

การพัฒนาชุดตรวจที่ง่ายต่อการใช้งานสำหรับไวรัสโคโรนาในช่องโดยอินเตอร์เฟียร์รอนแกมมาเรียลิส



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ไม่สังกัดภาควิชา/เทียบเท่า

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF USER FRIENDLY DIAGNOSTIC KIT FOR ELEPHANT TUBERCULOSIS BY  
INTERFERON GAMMA RELEASE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Common Course

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาชุดตรวจที่ง่ายต่อการใช้งานสำหรับไวรัสโคโรนาในช้าง โดยอินเตอร์เพียร์รอนแกมมารีลีส
โดย	น.ส.จิตสุตา พงษ์มา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ  
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	
.....	ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ)	
.....	กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกื้อการุณย์ ครูสง)	
.....	กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิตา วีรกุล)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.วันดี ยินดียั่งยืน)	

จิตสุตา พงษ์มา : การพัฒนาชุดตรวจที่ง่ายต่อการใช้งานสำหรับวัณโรคในช้างโดยอินเตอร์เฟียรอนแกมมาเรียลีส. ( DEVELOPMENT OF USER FRIENDLY DIAGNOSTIC KIT FOR ELEPHANT TUBERCULOSIS BY INTERFERON GAMMA RELEASE ) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ศ. ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

วัณโรค เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนหรือจากคนสู่สัตว์ที่เป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก รวมถึงในประเทศไทย เนื่องจากเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) complex (MTBC) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของวัณโรค สามารถพบการติดเชื้อได้ในสัตว์หลายกลุ่ม ทั้งสัตว์แทกิบ สัตว์ตระกูลลิง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงช้าง การวินิจฉัยวัณโรคในช้างทำได้ยาก เนื่องจากช้างเป็นสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีเดียวกับมนุษย์ เช่น การเอกซเรย์ปอด และการทดสอบทางผิวหนัง นอกจากนี้ วิธีมาตรฐานโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากน้ำล้างงวงช้างมีความไวต่ำ ใช้เวลานาน และตรวจได้เฉพาะระยะที่แสดงอาการเท่านั้น ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำ ครอบคลุมทุกระยะการติดเชื้อ *M. tb* จึงเป็นสิ่งจำเป็น นำมาสู่การประยุกต์ใช้เทคนิค Interferon gamma release assay (IGRA) สำหรับเป็นวิธีทางเลือกในการวินิจฉัยวัณโรค ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาอินเตอร์เฟียรอนแกมมา (IFN $\gamma$ ) ที่มีการหลั่งออกมาจากทีลิมโฟไซด์ชนิด memory หลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจำเพาะของ *M.tb* งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธี IGRA ให้ใช้งานได้ง่ายกว่าที่มีอยู่เดิม โดยการคัดกรองเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน early secreted antigenic target 6 kDa (ESAT6) และ culture filtrate protein 10 kDa (CFP10) ที่สามารถกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้าง และพัฒนาวิธีการตรวจโดยการกระตุ้นแบบ whole blood culture โดยเริ่มทำการตรวจการติดเชื้อของช้างด้วยวิธี IGRA เดิม (IGRA โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs) ในตัวอย่างเลือดจากช้าง 20 เชือก โดยมีโปรตีนทั้งสายเป็นแอนติเจนพบว่าช้างมีการติดเชื้อ MTBC 50% ของตัวอย่างทั้งหมด ไม่ติดเชื้อ 30% และ 20% มีการติดเชื้อกลุ่ม Non tuberculous mycobacterium (NTM) จากนั้นทำการคัดกรองเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ในช้างทั้ง 20 เชือก พบว่าเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้างที่คาดว่าติดเชื้อ MTBC ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ได้ มีจำนวน 13 สาย และ 14 สาย ตามลำดับ สำหรับการพัฒนา IGRA ด้วยการกระตุ้นแบบ whole blood culture พบว่าสามารถใช้ Pokeweed (PWM) (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นสารกระตุ้นในกลุ่มควบคุมบวก และพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ CFP10 (20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) สามารถกระตุ้นการหลั่ง IFN $\gamma$  ได้ แต่กลุ่มของเปปไทด์ที่คัดกรองได้จากการกระตุ้นแบบ PBMC culture นั้น ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ด้วยการกระตุ้นแบบ whole blood culture ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นแบบ whole blood culture โดยใช้แอนติเจนทั้งสายของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 สามารถใช้เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายต่อผู้ใช้งาน และรวดเร็วกว่าการวินิจฉัยด้วย PBMCs IGRA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2563

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 6172122523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Elephant IGRA Interferon gamma Overlapping peptide Tuberculosis

Chitsuda Pongma : DEVELOPMENT OF USER FRIENDLY DIAGNOSTIC KIT FOR ELEPHANT TUBERCULOSIS BY INTERFERON GAMMA RELEASE . Advisor: Prof. TANAPAT PALAGA, Ph.D.

Tuberculosis (TB) is a zoonotic disease that can be transmitted between animals and humans. Wild animals such as non-human primates, mammals, including elephants can be infected with *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) complex (MTBC) and may develop disease. TB in elephants are often latent but the clinical symptoms can be observed at the advanced stage. TB diagnostic in elephants is difficult because of the body size and their thick skin. Therefore, common TB diagnostic approaches used in human, such as chest X-ray and tuberculin skin test are not applicable. Moreover, the gold standard of bacteria culture from elephant trunk wash, has low sensitivity, time-consuming and can only detect TB in the active stage. Thus, an accurate diagnosis covering all phases of the *M. tb* infection is still needed. Interferon gamma release assay (IGRA) is an alternative approach for TB diagnosis, which detects the interferon gamma (IFN $\gamma$ ) secreted from memory T cell stimulated with specific *M. tb* antigens. The aims of this study is to screen the overlapping peptides of early secreted antigenic target 6 kDa (ESAT6) and culture filtrate protein 10 kDa (CFP10) from *M. tb* to use as MTB specific antigens in whole blood culture for IGRA. Using our in-house IGRA, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 20 elephants were tested by using whole protein antigens. Half of these samples were determined as infection positive with MTBC, 30% were infection negative, and 20% showed infection positive with Non tuberculous mycobacterium (NTM). When PBMCs from these 20 elephants were screened using the overlapping peptides from ESAT6 (21 peptides) and CFP10 (23 peptides), 13 peptides of ESAT6 and 14 peptides of CFP10 were identified as potential epitopes that were able to induce eIFN $\gamma$  production from PBMCs of MTBC infected elephants. To perform whole blood culture IGRA, Pokeweed mitogen (10 ug/ml) were investigated and was chosen as mitogen for stimulation as the positive control. Recombinant whole protein of ESAT6 and CFP10 (20 ug/ml) were tested in MTBC positive samples and were found to yield consistent result as the PBMCs culture method. In contrast, overlapping peptides identified from PBMCs study did not yield the response from the whole blood culture. These results indicated that the whole blood culture using whole protein of ESAT6 and CFP10 can be used to identify MTB infection in elephant which is much more user friendly and less time consuming than the PBMCs IGRA.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature .....

Academic Year: 2020

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาของศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จนสมบูรณ์ นอกจากนี้ขอขอบคุณ ดร. วันดี ยินดียั่งยืน (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ: BIOTEC) สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และได้ให้ความอนุเคราะห์ในส่วน ของ Rabbit anti-elephant Interferon gamma antibody, recombinant elephant IFN $\gamma$  (reIFN $\gamma$ ), reESAT6, reCFP10 และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณนายทรงเกียรติ ทรงธรรมานุกภาพ ที่ช่วยฝึกสอนในเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับการปฏิบัติงาน และคอยให้คำปรึกษาจนงานนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนการศึกษาที่ได้รับจากโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) อีกทั้งทุนในการทำวิจัยจากทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ Cluster and Program Management National Science and Technology Development Agency : Project ID P-18-52114.

ขอขอบคุณตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสัตว์เขาเขียว ซึ่งอยู่ในความดูแลขององค์การสวนสัตว์ และจากโครงการคชอาณาจักร จังหวัดสุรินทร์ และขอขอบคุณสัตวแพทย์ทุกท่านที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดช้างในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกห้องวิจัย 2015 ที่ช่วยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญ และคอยสนับสนุนในด้านต่าง ๆ จนทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

จิตสุดา พงษ์มา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำย่อ.....	ฐ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ .....	1
วัตถุประสงค์ .....	4
บทที่ 2 .....	5
ปริทรรศน์วรรณกรรม .....	5
2.1 วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) .....	5
2.2 แบคทีเรีย MTBC and Non-tuberculous mycobacterium (NTM) .....	6
2.3 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อวัณโรค.....	7
2.4 วัณโรคในสัตว์ (Animal Tuberculosis).....	8
2.4.1 วัณโรคในช้าง.....	8
2.4.1.1 รายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง .....	9
2.4.2 วิธีการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง .....	12
2.4.2.1 การเพาะเชื้อจากน้ำล้างวง (Trunk wash culture).....	12
2.4.2.2 การตรวจทางเซรุ่มวิทยา (Serological test).....	12

2.4.2.3 การทดสอบ Interferon-gamma release assays (IGRA) .....	13
2.5 IGRA สำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ .....	16
2.5.1 ไมโตเจน (Mitogen).....	16
2.5.2 Purified protein derivative (PPD).....	17
2.5.3 โปรตีน ESAT6 และ CFP10.....	17
2.5.4 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 (Overlapping peptides) .....	18
2.5.5 การวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในสัตว์ด้วยชุดตรวจ QFT .....	18
บทที่ 3 .....	20
ระเบียบวิธีวิจัย .....	20
3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ .....	20
3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แบบ Sandwich ELISA สำหรับตรวจ วิเคราะห์ elephant IFN $\gamma$ (eIFN $\gamma$ ) (17) .....	20
3.3 ตัวอย่างเลือดข้างที่ใช้ในการทดลอง .....	22
3.4 การตรวจวัณโรคในช้างด้วยวิธี Interferon gamma release assay (IGRA).....	22
3.4.1 การแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือดข้าง.....	22
3.4.2 กระตุ้น PBMCs ด้วยไมโตเจนหรือโปรตีนแอนติเจน .....	23
3.4.3 เกณฑ์การแปลผลการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้างด้วยวิธี IGRA .....	24
3.5 การคัดกรองเพปไทด์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$ ของเซลล์เม็ดเลือด ขาวของช้าง .....	26
3.5.1 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 .....	26
3.5.2 การกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน....	27
3.5.3 กระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 .....	28
3.5.4 การแปลผลการกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสาย รวมกัน .....	28



