Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจการติดเชื้อวัณโรคอย่างเร็ว โดยการตรวจสารแกมมาอินเตอร์เฟอรอน ในตัวอย่างเลือด

โสภา ศรีสังข์งาม* **จณิศรา ฤดีเอนกสิน***
สุปราณี บุญชู* **ธนิดา เหรียญทอง****
รณยุทธ์ นรรัตน์** **ภวงศ์ศักดิ์ เหรียญไตรรัตน์****
อริสา ศรีมุษิกโพธิ์** **ยุทธิชัย เกษตรเจริญ****
เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ*

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*
***สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค*

บทคัดย่อ การวินิจฉัยวัณโรคได้อย่างถูกต้องรวดเร็วมีความสำคัญต่อการควบคุมวัณโรค กระบวนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อวัณโรค จะมีการผลิตสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (IFN-γ) ที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อวัณโรค สามารถตรวจวัดปริมาณสาร IFN-γ ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบ QuantiFERON-TB จากการศึกษาในกลุ่มประชากร 130 ราย ได้แก่ กลุ่มผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยจากอาการและประวัติเป็นผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรค 60 ราย พบว่าจำนวน 50 รายมีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml บ่งชี้เป็นผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อ กลุ่มผู้สัมผัสโรคซึ่งมีผู้ป่วยร่วมบ้าน 50 ราย พบว่าจำนวน 14 ราย มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml บ่งชี้เป็นผู้ติดเชื้อไม่มีอาการ และในกลุ่มกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านส่วนหนึ่งเป็นชาวต่างชาติ จำนวน 2 ใน 20 ราย มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml ตรวจสอบคุณภาพของการวิเคราะห์จากสารละลาย IFN-γ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 4.0, 1.0, 0.25 และ 0 IU/ml ซึ่งใช้สร้างเส้นกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่มีการวิเคราะห์ มีค่าเฉลี่ย OD_{450} 0.930, 0.271, 0.103 และ 0.045 ตามลำดับ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ โดยเกณฑ์มาตรฐานของชุดทดสอบกำหนดว่าสารละลาย IFN-γ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 4.0 IU/ml จะต้องมีค่า $OD_{450} \geq 0.600$ และที่ 0 IU/ml มีค่า ≤ 0.150 วิธีการนี้ช่วยวินิจฉัยวัณโรค สามารถตรวจการติดเชื้อวัณโรคในผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อและผู้ติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ โดยการตรวจตัวอย่างเลือดได้ผลตรวจรวดเร็วมาก

คำสำคัญ: **วัณโรค, QuantiFERON-TB, IFN-gamma**

บทนำ

วัณโรค (tuberculosis, TB) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังเกิดจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียม ทูเบอร์คูโลซิส (*Mycobacterium tuberculosis*) ติดต่อง่ายทางการหายใจ ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพ ความรังเกียจหรือกลัวการติดต่อ ผู้ป่วยสูญเสียสถานะทางสังคมและการยอมรับ ซึ่งมีผลต่อกระทบสุขภาพจิตและสังคม จัดเป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของโลกและของ

ประเทศ[1,2]

ในผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อวัณโรค ระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์จะมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อวัณโรค ผู้ติดเชื้อวัณโรคส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ (latent infection) เนื่องจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ ไม่สามารถแพร่เชื้อสู่บุคคลอื่นได้ แต่มีเชื้อแฝงอยู่ในร่างกาย ซึ่งอาจก่อโรคได้เมื่อภูมิคุ้มกันบกพร่อง[3-5] การตรวจการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต่อเชื้อวัณโรค เพื่อตรวจการติดเชื้อหรือการป่วยเป็นวัณโรค ปัจจุบันตรวจโดยการฉีดแอนติเจน Purified protein derivative (PPD) เข้าใต้ผิวหนัง (tuberculin skin test, TST)[6] ซึ่ง PPD เป็นแอนติเจนที่เป็นโปรตีนพบในเชื้อมัยโคแบคทีเรียทั่วไป รวมทั้งเชื้อวัณโรค *(Mycobacterium tuberculosis)* และเชื้อ *Mycobacterium bovis* BCG ที่ใช้ทำวัคซีนป้องกันวัณโรค BCG ทำให้การทดสอบวิธีนี้มีความจำเพาะต่อวัณโรคต่ำ ผลการทดสอบที่ให้ผลบวกอาจแยกไม่ได้ว่ามีการติดเชื้อหรือป่วยเป็นวัณโรค หรือติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นที่ก่อโรค เนื่องจากมีปฏิกิริยาร่วมของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนในผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่น เช่นเดียวกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเมื่อได้รับวัคซีนป้องกันวัณโรค BCG[7-12]

