/key-biochemical-methods-used-to-distinguish-mycobacterial-group/
17. Urease Test [Internet]. Austincc.edu. 2016 [cited 9 September 2016]. Available from: http://www.austincc.edu/microbugz/urease_test.php
18. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1974; 109: 147–51.
19. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
20. CLSI. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard–2nd ed. CLSI document M24–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
21. O'Grady J, Maeurer M, Mwaba P, Kapata N, Bates M, Hoelscher M, et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis. Curr Opin Pulm Med 2010; 17: 134-41.
22. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, Marais B, McHugh TD, Ford N, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. J Infect Dis. 2012; 205 Suppl 2: S147-58.
23. Gazi MA, Islam MR, Kibria MG, Mahmud Z. General and advanced diagnostic tools to detect *Mycobacterium tuberculosis* and their drug susceptibility: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 851-61
24. Desikan P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: is it still relevant? Indian J Med Res 2013; 137: 442-4.
25. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis 2006; 6: 570-81.
26. Rawat J, Biswas D, Sindhwani G, Masih V. An alternative 1-day smear microscopy protocol for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Respirology 2010; 15: 1127-30.
27. Strategic and technical advisory group for tuberculosis: Report of the 9th meeting [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2009 [cited 23 December 2016]. Available from: http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2009.pdf.
28. Lin SY, Desmond E, Bonato D, Gross W, Siddiqi S. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol 2009; 47: 3630-4.
29. DeLand FH, Wagner HN, Jr. Early detection of bacterial growth, with carbon-14-labeled glucose. Radiology 1969; 92: 154-5.
30. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, Larsh HW, Lindner TH, McClatchy JK, et al. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear-positive specimens. J Clin Microbiol 1983; 18: 689-96
31. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 2004; 42: 2321-5.
32. Siddiqi SH, Laszlo A, Butler WR, Kilburn JO. Bacteriologic investigations of unusual mycobacteria isolated from immunocompromised patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 16: 321-3.

33. Ferrara G, O'Grady J, Zumla A, Maeurer M. Xpert MTB/RIF test for tuberculosis. Lancet 2011; 378: 482-3.

34. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. J of Clin Microbiol 2010; 48: 2495-501.

35. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010; 363: 1005-15.

36. INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 from Fujirebio Europe. A line probe assay for the simultaneous detection and identification of the genus *Mycobacterium* and 16 different mycobacterial species [Internet]. Fujirebio-europe.com. 2016 [cited 9 September 2016]. Available from: https://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/inno-lipar-mycobacteria-v2

37. MOLECULAR LINE PROBE ASSAYS FOR RAPID SCREENING OF PATIENTS AT RISK OF MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS (MDR-TB) [Internet]. www.who.int. 2008 [cited 9 September 2016]. Available from: http://www.who.int/tb/features_archive/expert_group_report_june08.pdf

38. GenoType *Mycobacterium* CM | Detection and differentiation of clinically relevant NTM [Internet]. Hain-lifescience.de. 2016 [cited 9 September 2016]. Available from: http://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html

39. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 2616-22.

40. Brady MF, Coronel J, Gilman RH, Moore DA. The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. J Vis Exp 2008; 18. e845. PubMed PMID: 19066507.

41. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med 2006; 355: 1539-50.

42. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, Sheen P, Spellman E, Lee EH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. J Clin Microbiol 2000; 38: 1203-8.

43. Wang L, Mohammad SH, Chaiyasirinroje B, Li Q, Rienthong S, Rienthong D, et al. Evaluating the Auto-MODS assay, a novel tool for tuberculosis diagnosis for use in resource-limited settings. J Clin Microbiol 2015; 53: 172-8.

44. Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. Lancet 2010; 375: 1920-37.

45. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. Lancet 2011; 378: 57-72.

46. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Microbiol Rev 2014; 27: 3-20.

47. Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, Metcalfe JZ, Date A, Coleman C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. J Acquir Immune Defic Syndr 2010; 56: 230-8.

48. Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon-gamma release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? Clin Microbiol Infect 2011; 17: 806-14.

49. Lawn SD. Point-of-care detection of lipoarabinomannan (LAM) in urine for diagnosis of HIV-associated tuberculosis: a state of the art review. BMC Infect Dis 2012; 12: 103. PubMed PMID: 22536883.

50. Shah M, Variava E, Holmes CB, Coppin A, Golub JE, McCallum J, et al. Diagnostic accuracy of a urine lipoarabinomannan test for tuberculosis in hospitalized patients in a High HIV prevalence setting. J Acquir Immune Defic Syndr 2009; 52: 145-51

51. The use of lateral flow urine lipoarabinomannan assay (LF-LAM) for the diagnosis and screening of active tuberculosis in people living with HIV [Internet]. Apps.who.int. 2015 [cited 9 September 2016]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193633/1/9789241509633_eng.pdf?ua=1&ua=1

52. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, et al. Dominant TNF-alpha+ *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. Nat Med 2010; 17: 372-6.

53. Streitz M, Tesfa L, Yildirim V, Yahyazadeh A, Ulrichs T, Lenkei R, et al. Loss of receptor on tuberculin-reactive T-cells marks active pulmonary tuberculosis. PLoS One 2007; 2: e735. PubMed PMID: 17710135.

54. Harari A, Rozot V, Bellutti Enders F, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, et al. Dominant TNF-alpha+ *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. Nat Med 2011; 17: 372-6 .

55. Rozot V, Patrizia A, Vigano S, Mazza-Stalder J, Idrizi E, Day CL, et al. Combined use of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 and CD8 T-cell responses is a powerful diagnostic tool of active tuberculosis. Clin Infect Dis 2015; 60: 432-7.

56. Mole RJ, Maskell TWOC. Phage as a diagnostic – the use of phage in TB diagnosis. J Chem Technol Biotechnol 2001; 76: 683-8.

57. Fu X, Ding M, Zhang N, Li J. Mycobacteriophages: an important tool for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (review). Mol Med Rep 2015; 12: 13-9.

58. Intorasoot S, Tharinjaroen CS, Phunpae P, Butr-Indr B, Anukool U, Intachai K, et al. Novel potential diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis* complex using combined immunomagnetic separation (IMS) and PCR-CTPP. J Appl Microbiol 2016; 121: 528-38.

59. Tharinjaroen CS, Intorasoot S, Anukool U, Phunpae P, Butr-Indr B, Orrapin S, et al. Novel targeting of the lepB gene using PCR with confronting two-pair primers for simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium bovis*. J Med Microbiol 2016; 65: 36-43.

60. Carroll K and Patel R. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington: ASM Press; 2015.

61. Lotz A, Ferroni A, Beretti J, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2010; 48: 4481-6.

62. Ikryannikova L, Afanas'ev M, Akopian T, Il'ina E, Kuz'min A, Larionova E, et al. Mass-spectrometry based minisequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol Methods 2007; 70: 395-405.