3.6 พัฒนาชุดทดสอบ IGRA โดยวิธี whole blood culture.....	29
3.6.1 กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้างแบบ whole blood culture.....	29
3.6.2 การคัดเลือกไมโตเจน สำหรับกระตุ้นเซลล์ใน whole blood culture.....	30
3.6.3 กระตุ้น PBMCs ในเลือดข้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture.....	30
3.6.4 กระตุ้น PBMCs ในเลือดข้าง ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture.....	31
3.7 วิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	32
บทที่ 4 .....	33
ผลการทดลอง.....	33
4.1 ตัวอย่างเลือดข้างที่ใช้ในการทดลอง .....	33
4.2 การตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในข้างด้วยวิธี Interferon gamma release assay (IGRA) โดยใช้ PBMCs.....	36
4.3 การคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ที่สามารถกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของข้าง.....	40
4.3.1 การกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10.....	40
4.3.2 การกระตุ้น PBMCs ของข้างด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์แบบรวมหลายสายของโปรตีน ESAT6 และ CFP10.....	46
4.4 การพัฒนาชุดทดสอบ Interferon gamma release assays (IGRA) แบบ whole blood culture.....	49
4.4.1 การคัดเลือกไมโตเจนสำหรับกระตุ้น whole blood culture.....	49
4.4.2 แผนผังการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ในเลือดข้างแบบ whole blood culture .....	50
4.4.3 การกระตุ้น PBMCs ในเลือดข้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture.....	51

4.4.4 การกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture .....	55
บทที่ 5 .....	59
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	59
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก .....	71
ภาคผนวก ข .....	74
บรรณานุกรม.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	102



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง.....	11
ตารางที่ 2 การพัฒนา IGRA สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในสัตว์ .....	16
ตารางที่ 3 แปลผลการตอบสนองของ PBMCs โดยใช้ค่า cutoff ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน. 25	
ตารางที่ 4 การแปลผลการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือ หลายสายรวมกัน .....	29
ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง .....	33
ตารางที่ 6 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยด้วยไมโตเจนหรือแอนติเจนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ PBMCs (n=20).....	39
ตารางที่ 7 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20).....	42
ตารางที่ 8 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20).....	43
ตารางที่ 9 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์สังเคราะห์ของ โปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ PBMCs (n=15) .....	48
ตารางที่ 10 ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture (n=15).....	54
ตารางที่ 11 ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture (WC).....	58

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การทดสอบ IGRA .....	14
ภาพที่ 2 แผนภาพการพัฒนาวิธีตรวจวัด eIFN $\gamma$ ของช้างโดยวิธี Sandwich ELISA.....	22
ภาพที่ 3 แผนผังการแปลผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช้างด้วยวิธี IGRA (17) .....	25
ภาพที่ 4 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ประกอบด้วยเพปไทด์จำนวน 21 สาย (E1-E21) ..	26
ภาพที่ 5 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ประกอบด้วยเพปไทด์จำนวน 23 สาย (C1-C23)..	27
ภาพที่ 6 ขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้างแบบ whole blood culture .....	29
ภาพที่ 7 กระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture .....	31
ภาพที่ 8 กระตุ้น PBMCs ในเลือดช้าง ด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture .....	32
ภาพที่ 9 ปริมาณ eIFN $\gamma$ ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีแอนติเจนชนิดต่าง ๆ (n=20) .....	38
ภาพที่ 10 ปริมาณ eIFN $\gamma$ ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน .....	44
ภาพที่ 11 ปริมาณ eIFN $\gamma$ ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน .....	45
ภาพที่ 12 ปริมาณ eIFN $\gamma$ ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ด้วยวิธี PBMCs culture (n=15) .....	47
ภาพที่ 13 ปริมาณ eIFN $\gamma$ ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน ด้วยวิธี whole blood culture (n=10).....	50
ภาพที่ 14 แผนผังการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ของช้าง แบบ whole blood culture .....	51

ภาพที่ 15 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจาก PBMCs ของข้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ PBMCs culture (PC) และ whole blood culture (WC) (n=15) ..... 53

ภาพที่ 16 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจาก PBMCs ของข้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และ เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบPBMCs culture (PC) และ whole blood culture (WC) (n=15)..... 57

ภาพที่ 17 ชุดตรวจ IGRA สำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจการติดเชื้อ MTBC ในข้าง..... 69

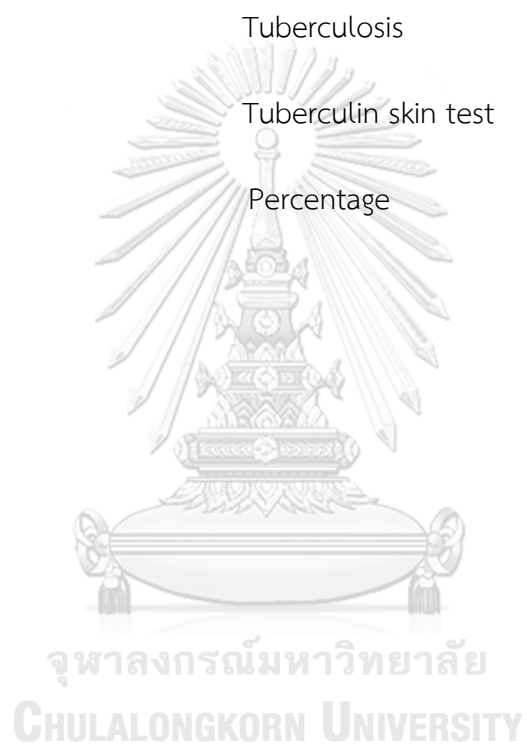


## คำย่อ

APC	Antigen presenting cell
BCG	Bacillus Calmette Guerin
CFP10/ C	10-kDa culture filtrate protein
CMIR	Cell-mediated immune response
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ConA	Concanavalin A
DPP Vet TB	Dual-path platform VetTB test
eIFN $\gamma$	Elephant interferon gamma
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
ESAT6/ E	6-kDa early secretory antigenic target
FBS	Fetal bovine serum
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
IGRA	Interferon gamma release assay
IL	Interleukin
IND	Indeterminate
LOD	Limit of detection

M	Molar
MAPIA	Multi antigen print immunoassay
MHC	Major histocompatibility complex
MP	MTBC infection positive
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
N	MTBC infection negative
NO	Nitric oxide
No.	Number
NP	NTM infection positive
NTM	Non tuberculous mycobacterium
OD	Optical density
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer saline
PBST	Phosphate buffer saline-Tween
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohemagglutinin
PPD	Purified protein derivative
PPDA	Purified protein derivative from <i>M. avium</i>
PPDB	Purified protein derivative from <i>M. bovis</i>
PWM	Pokeweed mitogen

QFT	Quantiferon TB gold in tube
RD-1	Region of difference-1
relFN $\gamma$	Recombinant elephant interferon gamma
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SCITI	Single comparative intradermal skin test
TB	Tuberculosis
TST	Tuberculin skin test
%	Percentage





## บทที่ 1

### บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญระดับโลกในปัจจุบัน โดยเป็นสาเหตุของการป่วย และการเสียชีวิตในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) เชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายได้ผ่านการหายใจเอาละอองขนาดเล็กประมาณ 1-5 ไมครอน จากผู้ป่วย ซึ่งจะมีเชื้อวัณโรคอยู่ 1-3 เซลล์ เข้าไป โดยในระยะแรกเชื้อจะเข้าไปในถุงลมปอด จากนั้นจะฝังตัวและแบ่งตัวที่เนื้อปอด ซึ่งเป็นระยะที่สามารถแพร่เชื้อได้ง่ายและรวดเร็ว โดยผู้ป่วยจะสามารถแพร่กระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้โดยผ่านระบบทางเดินหายใจจากการพูด หรือการจาม (1) แต่คนที่ได้รับเชื้อส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ แต่อยู่ในภาวะติดเชื้อแฝง (Latent infection)

วัณโรคจัดเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonotic Disease) หรือจากคนสู่สัตว์ (Reverse zoonotic disease) ที่สำคัญทางสาธารณสุข สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อในกลุ่ม MTBC ได้แก่ *M. tb*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti* และ *M. microti* (2) เชื้อกลุ่มนี้สามารถก่อให้เกิดวัณโรคในสัตว์หลายชนิด ทั้งสัตว์ปีก สัตว์แทะ สัตว์ตระกูลลิง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมทั้งช้าง (3) ซึ่งสัตว์เหล่านี้สามารถเป็นต้นเหตุในการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคไปยังสัตว์อื่น ๆ และยังอาจส่งผ่านเข้าสู่มนุษย์ได้ โดยมีรายงานว่า พบการติดเชื้อวัณโรคในช้างและพบการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่พนักงานเลี้ยงช้าง (4, 5) การตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช้างตั้งแต่ระยะแรกนั้นมีความสำคัญ โดยจะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อไปยังผู้ที่เกี่ยวข้องได้ เนื่องจากช้างที่เป็นวัณโรคในระยะแรกจะไม่แสดงอาการทางคลินิกที่สามารถสังเกตเห็นได้ จนกระทั่งถึงระยะที่อาการรุนแรง ช้างจะมีการอ่อนแรง น้ำหนักลดลงอย่างต่อเนื่อง และตายในที่สุด