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์ต่อการติดเชื้อวัณโรคจะมีการผลิตสารแกมมาอินเตอร์เฟอรอน (IFN-γ)[13] ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อวัณโรคเพิ่มขึ้นในระดับต่าง ๆ เพื่อการกำจัดเชื้อที่เข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นจึงศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสาร IFN-γ โดยวิเคราะห์ในหลอดทดลองเพื่อตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยวัณโรคในระยะแพร่เชื้อ การศึกษาวิจัยในต่างประเทศและรายงานวิจัยหลายฉบับ กล่าวถึงการตรวจการติดเชื้อวัณโรคโดยตรวจสาร IFN-γ จากตัวอย่างเลือด[14-17] ยังไม่มีการศึกษารายงานในประเทศไทย การตรวจวัดสาร IFN-γ ในตัวอย่างเลือดด้วย QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-G-IT) เป็นการวิเคราะห์ในหลอดทดสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยตรวจวัดสาร IFN-γ ที่สร้างจากเซลล์ T-lymphocytes เมื่อมีการกระตุ้นเซลล์ให้สร้าง IFN-γ โดยใช้แอนติเจนประกอบด้วยเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ซึ่งสังเคราะห์จากส่วนของยีนบริเวณ RD1 และแอนติเจน TB 7.7 (Rv2654) ซึ่งสังเคราะห์จากบริเวณ RD11 ของ chromosomal DNA ของเชื้อวัณโรค แอนติเจนเหล่านี้ไม่พบในเชื้อ *Mycobacterium bovis BCG* ที่ใช้ทำวัคซีน BCG และเชื้อ*มัยโคแบคทีเรีย*อื่น ยกเว้นเชื้อ *Mycobacterium kansasii, Mycobacterium szulgai,* และ *Mycobacterium marinum*[20,21] การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรายงานผลการตรวจการติดเชื้อวัณโรคโดยตรวจสาร IFN-γ ในตัวอย่างเลือด ระดับสาร IFN-γ และผลการตรวจการติดเชื้อวัณโรค ด้วย QFT-G-IT ในกลุ่มประชากรต่าง ๆ สามารถตรวจการติดเชื้อวัณโรคด้วย QFT-G-IT ตามข้อแนะนำการใช้ QFT-G-IT ตรวจวินิจฉัยวัณโรคของศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา โดยไม่ครอบคลุมการวิเคราะห์ความถูกต้อง (accuracy) หรือความน่าเชื่อถือ (reliability) ของการตรวจวัณโรคโดยใช้ชุดตรวจนี้

วิธีการศึกษา

กลุ่มประชากรศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดตรวจวิเคราะห์ ในกลุ่มประชากรศึกษา 3 กลุ่ม รวมจำนวน 130 ตัวอย่าง แบ่งเป็นกลุ่มผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยจากอาการและประวัติเป็นผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรค จำนวน 60 ราย เป็นผู้ป่วยที่มาติดต่อกับสำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค ได้รับการตรวจวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะเป็นผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ที่ยังไม่ได้รับการรักษา ไม่มีประวัติเคยเป็นวัณโรคและไม่เคยได้รับการรักษาวัณโรคมาก่อน ไม่มีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นเมื่อเก็บตัวอย่างเลือด กลุ่มผู้สัมผัสโรคซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน จำนวน 50 ราย เป็นกลุ่มผู้เสี่ยงต่อการติดเชื้อ โดยอยู่ร่วมบ้านกับ

ผู้ป่วยวัณโรครายใหม่ที่เข้าร่วมศึกษาวิจัย กำหนดให้ผู้สัมผัสโรคอยู่ร่วมบ้านกับผู้ป่วยหรือผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยวัณโรคนานติดต่อกันไม่น้อยกว่า 30 วัน กลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการแสดงและไม่มีประวัติมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านหรือชาวต่างชาติ จำนวน 20 ราย เป็นผู้มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีอาการป่วยใดขณะเก็บตัวอย่าง และมีการติดต่อกับห้องปฏิบัติการมัยโคแบคทีเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด คัดเลือกผู้เข้าร่วมโครงการที่มีความสมัครใจ และต้องการทราบผลเพื่อตรวจร่างกาย มีการชี้แจงวิธีการปฏิบัติให้ทราบ และลงลายมือชื่อให้เก็บตัวอย่างเลือดตรวจด้วย QFT-G-IT

ตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสมา

เก็บตัวอย่างเลือดครั้งเดียว โดยเจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่รับผิดชอบและชำนาญการ ปริมาณเลือดที่เก็บประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพิเศษสำหรับเก็บเลือด ซึ่งมีหลอด TB antigen ในหลอดมีแอนติเจนเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6, CFP-10 และ TB7.7 ที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค (TB specific antigen) หลอดควบคุม Mitogen ในหลอดมีแอนติเจน Mitogen (non specific antigen) ที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อเป็น positive control ผลวิเคราะห์ของหลอด Mitogen จะช่วยในการแปลผลเกี่ยวกับสภาวะภูมิคุ้มกันทั่วไป การจัดเก็บและการบ่มตัวอย่างเลือดถูกวิธีหรือไม่ และหลอดควบคุม nil (nil control) ในหลอดไม่มีแอนติเจนใด เป็น negative control ใส่เลือดในหลอดเลือดทั้ง 3 หลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร นำหลอดเลือดทั้งหมดบ่มในตู้บ่มที่ไม่มีแสงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ถึง 24 ชั่วโมง แอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคจะกระตุ้นให้เซลล์ T-lymphocyte ของผู้ป่วยหรือผู้มีการติดเชื้อวัณโรคมีการสร้างและหลั่งสาร IFN-γ ออกมา จากนั้นนำหลอดเลือดมาปั่นแยกซีรั่มหรือพลาสมา โดยนำหลอดเลือดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 g เป็นเวลา 15-20 นาที ดูดส่วนที่เป็นพลาสมาหรือซีรั่มใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยเก็บตัวอย่างแยกหลอด ตัวอย่างที่ถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร IFN-γ ขณะส่งเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส การรอรวมส่งตัวอย่างเก็บหลอดพลาสมาหรือซีรั่มไว้ที่มีอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 8 สัปดาห์ สำหรับการเก็บตัวอย่างรอส่งตรวจวิเคราะห์นานกว่า 8 สัปดาห์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการตรวจหาสาร IFN-γ ต่อเชื้อวัณโรค

การตรวจหา IFN-γ ต่อเชื้อวัณโรคใช้เทคนิค ELISA เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับสาร IFN-γ ในซีรั่มหรือพลาสมา อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสาร IFN-γ และแอนติเจนของชุดทดสอบ QFT-G-IT โดยเติมซีรั่มหรือพลาสมาที่แยกได้จากตัวอย่างเลือดและเติม conjugate ตามคู่มือการวิเคราะห์ของผู้ผลิต ใช้สารละลาย IFN-γ มาตรฐาน (standard control) ที่ทราบความเข้มข้นในชุดทดสอบเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ วิเคราะห์ใน microplate โดยในแต่ละหลุมของ microplate เกิดการจับกันของสาร IFN-γ ในซีรั่มหรือพลาสมาและแอนติเจน ภายหลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ล้างแอนติเจนส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาด้วยน้ำยาล้าง การตรวจสอบปฏิกิริยาทำโดยเติมสารตั้งต้นบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลีกเลี่ยงการถูกแสง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสาร IFN-γ และแอนติเจนมีเอนไซม์ย่อยสารตั้งต้นทำให้เกิดผลผลิตมีสีน้ำเงิน ภายหลังหยุดปฏิกิริยาสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง ทำการวัดปริมาณของผลผลิตจากปฏิกิริยาที่เกิดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 620 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสาร IFN-γ แปรผันโดยตรงกับความเข้มของสีที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ปริมาณ IFN-γ ในตัวอย่าง โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสาร IFN-γ ที่ความเข้มข้น 4.0, 1.0, 0.25 และ 0 หน่วย IU/ml (International Unit/มิลลิลิตร) และค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น

450 nm

การคำนวณหาระดับ IFN-γ จากค่า OD

ค่าเฉลี่ยของค่า OD ของสารละลาย IFN-γ มาตรฐานซึ่งวิเคราะห์ 2 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของสาร IFN-γ ในตัวอย่าง โดยสร้างกราฟ log (e) - log (e) ซึ่งมีค่า mean OD อยู่ในแกน Y และค่าความเข้มข้นของสาร IFN-γ (IU/ml) อยู่ในแกน X ค่าความเข้มข้นของสาร IFN-γ (IU/ml) ของตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสมาคำนวณได้จากการเปรียบเทียบค่า OD ของกราฟมาตรฐานกับค่า OD ของตัวอย่างซีรั่มหรือพลาสมาของผู้ป่วย

