Chulalongkorn Medical Journal

Volume 45
Issue 1 *January 2001*

Article 1

1-1-2001

Rapid susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis

S. Tumwasorn

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

Tumwasorn, S. (2001) "Rapid susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 45: Iss. 1, Article 1.
DOI: 10.58837/CHULA.CMJ.45.1.1
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol45/iss1/1

This Editorial is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

Chula Med J Vol. 45 No. 1 January 2001

การทดสอบความไวรับต่อยาของเชื้อวัณโรคอย่างรวดเร็ว

สมหญิง ธัมวาสร*

ปัญหาของวัณโรคที่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นทั่วโลกมีสาเหตุหนึ่งมาจากการดื้อยาที่เพิ่มมากขึ้นของเชื้อวัณโรค การทดสอบความไวรับต่อยาของเชื้อวัณโรคจึงมีความจำเป็นและเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการเลือกและปรับเปลี่ยนยาเพื่อรักษาผู้ป่วย เนื่องจากเชื้อวัณโรคเป็นเชื้อที่เจริญช้ามาก ใช้เวลาแบ่งตัวประมาณ 18 ชั่วโมงจึงทำให้วิธีการทดสอบความไวรับต่อยากินเวลานาน วิธีมาตรฐานที่อาศัยการสังเกตดูการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งใช้เวลา 3 – 6 อาทิตย์หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อได้แล้วทำให้ผลการทดสอบไม่ทันกับระยะเวลาที่จะต้องนำไปใช้ ส่วนวิธีมาตรฐานที่ใช้ BACTEC radiometric method จะใช้เวลาลดลงเหลือเพียง 1 – 2 อาทิตย์หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อได้แล้ว แต่ไม่เป็นที่นิยมเพราะต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ^{14}C ซึ่งมีครึ่งชีวิต 5,730 ปี ปัจจุบันมีวิธีการใหม่ ๆ สำหรับทดสอบความไวรับต่อยาของเชื้อวัณโรคมากมายหลายวิธีเพื่อที่จะให้ทราบผลได้รวดเร็วยิ่งขึ้น วิธีการส่วนใหญ่ยังคงอาศัยการตรวจหาการเจริญของเชื้อหลังจากให้เชื้อสัมผัสกับยาแต่แทนที่จะรอสังเกตดูการเจริญของเชื้อวิธีการใหม่ ๆ จะใช้เทคนิคอื่นในการทดสอบว่าเชื้อเจริญหรือไม่ เช่น วัดการเปลี่ยนแปลงของก๊าซที่เชื้อปล่อยหรือใช้ไป ใช้สีบางชนิดที่มีสมบัติพิเศษที่จะถูกเปลี่ยนแปลงในเซลของเชื้อที่มีชีวิตให้เป็นอีกสีหนึ่งได้ ใช้ mycobacteriophage เป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ รวมทั้งการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลตรวจหาสารที่บ่งชี้การเจริญของเชื้อ เช่น rRNA และ mRNA เป็นต้น วิธีการเหล่านี้จะใช้เวลาตั้งแต่ 2 – 10 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อได้แล้วและสามารถนำมาใช้ตรวจหาความไวรับต่อยาชนิดต่าง ๆ ที่ใช้รักษาวัณโรคได้