การวินิจฉัยวัณโรคในช้างทำได้ยาก เนื่องจากช้างเป็นสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ จึงไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีเดียวกับมนุษย์ เช่น การเอกซเรย์ปอด และการทดสอบทางผิวหนัง วิธีการตรวจวินิจฉัยที่ได้รับการยอมรับ ได้แก่ การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำล้างงวง แต่เป็นวิธีที่ให้ผลช้า เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน มีความไวต่ำ และผลการตรวจวินิจฉัยขึ้นกับคุณภาพ

ของการเก็บตัวอย่าง และยังสามารถวินิจฉัยได้เฉพาะระยะที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น (6) จากข้อจำกัดดังกล่าว จึงได้มีผู้ศึกษาวิจัยวิธีการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง โดยการตรวจหาระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค โดยใช้ชุดตรวจไวสำเร็จรูป (Elephant TB STAT PAK®-Chembio) พัฒนาการตรวจด้วยวิธี Multi antigen print immunoassay (MAPIA) และ Dual-path platform VetTB test (7) นอกจากนี้ การที่ *M. tb* เป็นเชื้อก่อโรคที่เจริญภายในเซลล์ (Intracellular pathogen) ทำให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันผ่าน Cell-mediated immune response (CMIR) หลังการติดเชื้อ โดย Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) จะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อผ่านกลไกการตอบสนองแบบ CMIR ส่งผลให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ อินเตอร์เฟียร์รอนแกมมา (IFN $\gamma$ ) จาก helper T cell ชนิด 1 (Th<sub>1</sub>) และ Natural killer cell (8, 9) จึงได้มีการนำ Interferon gamma release assay (IGRA) มาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค (10)

IGRA เป็นการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยการวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ที่หลั่งจากทีลิมโฟไซต์หลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีน 6-kDa early secretory antigenic target (ESAT6) และ 10-kDa culture filtrate protein (CFP10) เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หลั่งจากเชื้อกลุ่ม MTBC เท่านั้น แต่ไม่พบในกลุ่ม Non Tuberculous Mycobacterium (NTM) โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN $\gamma$  โดย Memory cell ของ PBMCs ของผู้ป่วยวัณโรค (6) นอกจากนี้ ESAT6 และ CFP10 ยังเป็นแอนติเจนที่สำคัญต่อการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง และถูกใช้ในชุดตรวจ MAPIA (11) อีกทั้ง ในการใช้ IGRA ในมนุษย์สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างผู้ที่เคยได้รับวัคซีน Bacillus Calmette Guerin (BCG) หรือเคยสัมผัสกับเชื้อกลุ่ม NTM ได้ (12) การตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ได้มีการใช้ชุดตรวจ IGRA โดยมี 2 รูปแบบ คือ T-spot และ Quantiferon TB gold in tube (QFT) ชุดตรวจแบบ T-spot จะเป็นการกระตุ้น PBMCs ด้วยโปรตีน ESAT6 หรือ CFP10 แต่การตรวจแบบ QFT จะเป็นการกระตุ้น Whole blood ด้วยเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6, CFP10 และ TB7.7 ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ด้วยชุดตรวจ IGRA นั้น มีข้อดี คือ มีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tb* มากกว่าการทดสอบทางผิวหนัง และไม่เกิดผลบวกลวงจากการได้รับวัคซีน BCG หรือติดเชื้อ NTM (13) เนื่องจาก IGRA มีการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ซึ่งเกิดจากการถอดรหัส

ของยีน Rv3875 และ Rv3874 ของ *M. tb* ตามลำดับ โดยเป็นบริเวณ region of difference-1 (RD-1) ซึ่งเป็นบริเวณยีนที่ขาดหายไปในวัคซิ่น BCG ที่ได้จากเชื้อ *M. bovis* และโปรตีนทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถพบได้ในเชื้อกลุ่ม NTM ซึ่งเป็นเชื้อ *Mycobacterium* ชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดวัณโรค โดยสามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เช่น ในดินหรือแหล่งน้ำ (14)

ปัจจุบันได้มีการศึกษา และพัฒนาเทคนิค IGRA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคของช้างเอเชีย (*Elephas maximus*) (15-17) และช้างแอฟริกา (*Loxodonta africana*) ในปี พ.ศ. 2556 มีการพัฒนาวิธีตรวจวัด IFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้คู่มอโนคลอนอลแอนติบอดีในการตรึง (capture antibody) และตรวจวัด (detecting antibody) พบว่าสามารถวัดปริมาณ elephant IFN $\gamma$  (eIFN $\gamma$ ) ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 1 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (15) ในเวลาต่อมา มีการใช้วิธี Sandwich ELISA เช่นกัน แต่มีการใช้พอลิคลอนอลแอนติบอดีในการตรึงและตรวจวัด พบว่า สามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 100 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (16) และในปี พ.ศ. 2563 ทรงเกียรติ ทรงธรรมานุภาพ มีการพัฒนา IGRA ที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อ *M. tb* ในช้าง และสามารถแยกการติดเชื้อในกลุ่ม MTBC และ NTM ได้ด้วย โดยใช้พอลิคลอนอลแอนติบอดีในการตรึงและมอโนคลอนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจวัด ซึ่งวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ที่ระดับ 0.1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมามีข้อด้อย คือ จะต้องมีการปั่นแยก PBMCs และการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง IFN $\gamma$  จะต้องใช้เวลานาน 48-72 ชั่วโมง อีกทั้งต้องมีการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ CFP10 ด้วย (17)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธี IGRA ด้วยการคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ที่ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 (Overlapping peptides) โดยเพปไทด์แต่ละสายประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 15 ตัว และมีจำนวนกรดอะมิโนซ้อนทับ 11 ตัว เพื่อใช้เป็นแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นการหลั่ง IFN $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งจะปรับให้ง่ายต่อผู้ใช้งาน ด้วยการกระตุ้นแบบ whole blood culture เพื่อนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคของช้างในประเทศไทยที่แม่นยำ และรวดเร็วต่อไป

### วัตถุประสงค์

1. คัดกรองเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 จาก *Mycobacterium tuberculosis* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้างให้หลั่ง Interferon gamma (IFN $\gamma$ )
2. พัฒนาวิธี Interferon gamma release assay (IGRA) สำหรับตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในช้าง โดยการใช้ whole blood culture



## บทที่ 2

### ปรีทรศน์วรรณกรรม

#### 2.1 วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB)

วัณโรค เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญระดับโลกในปัจจุบัน โดยเป็นสาเหตุของการป่วยและการเสียชีวิตในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก (18) วัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) ประกอบด้วย *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* และ *M. microtii* แต่เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดวัณโรคคือ *M. tb* (19)

วัณโรคนั้นสามารถเกิดได้ทุกอวัยวะของร่างกาย แต่ส่วนใหญ่มักจะเกิดอาการที่ปอด ซึ่งจะส่งผลให้สามารถแพร่กระจายจากปอดหรือหลอดลมของผู้ป่วยวัณโรค เมื่อผู้ป่วยมีการไอหรือจาม เชื้อจะปนอยู่ในละอองฝอยของสารคัดหลั่งที่กระจายออกมาสู่อากาศ เชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายได้โดยการหายใจเอาละอองขนาดเล็กประมาณ 1-5 ไมครอน ซึ่งจะมีเชื้อวัณโรคอยู่ 1-3 เซลล์เข้าไปในระบบทางเดินหายใจ เชื้อจะตกลงไปในถุงลม (alveoli) เชื้อจะฝังตัวและแบ่งตัวที่เนื้อปอดบริเวณส่วนล่างของกลีบบนหรือส่วนบนของปอดกลีบล่าง (20) เมื่อเชื้อวัณโรคที่อยู่ในละอองเสมหะตกลงไปถึงถุงลมปอด เชื้อจะถูกเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) ในถุงลมทำลาย หากเซลล์แมคโครฟาจทำลายเชื้อวัณโรคไม่สำเร็จ เชื้อวัณโรคจะสามารถแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น และทำลายเซลล์แมคโครฟาจ ทำให้เซลล์แตกและหลังสารที่จะดึงดูดเซลล์แมคโครฟาจอื่นๆ จากกระแสเลือดเข้ามาเพิ่มเติมในเนื้อเยื่อปอดเพื่อที่จะทำลายเชื้อ โดยเซลล์แมคโครฟาจจะพยายามจับกินเชื้อวัณโรคเข้าไป แต่ถ้าไม่สามารถทำลายเชื้อได้หรือหยุดการแบ่งตัวของเชื้อได้ เชื้อจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น (21, 22) จากนั้นเชื้อวัณโรคอาจแพร่กระจายไปสู่อวัยวะอื่นผ่านทางกระแสเลือดหรือระบบน้ำเหลืองทำให้เกิดวัณโรคที่อวัยวะต่าง ๆ ได้ (23)

การติดเชื้อวัณโรค แบ่งเป็น 2 ระยะ ได้แก่ การติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง (Latent TB infection) เกิดจากการหายใจเอาอากาศที่มีเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกาย จากนั้นจะมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์แมคโครฟาจและเม็ดเลือดขาวอื่น ๆ จะทำลายเชื้อ ถ้าระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแข็งแรงก็จะสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อวัณโรคได้ ผู้ติดเชื้อจะไม่มีอาการป่วย

และไม่สามารถแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นได้ ระยะที่ 2 การติดเชื้อวัณโรคระยะแพร่กระจายหรือการป่วยเป็นวัณโรค (Active TB disease) คือผู้ที่ติดเชื้อวัณโรคและภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถทำลายเชื้อได้หรือเป็นผลหลังจากการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงมาแล้วหลายปี ผู้ป่วยจะแสดงอาการของวัณโรค เช่น ไอเรื้อรังมากกว่า 2 สัปดาห์ เจ็บหน้าอก ไอมีเลือดหรือเสมหะปน น้ำหนักลด ไข้ อ่อนเพลีย เป็นต้น โดยผู้ป่วยจะสามารถแพร่กระจายเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้โดยผ่านระบบทางเดินหายใจ จากการพูดหรือจาม (18)