วิเคราะห์สารละลาย IFN-γ มาตรฐานและสร้างกราฟทุกครั้งของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ สารละลาย IFN-γ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 4 IU/ml จะต้องมีค่า OD ≥ 0.600 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร และสารละลาย IFN-γ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 IU/ml มีค่า ≤ 0.150 ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

การแปลผลการทดสอบ

วิเคราะห์ระดับสาร IFN-γ และแปลผลการตรวจวิเคราะห์เป็นผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อวัณโรคโดยใช้เกณฑ์การตัดสินตามข้อบ่งชี้ของชุดทดสอบ QFT-G-IT (ตารางที่ 1) ผู้ที่ติดเชื้อให้ผลตรวจ QFT-G-IT เป็นบวก จะมีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml ผู้ที่มีระดับสาร IFN-γ น้อยกว่า 0.35 IU/ml ผลตรวจ QFT-G-IT เป็นลบ เป็นผู้ไม่ติดเชื้อวัณโรค

ใช้สถิติเชิงพรรณาในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการศึกษา

ระดับสาร IFN-γ

จำนวนตัวอย่างเลือดที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย QFT-IT-G รวม 130 ตัวอย่าง จากการตรวจวิเคราะห์ข้อมูลระดับสาร IFN-γ พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการบ่งชี้ได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรค จำนวน 60 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจพบระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml จำนวน 50 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 83.33 กลุ่มผู้สัมผัสโรคซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน จำนวน 50 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจพบระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 28 และในกลุ่มผู้ซึ่งไม่มีอาการไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านหรือชาวต่างชาติ จำนวน 20 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจพบระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml จำนวน 2

ตารางที่ 1 การแปลผลของการตรวจวิเคราะห์เป็นผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อวัณโรคจากระดับสาร IFN-γ

Nil (IU/ml)	TB Antigen minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)	QuantiFERON® -TB (IU/ml)	Report / Interpretation
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5		*M. tuberculosis*
	≥ 0.35 and < 25% of nil value	≥ 0.5	**Negative**	infection NOT likely
	≥ 0.35 and ≥ 25% of nil value	Any	**Positive**	*M. tuberculosis* infection likely
	< 0.35	< 0.5	**Indeterminate**	Results are indeterminate
	≥ 0.35 and < 25% of nil value	< 0.5		for TB-Antigen responsiveness
> 8.0	Any	Any		

หมายเหตุ *IU/ml มาจาก International Unit/มิลลิลิตร เป็นหน่วยวัดความเข้มข้นของสาร IFN-γ*

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่างในกลุ่มประชากรต่าง ๆ ที่ให้ผลตรวจวิเคราะห์ด้วย QFT-G-IT เป็นบวกและลบ (มีระดับสาร IFN-γ สูงและต่ำกว่า 0.35 IU/ml ตามลำดับ)

ระดับสาร IFN-γ (IU/ml)	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)
> 0.35	**ผลบวก**
กลุ่มผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรควินิจฉัยจากอาการและประวัติ	50 (83.33)
กลุ่มผู้สัมผัสโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน	14 (28.00)
กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน	2 (10.00)
< 0.35	**ผลลบ**
กลุ่มผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรควินิจฉัยจากอาการและประวัติ	10 (16.67)
กลุ่มผู้สัมผัสโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน	36 (72.00)
กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน	18 (90.00)

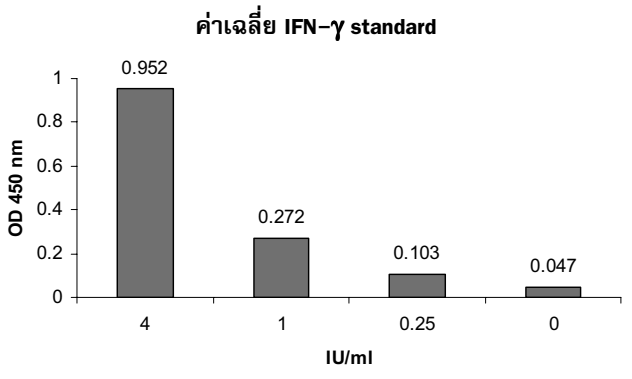
ตารางที่ 3 ระดับสาร IFN-γ ของผู้ติดเชื้อวัณโรคในกลุ่มในประชากรต่าง ๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วย QFT-G-IT