วิธีการทางชีวโมเลกุลอีกกลุ่มหนึ่งอาศัยความรู้ทางพันธุศาสตร์ของกลไกการดื้อยา เนื่องจากการที่เชื้อวัณโรคดื้อยาที่ใช้รักษาโดยทั่วไปอาศัยการเปลี่ยนแปลงหรือดัดแปลงเป้าหมายของยาด้วยการเกิด point mutation ที่ยีนบนโครโมโซม ดังนั้นเมื่อรู้กลไกการดื้อยาและรายละเอียดของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา ก็สามารถกำหนดยีนเป้าหมายที่จะตรวจหา mutation ได้ วิธีการที่ใช้จะเริ่มด้วยการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณจำเพาะที่บางส่วนของยีนแล้วจึงทำการตรวจหา mutation ดีเอ็นเอที่ใช้ส่วนใหญ่จะเตรียมมาจากเชื้อวัณโรคที่โตเต็มที่แล้ว มีบ้างที่ใช้ early positive BACTEC culture และตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วย วิธีการกลุ่มนี้จะทำให้ทราบผลได้รวดเร็วภายในระยะเวลา 1 – 2 วัน แต่มีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากการดื้อยาของเชื้อจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของยีนหลายยีนและยังมีเชื้อดื้อยาอีกจำนวนหนึ่งที่ยังไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ยีนใด ตัวอย่างเช่น กรณีของการดื้อยา isoniazid 12-75 % ของเชื้อดื้อยาจะมี mutation ที่ condon 315 ของ *kat G* gene หรือไม่ก็ที่ *inh A* gene อีก 13-18% ของเชื้อดื้อยาจะมี mutation ที่ *ahp C – oxy R* intergenic region และมักจะพบว่ามี mutation ที่ *kat G* gene นอกตำแหน่ง condon 315 ร่วมด้วย นอกจากนี้ 17% ของเชื้อดื้อยาจะมี mutation ที่ *kas A* gene ร่วมกับ mutation ที่ตำแหน่งอื่น ๆ และ 8.5 % ของเชื้อดื้อยาจะมี mutation เฉพาะที่ *kas A* gene เพียงอย่างเดียว ดังนั้นถ้าจะใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลตรวจหา mutation ในเชื้อวัณโรคที่ดื้อยา isoniazid จะต้องทดสอบที่ตำแหน่งต่าง ๆ หลายตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรณีของยา rifampicin ซึ่งเป็นยาสำคัญตัวหนึ่งที่ใช้รักษาวัณโรค ยานี้ออกฤทธิ์ที่เอ็นไซม์ RNA polymerase ซึ่งสร้างจากหลายยีนและหนึ่งในนั้นคือ *rpo B* gene พบว่าประมาณ 95% ของเชื้อที่ดื้อยานี้มี mutation ที่ 81-bp core region ของ *rpo B* gene ดังนั้นการนำวิธีการทางชีวโมเลกุลมาตรวจหาการดื้อยา rifampicin จึงเป็นที่ยอมรับและแพร่หลายมากกว่าการใช้กับยาอื่น ๆ วิธีการทางชีวโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้เช่น DNA sequencing, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis, solid-phase hybridization และวิธีใหม่ล่าสุดคือ molecular beacon assay DNA sequencing เป็น gold standard สำหรับหา mutation แต่มีปัญหาเรื่องเครื่องมือราคาแพงและต้องใช้ผู้มีความชำนาญ ปัจจุบันมีการนำเทคนิค genetic bit analysis ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ solid-phase primer extension มาใช้หา DNA sequence พบว่าสามารถทราบผลได้ภายใน 1 ชั่วโมง วิธีการค่อนข้างง่ายและราคาถูกกว่าการทำ DNA sequencing ด้วยวิธีมาตรฐาน SSCP เป็นวิธีการที่รวดเร็วและราคาไม่แพงให้สอดคล้องสูงกับวิธี DNA sequencing จึงเป็นวิธีที่นิยมกันแพร่หลายวิธีหนึ่ง Solid phase hybridization ใช้หลักการของ reverse hybridization โดยใช้ mutation-specific probes จับกับ solid phase แล้วนำ PCR product ของเชื้อที่ต้องการทดสอบไป hybridize มีชุดสำเร็จรูปคือ Line probe assay kit (Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium) สำหรับทดสอบ mutation ที่ทำให้เชื้อดื้อยา rifampicin ทำให้ทราบผลภายใน 2 ชั่วโมง แต่มีข้อจำกัดคือตรวจได้กับ mutation เฉพาะตำแหน่งที่พบบ่อยเนื่องจากสามารถจับ probe ลงบน solid phase ซึ่งเป็น nitrocellulose ได้ไม่มากนัก มีชุดสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นใหม่โดย Affymetrix (Santa Clara, Calif) การทดสอบนี้ใช้ gene chip technology ซึ่งอาศัย hybridization ของ PCR product ของเชื้อกับ probes จำนวนมากต่อ mutation แบบต่าง ๆ Probes เหล่านี้จัดเรียงอยู่บน glass substrate ที่ตำแหน่งจำเพาะ ชุดสำเร็จรูปนี้มี probe สำหรับตรวจหา *rpo B* mutations 51 แบบ เพื่อตรวจการดื้อยา rifampicin และมี probes ของ wild-type kat G gene สำหรับทดสอลการดื้อยา isoniazid ด้วย สำหรับ molecular beacon assay เป็นการทดสอบใหม่ที่นำมาใช้หา mutation ที่ทำให้เกิดการดื้อยา isoniazid และ rifampicin โดยใช้ real-time PCR machine และใช้ molecular beacons ซึ่งเป็น probe ชนิดใหม่ สามารถตรวจหา DNA target โดยไม่ต้องแยก probe-target hybrids ออกจาก non-hybridized probe นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะมากสามารถแยกแยะความแตกต่างของ DNA sequence ที่ต่างกันเพียง 1 เบสได้ สามารถสร้าง probes ให้มีสีแตกต่างกันโดยใช้สีหลาย ๆ แบบ ทำให้ตรวจหาดีเอ็นเอ หลาย ๆ ชนิดในหลอดเดียวกันได้ การทดสอบใช้เวลาเพียงไม่เกิน 3 ชั่วโมง หลังจากได้เชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็งแล้ว ข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือราคาแพงซึ่งยังไม่แพร่หลายได้แก่ real-time PCR machine

วิธีการใหม่ ๆ ทั้งหมดนี้อยู่ในขั้นศึกษาพัฒนาและประเมินความสามารถในการนำไปใช้ แม้ในปัจจุบันจะยังมองไม่เห็นภาพที่ชัดเจนในการนำวิธีการเหล่านี้มาใช้ในแต่ละกรณีหรือสถานการณ์ที่ต้องการทดสอบ แต่ก็คาดเดาได้ว่าวิธีการเหล่านี้จะต้องมีบทบาทในงานทดสอบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคต่อไปในอนาคต