## 2.2 แบคทีเรีย MTBC and Non-tuberculous mycobacterium (NTM)

เชื้อสกุล *Mycobacterium* ที่ค้นพบในปัจจุบันมีมากกว่าร้อยชนิด (species) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ MTBC และ NTM โดยเชื้อในกลุ่ม MTBC เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดวัณโรคในคนและสัตว์ (24) และเชื้อในกลุ่ม NTM ซึ่งเป็นชนิดอื่นที่ไม่ได้ก่อให้เกิดวัณโรค แต่เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV) และพบว่าเป็นสาเหตุของการก่อโรคในคนเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้ว เชื้อ NTM สามารถพบได้ในธรรมชาติ ทั้งในดิน น้ำ และฝุ่นละออง ในการวินิจฉัยและแยกความแตกต่างของการติดเชื้อ 2 กลุ่มนี้ สามารถแยกได้โดยใช้โปรตีนแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อ MTBC ในการดูการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (25)

เชื้อ NTM จัดเป็นเชื้อก่อโรค ถึงแม้ว่าจะไม่รุนแรงเท่าเชื้อวัณโรค การติดเชื้อ NTM เกิดขึ้นได้ในหลายระบบของร่างกาย เช่น การติดเชื้อที่ปอด ผิวหนัง กล้ามเนื้อ และต่อมน้ำเหลือง โดยเฉพาะระบบต่อมน้ำเหลือง เป็นอวัยวะที่พบการติดเชื้อ NTM มากที่สุด (91%) (26, 27, 28) เชื้อ NTM สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย และมีความรุนแรงได้ โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised) (29, 30) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี, ผู้ป่วยมะเร็ง และผู้ป่วยที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน แต่ก็มีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่ไม่ได้มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องแต่สามารถติดเชื้อดังกล่าวได้ มีรายงานการพบกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวี แต่มีความบกพร่องทางภูมิคุ้มกันของ interleukin (IL)-12 และ IFN $\gamma$  ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้การติดเชื้อ NTM มีความรุนแรง โดยเฉพาะในผู้ที่มีการสร้างภูมิต้านทานต่อ IFN $\gamma$  หรือกลุ่มอาการที่เรียกว่า anti-IFN $\gamma$  autoantibodies จะมีอาการจากการติดเชื้อ NTM ที่รุนแรงขึ้น และพบการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย ซึ่งมักเป็นเชื้อที่ก่อโรคภายในเซลล์ เช่น *Salmonella*, *Histoplasma capsulatum* และ

*Cryptococcus neoformans* และอาจมีอาการแสดงอาการทางผิวหนังที่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อโดยตรง (31)

### 2.3 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อวัณโรค

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อวัณโรคสามารถแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immune) และ ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง (adaptive immune) ดังนี้

เมื่อเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยผ่านระบบทางเดินหายใจ ชั้นแรกจะเกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด โดยจะเกิดการโบกพัดของ cilia ในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งจะทำให้เกิดการเกาะติดของเชื้อได้ยากขึ้น จากนั้นเชื้อวัณโรคจะถูกจับกินโดยเซลล์ alveolar macrophage ด้วยกระบวนการ phagocytosis โดยเชื้อจะอยู่ภายใน phagosome ของเซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งในระยะแรกที่ร่างกายยังไม่มีภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อ เซลล์แมคโครฟาจที่กินเชื้อเข้าไปจะยังไม่ถูกกระตุ้น ซึ่งจะต้องอาศัยการกระตุ้นจาก T helper cell (CD4<sup>+</sup> T cell) ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง ดังนั้น ในระยะแรกที่เซลล์แมคโครฟาจยังไม่ถูกกระตุ้นนั้น จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อวัณโรคได้อย่างจำกัด เชื้อวัณโรคจึงเจริญเติบโตและแบ่งตัว เชื้อบางตัวอาจจะหลุดรอดเข้าไปใน cytoplasm ของเซลล์แมคโครฟาจได้ เมื่อเชื้อมีปริมาณมากขึ้น จะส่งผลให้เซลล์แมคโครฟาจตายและสลายตัว ปล่อยเชื้อออกมา และทำให้เซลล์แมคโครฟาจอื่นมาจับกินต่อไป (32, 33)

หลังจากนั้นจะเกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง เนื่องจากเชื้อ *M. tb* เป็นเชื้อก่อโรคที่เจริญภายในเซลล์ (Intracellular pathogen) มักมีกลไกการหลบหลีกกระบวนการฆ่าภายในเซลล์แมคโครฟาจได้ จึงต้องอาศัยการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลัง โดยผ่านการตอบสนองแบบ Cell-mediated immune response (CMIR) เพื่อกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้สามารถทำลายเชื้อได้ ซึ่งเซลล์แมคโครฟาจมีบทบาทเป็น antigen presenting cell (APC) ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายเชื้อวัณโรคให้เป็นเปปไทด์ และนำชิ้นส่วนเปปไทด์มาแสดงออกที่ผิวของเซลล์ร่วมกับโมเลกุลของ major histocompatibility complex (MHC) class II เพื่อเสนอแอนติเจนต่อ CD4<sup>+</sup> T cell โดยมีการรับรู้แอนติเจนผ่าน T cell receptor (TCR) จะกระตุ้นให้เกิด

การหลั่ง IFN $\gamma$  ไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจให้มีการทำลายเชื้อที่อยู่ภายในเซลล์ โดยผ่านกลไกการเชื่อมกันระหว่าง phagosome กับ lysosome หรือมีการสร้าง nitric oxide (NO) และในกรณีที่เชื้อวัณโรคอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์แมคโครฟาจ เซลล์จะอาศัยการนำเสนอ แอนติเจนผ่าน MHC class I ในการกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte (CD8<sup>+</sup> T cell) ให้หลั่ง IFN $\gamma$  ที่จะทำให้เซลล์แมคโครฟาจตาย (34)

## 2.4 วัณโรคในสัตว์ (Animal Tuberculosis)

วัณโรคจัดเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonotic Disease) หรือจากคนสู่สัตว์ (Reverse zoonotic disease) ที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อในกลุ่ม MTBC โดยเชื้อกลุ่มนี้สามารถก่อให้เกิดวัณโรคได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สัตว์ปีก และมีรายงานการเกิดโรคในสัตว์ป่าหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มนกปากขอ สัตว์เท้ากบ สัตว์ตระกูลลิง รวมถึงช้าง ซึ่งสัตว์เหล่านี้อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคไปสู่สัตว์ชนิดอื่น ๆ และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งสัตว์เหล่านี้ยังมีศักยภาพในการส่งผ่านเชื้อวัณโรคมาสู่มนุษย์ได้อีกด้วย (3)

### 2.4.1 วัณโรคในช้าง

วัณโรคในช้างเกิดจากการติดเชื้อ *M. tb* โดยสามารถพบได้ทั้งช้างเอเชีย (Asia elephants: *Elephas maximus*) และช้างแอฟริกา (Africa elephants: *Loxodonta africana*) (35, 36, 37) จากรายงานของ Une และ Mori ในปี พ.ศ. 2550 พบว่าช้างเอเชียมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ *M. tb* สูงกว่าช้างแอฟริกา และช้างเหล่านี้มีศักยภาพสูงในการแพร่กระจายเชื้อไปสู่มนุษย์ (38)

วัณโรคในช้างนั้นอาจเกิดอาการเรื้อรัง ซึ่งบ่อยครั้งจะไม่แสดงอาการป่วยทางคลินิกให้เห็นได้ชัดเจน จนกระทั่งถึงระยะแสดงอาการ โดยช้างที่ติดเชื้อจะมีอาการอ่อนล้า ไม่สามารถทำงานได้ปกติ ไอ จาม อาจมีมูกใส หายใจลำบาก และน้ำหนักลดลงอย่างต่อเนื่องจนตายในที่สุด (39) การติดเชื้อวัณโรคในช้างส่งผลกระทบต่อสวัสดิภาพของสัตว์ และมนุษย์ อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อระบบเศรษฐกิจ และอุตสาหกรรมการท่องเที่ยว (40) ดังนั้น วิธีการตรวจวินิจฉัยวัณโรคของช้างที่มีความแม่นยำ และครอบคลุมวัณโรคในทุกระยะจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็น เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของโรคไปสู่สัตว์ชนิดอื่นและผู้ที่เกี่ยวข้อง



#### 2.4.1.1 รายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง

ในปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้างในหลายประเทศทั่วโลก ดังตารางที่ 1 โดยรายงานแรกในปี พ.ศ. 2541 พบการแพร่กระจายของเชื้อ *M. tb* จากช้างเอเชียสู่ผู้ที่เกี่ยวข้อง โดยมีรายงานการติดต่อของโรคจากช้างมายังมนุษย์ โดยพบความเป็นไปได้ในการกระจายของเชื้อวัณโรคจากช้าง ติดต่อไปยังพนักงานเลี้ยงเป็นจำนวน 11 คน (4)

ในระหว่างปี พ.ศ. 2539-2553 มีการรายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง ในประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 50 เชือก โดยมีการยืนยันการติดเชื้อด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าเป็นการติดเชื้อ *M. tb* จำนวน 49 เชือก เป็นช้างเอเชีย จำนวน 46 เชือก และช้างแอฟริกา จำนวน 3 เชือก และพบการติดเชื้อ *M. bovis* ในช้างแอฟริกา จำนวน 1 เชือก (39) และในปี พ.ศ. 2554 พบช้างเอเชียในสวนสัตว์ติดเชื้อ *M. tb* ซึ่งพบว่ามีการเพาะเชื้อ จากสารคัดหลั่งจากบริเวณช่องคลอดและงวงเป็นบวก และพบว่าเชือกมีความต้อพยาธิใช้ในการรักษาวัณโรคช้างเชือกนี้ จึงถูกทำการการุณยฆาต (euthanized) (41)