กลุ่มผู้ติดเชื้อ	กลุ่มผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรควินิจฉัยจากอาการและประวัติ	กลุ่มผู้สัมผัสโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน	กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงและไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน
ระดับสาร IFN-γ			
> 0.350 IU/ml			
0.350 - 0.700	4	1	-
0.701 - 1.000	4	1	1
1.001 - 2.000	8	7	-
2.001 - 5.000	13	-	-
5.001 - 7.000	4	1	-
7.001 - 10.000	6	1	-
> 10.000	11	3	1
รวมผู้ติดเชื้อ	**50**	**14**	**2**

ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 (ตารางที่ 2)

จากเกณฑ์การแปลผลตามข้อกำหนดของชุดตรวจ QFT-G-IT ดังตารางที่ 1 ผู้ที่มีระดับสาร IFN-γ เกินกว่า 0.35 IU/ml ผลตรวจ QFT-G-IT เป็นบวก เป็นผู้ติดเชื้อวัณโรค ดังนั้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอาการได้รับการวินิจฉัยจากอาการและประวัติเป็นผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรค จำนวน 60 คน จำนวน 50 ใน 60 คน มีระดับสาร IFN-γ เกินกว่า 0.35 IU/ml ยืนยันมีการติดเชื้อวัณโรค ในกลุ่มผู้สัมผัสโรคซึ่งมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน จำนวน 14 ใน 50 คน มีระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml บ่งชี้เป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคซึ่งไม่แสดงอาการ และในกลุ่มซึ่งไม่มีอาการไม่มีประวัติมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านหรือเป็นชาวต่างชาติ จำนวน 2 ใน 20 ตัวอย่าง พบระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml สรุปผลเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคเช่นเดียวกัน

ในกลุ่มผู้ติดเชื้อวัณโรคทั้งหมดทั้งกลุ่มผู้ป่วยหรือผู้-



รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ย OD ที่ 450 nm ของ IFN-γ standard จำนวน 42 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 4, 1, 0.25 และ 0 IU/ml

สงสัยเป็นวัณโรค ผู้สัมผัสโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านและผู้มีสุขภาพแข็งแรง ซึ่งมีระดับสาร IFN-γ มากกว่า 0.35 IU/ml มีการกระจายของระดับสาร IFN-γ แสดงในตารางที่ 3 ผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่มีระดับ IFN-γ สูงมาก จำนวน 34 ใน 50 คน มีระดับ IFN-γ สูงกว่า 2.0 IU/mlในขณะที่กลุ่มผู้สัมผัสโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านและกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรงที่มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 2.0 IU/ml มีจำนวน 5 ใน 50 และ 1 ใน 20 ราย ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

คุณภาพการตรวจวิเคราะห์

การตรวจสาร IFN-γ ด้วย QFT-G-IT เป็นการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ ค่าเฉลี่ย OD ของ standard control ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ จากการค่าเฉลี่ย OD ของ standard control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าระดับ OD ของ standard control อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ของชุดทดสอบ โดยมีค่าเฉลี่ย OD ของ standard control ที่ความเข้มข้น 4, 1, 0.25, 0 IU/ml เท่ากับ 0.952, 0.272, 0.103 และ 0.047 ตามลำดับ (รูปที่ 1) โดยเกณฑ์มาตรฐานของชุดทดสอบกำหนดว่าสารละลาย IFN-γ มาตรฐานที่ความเข้มข้น 4.0 IU/ml จะต้องมีค่า $OD_{450} \geq 0.600$ และที่ 0 IU/ml มีค่า ≤ 0.150

วิจารณ์

การตรวจวัณโรคด้วยชุดตรวจ QuantiFERON-TB Gold-In tube (QFT-G-IT) เป็นการตรวจการติดเชื้อวัณโรคจากการตรวจวัดระดับสาร IFN-γ ที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค แอนติเจนหลายชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคของชุดทดสอบ จะกระตุ้นการสร้างสาร IFN-γ ที่จำเพาะจาก T-lymphocyte ในระดับที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อวัณโรค มีการศึกษาในต่างประเทศ และมีการใช้การตรวจระดับสาร IFN-γ ของชุดตรวจนี้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค โดยมีความไวในการตรวจวิเคราะห์แตกต่างกัน[15,17,22,23] Lee และคณะรายงานความไวในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วย QFT-G-IT ในผู้ป่วยระยะแพร่เชื้อร้อยละ 89[24] และ 83 ตามรายงานการศึกษาของ Chee และคณะ[25] การใช้ชุดตรวจนี้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคมีแพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากตรวจวัณโรคได้จากเลือด ให้ผลตรวจรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง เป็นชุดตรวจวัณโรคที่ได้รับการรับรองโดย FDA สหรัฐอเมริกาใน ค.ศ. 2007

