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 ข้อจำกัดคือต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ซึ่งยังไม่แพร่หลายได้แก่ real-time PCR machine

วิธีการใหม่ ๆ ทั้งหมดนี้อยู่ในขั้นศึกษาพัฒนาและประเมินความสามารถในการนำไปใช้ แม้ในปัจจุบันจะยังมองไม่เห็นภาพที่ชัดเจนในการนำวิธีการเหล่านี้มาใช้ในแต่ละกรณีหรือสถานการณ์ที่ต้องการทดสอบ แต่ก็คาดเดาได้ว่าวิธีการเหล่านี้จะต้องมีบทบาทในงานทดสอบการดื้อยาของเชื้อวัณโรคต่อไปในอนาคต