ในปี พ.ศ. 2548 มีรายงานการตรวจพบช้าง จำนวน 6 เชือก ในสวนสัตว์ Swedish ประเทศสวีเดน ติดเชื้อวัณโรคพร้อมกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ภายในโรงเรือนเดียวกัน โดยทำการยืนยันการติดเชื้อ ด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากการชันสูตรพลิกศพ (post-mortem) (42)

เมื่อปี พ.ศ. 2553 ในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง จำนวน 4 เชือก วินิจฉัยด้วยการเพาะเชื้อจากน้ำล้างงวงหลายครั้ง จากช้างที่ป่วยมากแต่ได้ผลลบ ในรายงานระบุว่า มีช้างเข้ารับการรักษา จำนวน 4 เชือก ช้างเชือกที่ 1, 3 และ 4 มีอาการป่วยมาก น้ำหนักลด อ่อนแอ ส่วนช้างเชือกที่ 2 สุขภาพโดยทั่วไปปกติ ยกเว้นมี serous discharge จากงวง หลังจากนั้น ช้างเชือกที่ 3 ตายหลังเข้ารับการรักษาเป็นเวลา 1 เดือน ส่วนช้างเชือกที่ 1 และ 4 ทำการเพาะเชื้อจากน้ำล้างงวง 5 และ 7 ครั้ง ตามลำดับ ได้ผลลบทุกครั้ง ช้างเชือกที่ 1 และ 4 ตายหลังการรักษา 2 และ 3 ปี ตามลำดับ ภายหลังจากการผ่าซากช้างที่ตายทั้ง 3 เชือก พบพยาธิสภาพที่ปอด ย้อม AFB และทำการเพาะเชื้อจากเนื้อเยื่อ อีกทั้งยังทำการตรวจสอบด้วยวิธี DNA sequencing ยืนยันว่าเป็น *M. tb* ในส่วนของช้างเชือกที่ 2 ได้ทำการเพาะเชื้อจากน้ำล้างงวงจำนวน 8 ครั้ง ได้ผลลบเพียง 1 ครั้ง (43)

มีรายงานช้างแอฟริกา (*L. africana*) เสียชีวิตจากวัณโรคเป็นรายแรกในปี พ.ศ. 2556 สาเหตุหรือต้นตอการติดเชื้อไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องจากช้างเชือกนี้เป็นช้างป่ากำพร้าในประเทศเคนยา ได้รับการช่วยเหลือและเลี้ยงในศูนย์อนุรักษ์ จนอายุ 7 ปี จึงถูกปล่อยกลับคืนสู่ป่าธรรมชาติ โดยในปีที่ 5 ที่อยู่ในป่าพบว่า 3 เดือนก่อนเสียชีวิต ช้างมีอาการอ่อนแรง ไม่ทันฝูง จึงถูกนำกลับมารักษา แต่ก็เสียชีวิตในเวลา ไม่นาน ผลการตรวจชิ้นเนื้อปอด พบเชื้อ *M. tb* (36)

ในปี พ.ศ. 2560 มีรายงานจากประเทศอินเดีย ระบุว่ามีการติดเชื้อวัณโรคในช้าง 3 เชือก วินิจฉัยด้วยวิธี PCR/sequencing จากตัวอย่างเนื้อเยื่อหลังการเสียชีวิต ซึ่งสรุปได้ว่าน่าจะมีต้นตอของเชื้อมาจากมนุษย์ไปสู่ช้าง เป็น reverse zoonosis ทำให้เกิดการระบาดของเชื้อในสัตว์ป่า (37)

ในปี พ.ศ. 2563 ในประเทศไทย มีรายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้างเอเชีย (*E. maximus*) โดยวินิจฉัยด้วยวิธี IGRA ที่ถูกพัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกแยะระหว่างการติดเชื้อ MTBC และ NTM ผลการวินิจฉัยพบว่ามีช้าง จำนวน 20 เชือก ที่ไม่ติดเชื้อ MTBC และ NTM และพบว่ามีช้างติดเชื้อ MTBC และ/หรือ NTM จำนวน 18 เชือก (17)

จากรายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง โดยส่วนมากจะพบในช้างเลี้ยง ซึ่งสาเหตุหลักของการติดเชื้อ *M. tb* ของช้าง มักมาจากการสัมผัสอย่างใกล้ชิดกับมนุษย์ที่มีการติดเชื้ออยู่แล้ว ซึ่งจะสามารถแพร่เชื้อไปยังช้างได้ และช้างตัวที่ได้รับเชื้อก็สามารถเป็นพาหะในการแพร่กระจายเชื้อไปยังช้างเชือกอื่น หรือสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่อยู่บริเวณใกล้เคียง หรือมีโอกาสในการสัมผัสกัน อาจส่งผลให้เกิดการระบาดระหว่างฝูงได้ หรือมีการแพร่กระจายเชื้อกลับไปยังมนุษย์ได้ (3, 39, 43, 44)

ตารางที่ 1 รายงานการติดเชื้อวัณโรคในช้าง

ปีที่รายงาน	จำนวนช้างทั้งหมด	จำนวนช้างที่ติดเชื้อวัณโรค	ประเทศ	วิธีการวินิจฉัย	อ้างอิง
2539-2553	50	49	สหรัฐอเมริกา	Bacteria culture	(39)
2548	6	6	สวีเดน	Bacteria culture, Post-mortem	(42)
2553	4	4	ไทย	Elephant TB Stat-Pak, Bacteria culture และ PCR sequencing	(15)
2556	1	1	เคนยา	Bacteria culture	(36)
2557	80	29	ลาว	Elephant TB Stat-Pak	(45)
2558	115	15	เนปาล	Elephant TB Stat-Pak และ MAPIA	(46)
2559	14	14	มาเลเซีย	Elephant TB Stat-Pak และ DPP VetTB	(47)
2560	3	3	อินเดีย	Post-mortem, PCR amplification และ sequencing from tissue samples	(48)
2563	60	18	ไทย	In-house IGRA และ DPP VetTB	(17)

## 2.4.2 วิธีการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง

### 2.4.2.1 การเพาะเชื้อจากน้ำล้างวง (Trunk wash culture)

การเพาะเชื้อจากน้ำล้างวง เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ในการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง (24) อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างน้ำล้างวงทำได้เฉพาะกับช้างที่ถูกฝึกแล้วเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ทำให้ความไวของวิธีนี้ต่ำและยังเป็นวิธีที่ให้ผลช้าเนื่องจากใช้ระยะเวลาในการเพาะเชื้อนาน อีกทั้งผลการตรวจวินิจฉัยขึ้นกับคุณภาพของตัวอย่างที่เก็บมาได้ นอกจากนี้ในประเทศไทยยังไม่มีห้องปฏิบัติการมาตรฐานสำหรับการเพาะแยกเชื้อวัณโรคสำหรับช้างโดยตรงและยังสามารถวินิจฉัยได้เฉพาะระยะที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น (36, 37) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีที่สะดวกและสามารถตรวจวินิจฉัยได้ทั้งระยะที่แสดงอาการและระยะแฝง

### 2.4.2.2 การตรวจทางเซรุ่มวิทยา (Serological test)

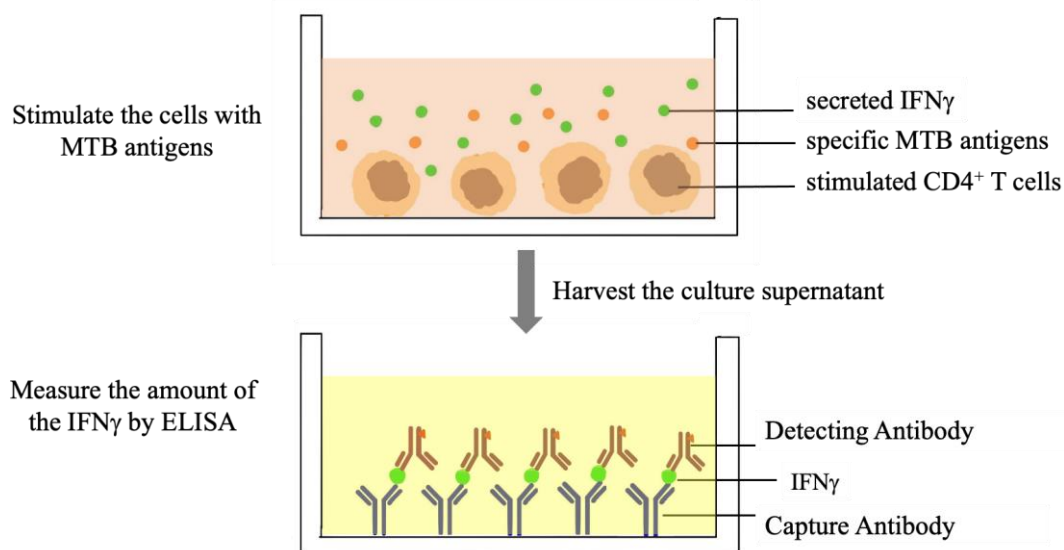
การตรวจทางเซรุ่มวิทยาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยวัณโรคในช้างร่วมกับวิธีการเพาะเชื้อจากน้ำล้างวงช้าง โดยวิธีนี้อาศัยหลักการตรวจหาระดับแอนติบอดีในเซรุ่มตัวอย่างที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ MTBC (6) ในปัจจุบันได้อาศัยหลักการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อวัณโรคมาพัฒนาการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง ทำให้วิธีการตรวจภายในห้องปฏิบัติการ 1 วิธี และชุดตรวจพร้อมใช้ 2 รูปแบบ ได้แก่ Multiantigen print immunoassay (MPIA), Elephant TB Stat-Pak และ Dual-path platform VetTB test (DPP VetTB) การตรวจดังกล่าวอาศัยหลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี (immunochromatographic assay) โดยเทคนิค MPIA เป็นวิธีการตรวจภายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เครื่องพิมพ์อัตโนมัติพิมพ์แอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. tb* และ *M. bovis* ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส แล้วจึงนำมาใช้ตรวจเซรุ่มตัวอย่าง เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อแอนติเจนในเซรุ่มตัวอย่าง (49) และอีก 2 รูปแบบ คือ Elephant TB Stat-Pak และ DPP VetTB เป็นการตรวจวัดปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้วิธีการ rapid lateral flow assay โดย DPP VetTB เป็นชุดตรวจที่มีการพัฒนาต่อจากชุดตรวจ Elephant TB Stat-Pak และ MPIA แต่แตกต่างกันที่แอนติเจนที่ถูกตรึงอยู่บน แผ่นไนโตรเซลลูโลส โดย DPP VetTB ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้สามารถนำไปใช้ภาคสนาม และเพิ่มความแม่นยำ โดยจะมีการพิมพ์แถบโปรตีน MPB83 ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อ *M. szulgai* และ ESAT6/CFP10 fusion protein ซึ่งเป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อ MTBC จากนั้นมีการใช้ชุดตรวจนี้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อในช้าง จำนวน 14 เชือก ที่ติดเชื้อ *M. tb* พบว่าให้ผลบวก ก่อนที่จะเพาะแยกเชื้อ