การศึกษานี้รายงานการตรวจวัณโรคโดยการตรวจระดับสาร IFN-γ ด้วย QFT-G-IT ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษาและไม่มีการใช้ชุดตรวจวัณโรค QFT-G-IT มาก่อนในประเทศไทย สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยมีผลตรวจสอบคุณภาพได้เกณฑ์มาตรฐาน นอกจากนี้ได้รายงานระดับสาร IFN-γที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคในกลุ่มประชากรต่าง ๆ การวิเคราะห์ความถูกต้อง (accuracy) หรือความน่าเชื่อถือ (reliability) ของการตรวจวัณโรคโดยใช้ชุดตรวจนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อ โดยมีการเปรียบเทียบผลตรวจวินิจฉัยวัณโรคกับวิธีการอื่น เช่น การย้อมเชื้อติดสีทนกรด และการเพาะเชื้อ เป็นต้น Connell และคณะได้รายงานผลการตรวจสอบความถูกต้องของการตรวจวิเคราะห์ด้วย QFT-G-IT[14] อย่างไรก็ตามผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่มีผลตรวจไม่พบเชื้อย้อมติดสีทนกรดในเสมหะ (smear negative) และเพาะเชื้อไม่ขึ้น (TB-culture negative) และหนึ่งในสามของผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับการรักษาโดยทั่วไปไม่มีผลเพาะเชื้อ

วัณโรค[26] ส่วนผู้ป่วยวัณโรคที่ให้ผลตรวจ QFT-G-IT เป็นลบ มักพบในผู้ป่วยวัณโรคที่มีความผิดปรกติของระบบภูมิคุ้มกัน และพบในรายที่ผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องซึ่งเป็นวัณโรคระยะแพร่เชื้อร่วมด้วย เนื่องจากวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ช่วยวินิจฉัยวัณโรคได้ผลรวดเร็ว มีความสำคัญและเป็นที่ต้องการ โดยเฉพาะสำหรับผู้ป่วยวัณโรคที่วินิจฉัยยากซึ่งมีจำนวนมากเหล่านี้ การตรวจการติดเชื้อวัณโรคด้วย QFT-G-IT เป็นวิธีการใหม่ เมื่อนำ QFT-G-IT มาใช้ในการตรวจวัณโรคในประเทศไทย ควรศึกษาในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะการศึกษาผลการตรวจและระดับสาร IFN-γ ในกลุ่มประชากรที่สำคัญ เช่น กลุ่มผู้ป่วยวัณโรคปอด กลุ่มผู้สัมผัสผู้ป่วยซึ่งเสี่ยงต่อการติดเชื้อ และกลุ่มประชากรทั่วไป เป็นต้น เพื่อพิจารณาเลือกใช้ ซึ่งข้อบ่งใช้อาจนำมาใช้ร่วมกับวิธีการตรวจอื่น ใช้ร่วมกับหรือใช้ทดแทนวิธี PPD skin test ในปัจจุบัน เพื่อช่วยให้วินิจฉัยวัณโรคได้ผลถูกต้อง รวดเร็วยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์ระดับสาร IFN-γ ในการตรวจวัณโรคด้วย QFT-G-IT ชุดตรวจได้กำหนดระดับสาร IFN-γ ที่ค่า ≥ 0.35 IU/ml เป็นผู้ติดเชื้อวัณโรค ซึ่งค่ากำหนดนี้ทำให้ความไวและความจำเพาะในการตรวจการติดเชื้อวัณโรคของชุดตรวจนี้มีค่าสูงสุด ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกกลุ่มประชากรศึกษาต่าง ๆ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยหรือสงสัยเป็นวัณโรควินิจฉัยจากอาการและประวัติ กลุ่มผู้สัมผัสผู้ป่วยที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงซึ่งไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านหรือชาวต่างชาติ ผู้ป่วยวัณโรคหรือสงสัยเป็นวัณโรคได้รับการวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกและประวัติ ไม่มีผลตรวจยืนยันวัณโรคโดยการเพาะเชื้อ ผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่ 50 ใน 60 ราย (83.33%) มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml และค่าเฉลี่ยของระดับสาร IFN-γ ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคหรือสงสัยเป็นวัณโรคที่ทำการศึกษาวิจัยนี้มีค่า IU/ml สูงกว่าค่า 0.35 IU/ml ที่ใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินเป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคมากโดยมีค่าเฉลี่ย 5.217 IU/ml มีผู้ป่วยจำนวน 4 ราย มีค่า IFN-γ สูงจนเกินระดับวัดได้ (> 20 IU/ml) ในกลุ่มผู้ป่วยวัณโรคหรือผู้สงสัยเป็นวัณโรคที่ได้รับการวินิจฉัยจากอาการว่าเป็นวัณโรค ตรวจพบจำนวน 10 ใน 60 ราย (16.67%) มีระดับสาร IFN-γ ในระดับต่ำกว่า 0.35 IU/ml และมีค่าเฉลี่ยของระดับสาร 0.016 IU/ml ควรมีการตรวจยืนยันโดยการเพาะเชื้อ เพื่อการวินิจฉัยสุดท้ายเป็นผู้ป่วยวัณโรคจำนวนกี่รายหรือมีการติดตามผู้ป่วยต่อไป