ได้จากน้ำล้างวง เป็นเวลาหลายเดือน/ปี (50) แต่ Elephant TB Stat-Pak จะประกอบด้วย แอตนติเจนเพียง 1 แอตน คือ การผสมแอนติเจนต่อเชื้อ *M. tb* และ *M. bovis* (6) ชุดตรวจทั้ง 3 วิธี ที่พัฒนามาใช้สำหรับช้างเป็นการตรวจวินิจฉัยที่ให้ผลเร็ว สามารถตรวจปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน จากตัวอย่างเชรุ่มหรือพลาสมา ในระยะเวลาเพียง 20 นาที มีความจำเพาะ 95% ถึง 100% และความไว 100 % สามารถระบุการติดเชื้อวัณโรคและไม่ติดเชื้อวัณโรคได้อย่างถูกต้อง (7)

อย่างไรก็ตาม พบปัญหาจากการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. tb* ด้วยชุดตรวจเหล่านี้ โดยพบว่าช้างบางเชือกติดเชื้อ *M. tb* แต่ไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนหลัก คือ ESAT6 และ CFP10 ที่ตรึงอยู่ในชุดตรวจ (50) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช้างด้วย Elephant TB Stat-Pak อาจให้ผลบวกปลอม/ลวงได้ ในกรณีของเชื้อกลุ่ม NTM ซึ่งเกิดจาก cross reactivity ของแอนติเจนบางตัวในชุดตรวจ เช่น MPB83 เป็นต้น (7) ยิ่งไปกว่านั้น มีรายงานเกี่ยวกับการตรวจแอนติบอดีในช้าง พบว่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อวัณโรคของแม่ช้าง ที่ตั้งครรภ์ไปสู่ลูกช้าง (51, 52) จากการติดตามลูกช้างที่เกิดจากแม่ที่เป็นวัณโรคและตรวจเพาะเชื้อ เป็นเวลา 11 ปี ไม่พบว่าลูกช้างมีอาการป่วยและการเพาะเชื้อให้ผลลบมาตลอด ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการตรวจพบแอนติบอดีในลูกช้างเป็นแอนติบอดีที่ได้รับมาจากแม่ ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อของลูกช้าง (52)

#### 2.4.2.3 การทดสอบ Interferon-gamma release assays (IGRA)

IGRA เป็นการตรวจวินิจฉัยวัณโรค โดยใช้ตัวอย่างเลือด เป็นวิธีการตรวจสอบด้วยการวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค ที่เกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ CMIR ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หลังจากเชื้อกลุ่ม MTBC เท่านั้น โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN $\gamma$  โดย Memory cell ของ PBMCs ของผู้ป่วยวัณโรค (6, 8, 9) จากนั้นจะทำการวัดปริมาณ IFN $\gamma$  โดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ดังภาพที่ 1



### ภาพที่ 1 การทดสอบ IGRA

การทดสอบสามารถทำได้โดยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค หากสัตว์เคยได้รับเชื้อมาก่อนจะสามารถกระตุ้น CD4<sup>+</sup> T cell ให้หลั่ง IFN $\gamma$  หลังจากการกระตุ้นเซลล์เป็นเวลาหลายวันทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการตรวจวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ด้วยเทคนิค ELISA

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ ได้มีการใช้หลักการ IGRA โดยแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ T-spot และ Quantiferon TB gold in tube (QFT) ชุดตรวจแบบ T-spot จะเป็นการกระตุ้น PBMCs ด้วยโปรตีน ESAT6 หรือ CFP10 และใช้ไมโตเจนกระตุ้น PBMCs ในกลุ่มควบคุมบวก ส่วนกลุ่มควบคุมลบ (Antigen free nil) จะไม่มีการใส่สารกระตุ้น PBMCs ชุดตรวจแบบ QFT จะเป็นการกระตุ้น Whole blood ด้วยเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6, CFP10 และ TB7.7 และมีกลุ่มควบคุมบวกและกลุ่มควบคุมลบเช่นเดียวกับแบบ T-spot (13) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิค IGRA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ได้แก่ โค, กวาง, สิงโต, ควายป่าแอฟริกา, แรดขาว และหมาป่าแอฟริกา (53-58) ดังตารางที่ 2

ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคด้วยหลักการ IGRA นั้น มีข้อดี คือ มีความไวสูง และมีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tb* มากกว่าการทดสอบทางผิวหนัง และไม่เกิดผลบวกลวงจากการได้รับวัคซีน BCG หรือติดเชื้อ NTM (59) นอกจากนี้ IGRA ยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงได้ แต่ไม่สามารถแยกระหว่างการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงกระจาย

หรือการป่วยเป็นวัณโรค กับการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงได้ (60) และยังมีข้อจำกัดในด้านตัวอย่างเลือด ซึ่งตัวอย่างเลือดจะต้องถูกกระตุ้นภายในระยะเวลา 8-24 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่างเลือด เพราะอาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการวินิจฉัยและต้องทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ และบุคคลที่ทำการทดลองจะต้องถูกอบรมและฝึกฝนมาก่อน (61)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิค IGRA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคของช้างเอเชีย (*E. maximus*) และช้างแอฟริกา (*L. africana*) (15, 16, 17) ในปี พ.ศ. 2556 มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้คู่มอโนคลอนอลแอนติบอดีในการตรึง (capture antibody) และตรวจวัด (detecting antibody) พบว่าสามารถวัดปริมาณ elephant IFN $\gamma$  (eIFN $\gamma$ ) ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 1 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (15) ในเวลาต่อมาได้มีการใช้วิธี Sandwich ELISA เช่นกัน แต่มีการใช้พอลิคลอนอลแอนติบอดีในการตรึง และตรวจวัด พบว่าสามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 100 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (16) และในปี พ.ศ. 2561 ทรงเกียรติ ทรงธรรมานุกภาพ มีการใช้พอลิคลอนอลแอนติบอดีในการตรึง และมอโนคลอนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจวัด สามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ที่ระดับ 0.1-10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และยังเป็นวิธีการวินิจฉัยที่สามารถจำแนกระหว่างการติดเชื้อ MTBC และ NTM ได้อีกด้วย (17) อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมายังมีข้อด้อย คือ ต้องมีการปั่นเก็บ PBMCs และใช้เวลานาน 48-72 ชั่วโมง ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง IFN $\gamma$  เนื่องจากมีการใช้โปรตีนเป็นแอนติเจนในการกระตุ้น PBMCs นอกจากนี้ IGRA สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในช้างยังไม่มีจำหน่าย และยังเป็นวิธียากต่อผู้ใช้งาน

**ตารางที่ 2** การพัฒนา IGRA สำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในสัตว์

สัตว์	ปี (พ.ศ.)	อ้างอิง
โค	2544	(56)
กวาง	2551	(58)
สิงโต	2555	(57)
ช้างเอเชีย และ ช้างแอฟริกา	2556	(15)
ช้างเอเชีย	2559	(16)
ควายป่าแอฟริกา	2561	(55)
แรดขาว	2562	(54)
หมาป่าแอฟริกา	2562	(53)
ช้างเอเชีย	2563	(17)

## 2.5 IGRA สำหรับการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์

ชุดทดสอบ QFT ได้รับการรองรับโดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ IGRA และตรวจวัดปริมาณ IFN $\gamma$  จากตัวอย่างเลือด ที่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ถ้าเคยติดเชื้อวัณโรคหรือกำลังติดเชื้ออยู่ จะถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรคในหลอดทดลอง (62) โดยภายในหลอดทดลองจะประกอบด้วยแอนติเจนที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค คือ เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tb* มากกว่าการทดสอบทางผิวหนัง และไม่เกิดผลบวกลวงจากการได้รับวัคซีน BCG หรือติดเชื้อ NTM นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงได้ตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโลก และมีรายงานการใช้งานในการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคโดยมีค่าความไวร้อยละ 93.02 อีกทั้งเป็นชุดตรวจที่ใช้เวลาที่ไม่นาน และง่ายต่อผู้ใช้งาน (63)

### 2.5.1 ไมโตเจน (Mitogen)

ไมโตเจน จัดเป็นสารที่สามารถกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะ T และ B lymphocyte ได้อย่างไม่จำเพาะ โดยความสามารถในการกระตุ้นเซลล์ ไม่ได้ขึ้นอยู่กับ Ig บน B lymphocyte หรือ TCR บน T lymphocyte จึงแตกต่างจาก immunogen โดยไมโตเจนจะไม่มีจำเพาะต่อ B หรือ T cell clone ตัวใด โดยผลของการกระตุ้น B และ T lymphocyte ด้วยไมโตเจนจะเกิดเป็น polyclonal activation ซึ่งไมโตเจนทำให้เกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว



โดยสารบางชนิดสามารถกระตุ้นได้เฉพาะ T lymphocyte เช่น concanavalin A (conA), phytohemagglutinin (PHA) และสารบางชนิดสามารถกระตุ้นได้เฉพาะ B lymphocyte เช่น lipopolysaccharide (LPS) และสารบางชนิดสามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B lymphocyte เช่น pokeweed mitogen (PWM) จากหลักการนี้ จึงสามารถนำไมโตเจนมาใช้ในการทดสอบความสามารถของเซลล์ในการถูกกระตุ้นและดูการตอบสนองของเซลล์ได้ (64)

### 2.5.2 Purified protein derivative (PPD)

PPD คือ โปรตีนจากเชื้อ *M. tb* โดยทำการเพาะเชื้อวัณโรคใน synthetic fluid medium ที่ไม่มีโปรตีน ภายหลังจากเวลา 5-6 สัปดาห์ ทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและกรองแยกเชื้อออก จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกรองผ่าน collodion membrane และทำให้เป็นผงด้วยกระบวนการ trichloroacetic acid precipitate protein PPD เป็นโปรตีนที่ถูกใช้ในการทดสอบ tuberculin skin test (TST) เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค โดยพิจารณาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันไวเกินชนิดล่าช้า (delayed type hypersensitivity) (65) อย่างไรก็ตาม โปรตีนนี้ไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างการติดเชื้อ *M. tb* กับผู้ที่เคยได้รับวัคซีน BCG หรือผู้ที่มีประวัติการสัมผัสกับเชื้อในกลุ่ม NTM นอกจากนี้ PPD จากเชื้อ *M. bovis* (PPDB) และ PPD จากเชื้อ *M. avium* (PPDA) ถูกใช้เป็นตัวระบุความแตกต่างในการทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ MTBC และ NTM ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค (11, 15, 16)

### 2.5.3 โปรตีน ESAT6 และ CFP10 มหาวิทยาลัย

6-kDa early secretory antigenic target (ESAT6) และ 10-kDa culture filtrate protein (CFP10) เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หลังจากเชื้อกลุ่ม MTBC เท่านั้น และไม่พบในกลุ่ม NTM ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดจากการถอดรหัสของยีน Rv3875 และ Rv3874 ของ *M. tb* ตามลำดับ โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN $\gamma$  โดย Memory cell ของ Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของผู้ป่วยวัณโรค (12) นอกจากนี้ ESAT6 และ CFP10 ยังเป็นแอนติเจนที่สำคัญต่อการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง และถูกใช้ในชุดตรวจ MAPIA (Stavri et al, 2010) อีกทั้งสามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างผู้ที่เคยได้รับวัคซีน Bacillus Calmette Guerin (BCG) หรือเคยสัมผัสกับเชื้อกลุ่ม NTM ได้ด้วย (66)

#### 2.5.4 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 (Overlapping peptides)

เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นเพปไทด์ที่เกิดจากการออกแบบสายเพปไทด์ โดยมีลำดับกรดอะมิโนครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ซึ่งมีความยาวของสาย ที่แตกต่างกัน และ/หรือมีการซ้อนทับกันของกรดอะมิโน มีการศึกษาการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ในการกระตุ้นการตอบสนองของ T cell ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยวัณโรค ด้วยเทคนิค IGRA พบว่าการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 มีประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงเทียบเท่ากับการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 และเพปไทด์ยังมีข้อได้เปรียบในด้านการผลิตที่เร็วกว่า และราคาต่ำกว่า (67) อย่างไรก็ตามอาจจำเป็นต้องใช้เพปไทด์จำนวนมากหลายสาย เพื่อให้ครอบคลุมความหลากหลายของ MHC ในสิ่งมีชีวิตหลายสายพันธุ์ (68) จากนั้นมีการคัดกรองกลุ่มของเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. tb* โดยทำการทดลองกับตัวอย่างที่ได้จากผู้ที่เคยมีผลบวกต่อการติดเชื้อ *M. tb* ผลการทดสอบพบว่า การใช้เพปไทด์สังเคราะห์มีความจำเพาะ 87.5% และมีความไว 93.1% ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพที่ดี นับว่าเป็นทางเลือกใหม่ในการวินิจฉัยและคัดกรองการติดเชื้อวัณโรค ยิ่งไปกว่านั้น การทดสอบดังกล่าวยังสามารถจำแนกระหว่างบุคคลที่ติดเชื้อวัณโรคกับผู้ที่ได้รับวัคซีน BCG ได้ (69) จากนั้นมีรายงาน การใช้เพปไทด์สังเคราะห์ในการกระตุ้นเซลล์ ภูมิคุ้มกัน ด้วยเทคนิค enzyme-linked immunospot (ELISPOT) เพื่อวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค พบว่ามีความจำเพาะมากกว่าการใช้ PPD อย่างไรก็ตาม การใช้เพปไทด์สังเคราะห์มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้โปรตีนที่เชื่อมกันระหว่าง ESAT6 และ CFP10 (70)

#### 2.5.5 การวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในสัตว์ด้วยชุดตรวจ QFT

ในปี พ.ศ. 2561 ได้มีการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในควายป่าแอฟริกา (*African buffaloes: Syncerus caffer*) ที่เกิดจากการติดเชื้อ *M. bovis* ด้วยชุดตรวจ QFT และวัดหาปริมาณ IFN $\gamma$  ด้วยเทคนิค ELISA (Qiagen cattletype IFN $\gamma$  ELISA) เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยวิธีทดสอบทางผิวหนัง (single comparative intradermal skin test: SCITI) พบว่าการตรวจด้วยวิธี IGRA สามารถแยกระหว่างตัวที่มีการติดเชื้อวัณโรค และไม่ติดเชื้อวัณโรค โดยได้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจยืนยันด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการตรวจก่อนหน้านี้ โดยการตรวจด้วย IGRA สามารถระบุได้ว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อวัณโรคมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่

ไม่ได้ติดเชื้อวัณโรค ( $p < 0.1$ ) (55) และในปี พ.ศ. 2562 ได้มีการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. bovis* ด้วยชุดตรวจ QFT และวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ด้วยเทคนิค ELISA ในหมาป่าแอฟริกา (*African wild dog: Lycaon pictus*) พบว่า สามารถวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 51 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (53) และในแรดขาว (*White rhinoceros: Ceratotherium simum*) พบว่าสามารถวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ได้ต่ำสุดอยู่ที่ 21 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (54) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในสัตว์ชนิดอื่น ด้วยการใช้ชุดตรวจ QFT ร่วมกับ IFN $\gamma$ -ELISA ถือเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคได้



### บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มอโนนิวเคลียร์จากเลือดส่วนปลาย Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

หลังจากทำการแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือดข้าง ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน Complete RPMI-1640 ซึ่งประกอบด้วย Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) (GE Healthcare, USA) ที่มีการเติม 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) เซรัมลูกวัว (Fetal bovine serum; FBS) (Gibco, USA) และ 1% ยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin (Hyclone, USA) และมี Beta-Mercaptoethanol (Gibco, USA) ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์ 95%

#### 3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) แบบ Sandwich ELISA สำหรับตรวจวิเคราะห์ elephant IFN $\gamma$ (eIFN $\gamma$ ) (17)

ทำการตรึง Goat anti-rabbit IgG Fc fragment specific antibody (Jackson Immuno-research, USA) ที่อัตราการเจือจาง 1:1,000 ในสารละลาย 1X Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) บนจานหลุมแบบ 96 หลุม ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบละลายแอนติบอดีที่เคลือบออกจากนั้นทำการล้างด้วย Washing buffer (1XPBS + 0.05% Tween20: PBST) ปริมาตรหลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นปิดที่ว่างของหลุม โดยเติม Blocking buffer (10% FBS ใน 1XPBS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วย PBST จากนั้นเติม Rabbit anti-elephant Interferon gamma antibody (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. วันดี ยินดียั่งยืน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) ที่อัตราการเจือจาง 1: 5,000 ในสารละลาย 10% FBS ลงไปในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 3 ครั้ง