การใช้ QFT-G-IT ตรวจการติดเชื้อในกลุ่มผู้สัมผัสโรคโดยมีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านซึ่งเป็นประชากรกลุ่มเสี่ยง กลุ่มผู้สัมผัสโรคที่มีระดับสาร IFN-γ สูงเกินกว่า 0.35 IU/ml บ่งชี้เป็นผู้ติดเชื้อวัณโรคที่ยังไม่แสดงอาการ แต่ไม่จัดว่าเป็นกลุ่มเสี่ยงในการแพร่โรค เนื่องจากอยู่ในภาวะติดเชื้อควรมีการตรวจติดตามผู้ติดเชื้อกลุ่มเสี่ยงนี้ในการควบคุมโรคต่อไป ผู้สัมผัสวัณโรคที่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้านส่วนใหญ่มีระดับสาร IFN-γ น้อยกว่า 0.35 IU/ml (36 ใน 50 ราย) ในกลุ่มผู้มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีผู้ป่วยวัณโรคร่วมบ้าน มี 2 ใน 20 ราย ที่มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml อาจมีการสัมผัสโรคจากแหล่งอื่นที่ไม่มีผู้ป่วยร่วมบ้าน ซึ่งมีโอกาสมาก เนื่องจากประเทศไทยมีผู้ป่วยและผู้ติดเชื้อวัณโรคจำนวนมาก กลุ่มควบคุมที่ดีควรเป็นกลุ่มประชากรที่ไม่เคยมีการสัมผัสโรคโดยอาศัยในพื้นที่ไม่มีปัญหาวัณโรค อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าผู้ป่วยวัณโรคส่วนใหญ่มีระดับสาร IFN-γ สูงกว่า 0.35 IU/ml มาก ผลตรวจยืนยันโดยการเพาะเชื้อจะนำมาวิเคราะห์ในการสรุปผลวินิจฉัยเปรียบเทียบกับผลตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อวัณโรคและแยกผู้ป่วยระยะแพร่โรคจากผู้ติดเชื้อไม่แสดงอาการและผู้ไม่ติดเชื้อ โดยใช้ร่วมกับการตรวจอาการหรือการตรวจทางคลินิกอื่น ๆ

เนื่องจากตัวอย่างตรวจเป็นเลือดและวิธีการให้ผลตรวจรวดเร็ว การใช้วิธีการนี้น่าจะมีประโยชน์โดยช่วยวินิจฉัยวัณโรคปอดเมื่อต้องการผลตรวจยืนยันที่รวดเร็วและมีความจำเพาะสูง ในรายที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเสมหะได้ เช่น ในรายผู้ป่วยวัณโรคเด็ก หรือใช้เป็นเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยวัณโรคนอก

ปอดซึ่งยากต่อการวินิจฉัย โดยใช้ร่วมกับการตรวจอาการหรือการตรวจทางคลินิกอื่น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่สาธารณสุขที่ช่วยดำเนินการเก็บตัวอย่าง ผู้ร่วมมือให้ตัวอย่างในการวิจัยทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดีและขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. TB-a global emergency. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1994.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control surveillance, planning, financing, 2008. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
3. Daniel T. The immunology of tuberculosis. Clin Chest Med 1980; 1:189-201.
4. Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995; 273:220-6.
5. Broekmans JF, Migliori GB, Rieder HL, Lees J, Ruutu P, Loddenkemper R, et al. European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence: recommendations of the World Health Organization (WHO), International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) and Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV) Working Group. Eur Respir J 2002; 19:765-75.
6. Lein D, Reyn FV. In vitro cellular and cytokine responses to mycobacterial antigen: application to diagnosis of tuberculosis infection and assessment of response to mycobacterial vaccines. Am J Med Sci 1997; 313:364-71.
7. Harboe M. Antigens of PPD, old tuberculin and autoclaved *Mycobacterium bovis* BCG studied by crosses immunoelectrophoresis. Am Rev Respir Dis 1981; 124:80-7.
8. Snider D. The tuberculin skin test. Am Rev Respir Dis 1982; 125(Suppl.):108-18.
9. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification or tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1990; 142:725-35.
10. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1376-95.
11. Desem N, Jones SL. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5:531-6.
12. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17:968-75.
13. Fenton M, Vermeulen M, Kim S, Burdick M, Strieter R, Kornfeld H. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis.* Infect Immun 1997; 65:5149-56.
14. Connell TG, Rangaka MX, Curtis N, Wilkinson RJ. QuantiFERON-TB Gold : state of the art for the diagnosis of tuberculosis infection ? Expert Rev Mol Diag 2006; 6:663-7.
15. Pai M, Menzeis D. Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis ? Clin Infect Dis 2007; 44:74-7.
16. Pai M, Zwerling A, Menzeis D. Systematic review, t-cell based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Am Intern Med 2008; 149:177-84.
17. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12:491-6.
18. Mustafa AS, Amoudy AH, Wilker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F, et al. Comparison of antigen specific T cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis.* Scand J Immunol 1998; 48:535-43.
19. Brock I, Weldingh K, Leyten EM, Arend SM, Ravn P, Andersen P. Specific T-cell epitope for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Clin Microbiol 2004; 42:2379-87.
20. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356:1099-104.
21. Mori T, Sakatani M, Yamagushi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection with an interferon -gamma assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170:59-64.
22. Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Lange C, Mengoni F, Mastroianni C, et al. Response to RD1 selected epitopes is associated to active tuberculosis. Results of a European multicentre hospital-based study: interim analysis of a European Tuberculosis network (TB-NET) study. Eur Respir J 2007; 30:752s.

23. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:736-42.
24. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. Eur Respir J 2006; 28:24-30.
25. Chee CBE, Gan SH, Khinmar KW, Barkham TM, Koh CK, Liang S, et al. Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2008; 46:1935-40.
26. Jose D, Malu De SG, Juan RM, Irene L, Cristina P, Alicia L, et al. T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patents at the beginning, during, and after anti-tuberculosis treatment. Diag Microbiol Infect Dis 2009; 63:43-51.

Abstract **Rapid Diagnosis of Tuberculosis Infection by Detecting Interferon-gamma in Blood Samples**

Sopa Srisungngam*, Janisara Rudeeaneksin*, Supanee Boonchu* Dhanida Rieanthong, Ronayut Norarat**, Pavongsak Rientrairat**, Arisa Srimusikpo**, Yuthichai Kasetchareon**, Benjawan Phetsuksiri***

*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, ** Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control

Journal of Health Science **2010; 19:813-21.**

Early and effective diagnosis of tuberculosis has been considered as an essential tool for tuberculosis control program. Among cases of tuberculosis and persons with *Mycobacterium tuberculosis* infection, there are cell - mediated immune response towards tuberculosis infection, resulted in production of interferon gamma (IFN-γ) which being triggered by *M. tuberculosis* specific antigens. This study was aimed at detection of IFN-γ by using QuantiFERON-TB test to rapidly diagnose *M. tuberculosis* infection among study population. In a group of clinically diagnosed tuberculosis patients, 50 of 60 subjects had IFN-γ more than 0.35 IU/ml which indicated status of active infectious tuberculosis. In addition, the results from 50 household contacts showed positive in 14 individuals indicating asymptomatic tuberculosis infection. Study in control group of 20 healthy volunteers or foreigners revealed 2 individuals having IFN-γ higher than 0.35 IU/ml. The analysis of the quality of the assay was performed based on standard soluble IFN-γ that was used to construct standard curves at the concentrations of 4.0, 1.0, 0.25, and 0 IU/ml in each analysis. The mean OD_{450} of standard controls were 0.930, 0.271, 0.103 and 0.045, respectively which were in an acceptable range and standards at the concentration of 4.0 IU/ml had a value of $OD_{450} \geq 0.600$ and $\leq$ 0.150 at 0 IU/ml as indicated by the instruction of the test. Comparing results of diagnosis of tuberculosis by QuantiFERON-TB and bacteriological examination of samples will confirm the accuracy of the analytical examination and support clinical diagnosis. It was concluded that IFN-γ test by QuantiFERON-TB was useful in rapid diagnosis of active tuberculosis and in early detection of tuberculosis infection.

Key words: **tuberculosis, QuantiFERON-TB, IFN-gamma**