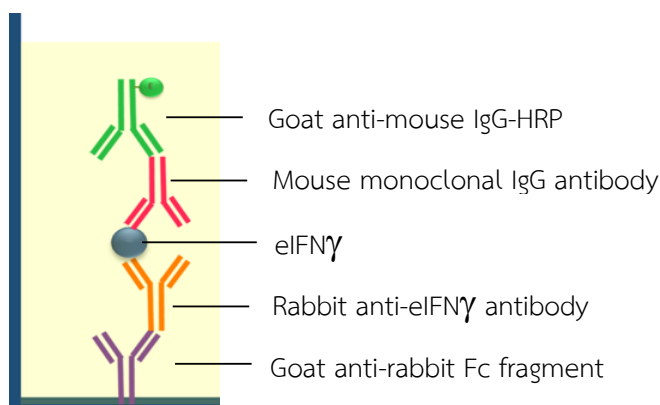
สร้างกราฟมาตรฐาน โดยใช้ recombinant elephant IFN $\gamma$  (reIFN $\gamma$ ) ความเข้มข้น 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5 และ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม พร้อมกับการเติมตัวอย่างอาหารเลี้ยงเซลล์ PBMCs ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่าง ๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในกล่องที่มีความชื้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน ในวันต่อมา ทำการล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน of เซลล์ไฮบริโดมาโคลน F1C3 #13 ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างแต่ละหลุมด้วย PBST จำนวน 5 ครั้ง และทำการบ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG (Goat anti-mouse IgG conjugated with HRP, Jackson Immunosearch, USA) ที่อัตราการเจือจาง 1:10,000 ในสารละลาย 10% FBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังจากนั้นล้างแต่ละหลุมจำนวน 5 ครั้ง และเติมสารละลายซับสเตรท (TMB substrate) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลายซัลฟิวริก (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 450 และ 620 นาโนเมตร ตามลำดับ และคำนวณหาความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection: LOD) ดังภาพที่ 2 (17)

$$\text{Limit of detection (LOD)} = B_0 + 3 \text{ SD}$$

$B_0$  = ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 และ 620 นาโนเมตร

ของ Blank

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ Blank



ภาพที่ 2 แผนภาพการพัฒนาวิธีตรวจวัด eIFN $\gamma$  ของช้างโดยวิธี Sandwich ELISA

### 3.3 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด จำนวน 39 เชือก (รายละเอียดดังภาคผนวก) ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (จังหวัดชลบุรี) และจากโครงการคชอาณาจักร (จังหวัดสุรินทร์) ซึ่งอยู่ในความดูแลขององค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยมีรหัสโครงการวิจัยในสัตว์ คือ BT-Animal 1/2562 ช้างที่ใช้ในการทดลองทุกเชือกเป็นช้างที่เคยได้รับการตรวจการติดเชื้อ MTBC และ NTM ด้วยวิธี IGRA เดิม ประกอบด้วย ช้างที่มีผลตรวจพบการติดเชื้อ MTBC (MTBC infection positive) จำนวน 17 เชือก ช้างที่การติดเชื้อในกลุ่ม NTM (NTM infection positive) จำนวน 2 เชือก และช้างที่ไม่พบการติดเชื้อ MTBC และ NTM (MTBC infection negative) จำนวน 19 เชือก และช้างที่คาดว่าจะติดเชื้อ MTBC (MTBC infection suspected) จำนวน 1 เชือก

### 3.4 การตรวจวินิจฉัยโรคในช้างด้วยวิธี Interferon gamma release assay (IGRA)

#### 3.4.1 การแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือดช้าง

แยก PBMCs จากตัวอย่างเลือดช้าง 10 มิลลิลิตร ที่เก็บในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (BD Vacutainer<sup>®</sup>, Becton Dickinson, USA) ภายใน 24 ชั่วโมง โดยการปั่นเลือดที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 400xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์ดูดชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวใสในหลอดปลอดเชื้อ และเติม 1XPBS จนมีปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันอย่างระมัดระวัง ใช้ปิเปตต์ดูดเลือดทั้งหมดปล่อยลงบนชั้น Ficoll<sup>®</sup>-Paque Premium media

solution 1.077 (GE Healthcare) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมไว้ในหลอดปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร อย่างช้า ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 400xg ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะเกิดการแยกชั้นขององค์ประกอบเลือด เซลล์ PBMCs ที่ต้องการจะอยู่ระหว่างชั้นพลาสมาและชั้นของ Ficoll®-Paque media เก็บส่วนดังกล่าวด้วยปิเปตต์ใส่ลงในหลอดปลอดเชื้อ จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ PBMCs ด้วย 1XPBS ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 400xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำการดีดตะกอนให้กระจาย เติม 1XPBS ลงไป 10 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วรอบ 400xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและดีดตะกอนให้กระจาย เมื่อได้ตะกอนเซลล์ ทำการเติม Red blood cell lysis solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจือปน ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา เติม 1XPBS จนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 400xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 1 มิลลิลิตร (Completed RPMI-1640 ที่มี Beta-mercaptoethanol 0.05 มิลลิโมลาร์)

### 3.4.2 กระตุ้น PBMCs ด้วยไมโตเจนหรือโปรตีนแอนติเจน

เก็บตัวอย่างเลือดข้างจำนวน 20 ซีซี จาก 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 ซีซี ได้แก่ ข้างที่มีประวัติผลตรวจ IGRA เป็นบวก และที่มีประวัติผลตรวจ IGRA เป็นลบ และทำการแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือด ตามข้อ 3.4.1

เลี้ยงเซลล์ PBMCs ในจานแบบ 96 หลุม (Thermo Fisher Scientific, USA) จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม โดยมีปริมาตรสุดท้าย 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นกระตุ้นเซลล์ PBMCs ด้วยไมโตเจนหรือโปรตีนแอนติเจน ได้แก่ Concanavalin A (ConA) (Sigma Aldrich, USA) , PPDB เป็นโปรตีนที่หลังจากเชื้อ *M. bovis* (IDvet, France), PPDA เป็นโปรตีนที่หลังจากเชื้อ *M. avium* (IDvet, France), รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ที่ผลิตโดย *Escherichia coli* (*E. coli*) (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. วันดี ยินดียั่งยืน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา

จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเม็ดเลือดขาวข้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA ตามข้อ 3.2

### 3.4.3 เกณฑ์การแปลผลการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในข้างด้วยวิธี IGRA

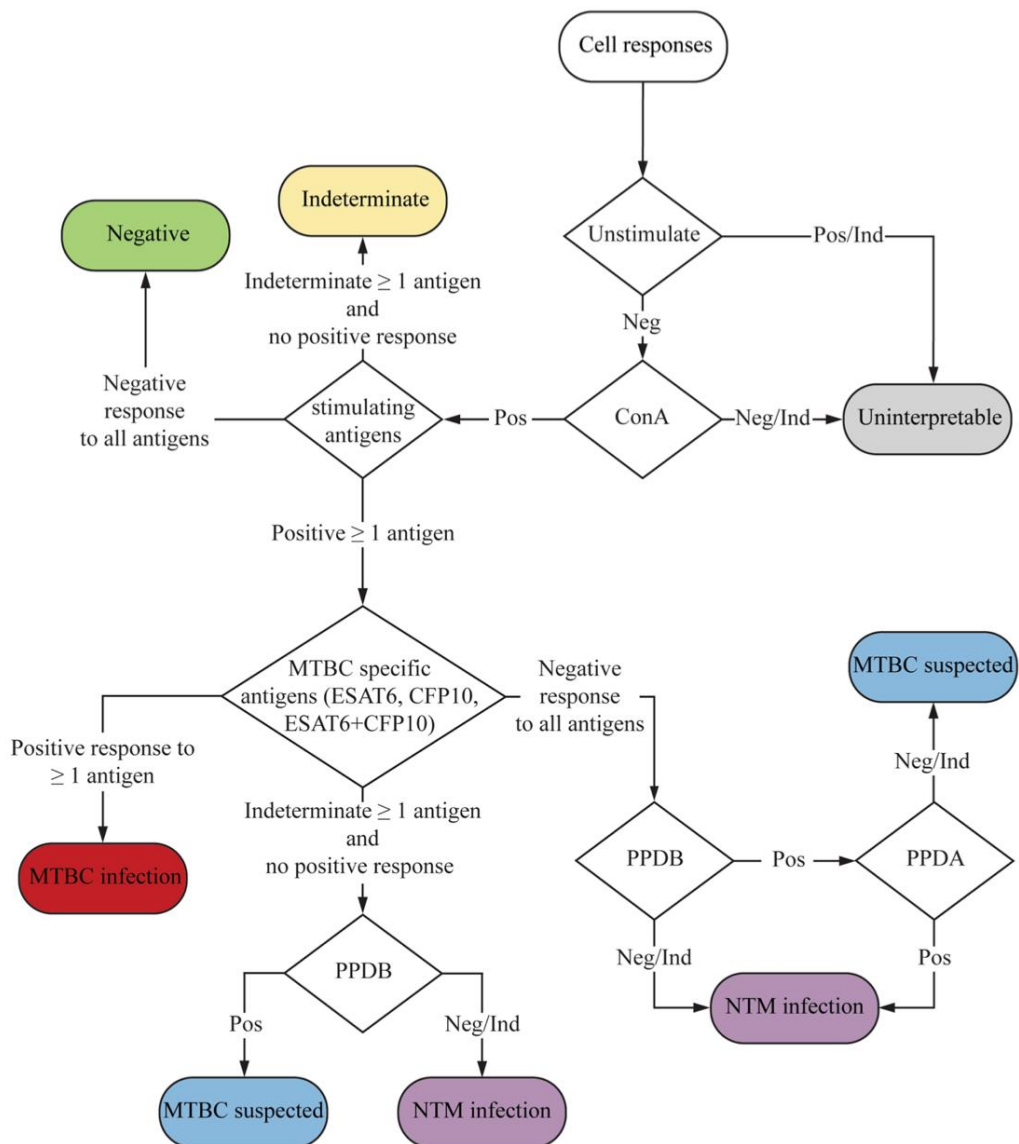
เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเม็ดเลือดขาวข้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA ตามข้อ 3.2 ทำการแปลผลตามเกณฑ์ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย ทรงเกียรติ ทรงธรรมานุภาพ ซึ่งการแปลผลการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM จะต้องดูการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือโปรตีนแอนติเจนที่สามารถวัดได้จากปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ โดยวัดการตอบสนองของ PBMCs โดยใช้ค่า LOD ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของแต่ละการทดลองเป็นค่า cutoff ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ 1) Positive (Pos) เมื่อปริมาณ eIFN $\gamma$  มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า cutoff แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแอนติเจนนั้นสามารถกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  2) คือ Negative (Neg) คือ ไม่สามารถวัดค่าปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแอนติเจนนั้นไม่มีผลในการกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  3) คือ Indetermined (Ind) (ตอบไม่ได้ว่าตอบสนองหรือไม่) เนื่องจากค่าปริมาณ eIFN $\gamma$  อยู่ระหว่างค่า cutoff กับค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าโปรตีนแอนติเจนนั้นมีผลในการกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ในข้างเชือกนั้น (17) ดังตารางที่ 3

ผลการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี IGRA จะต้องอาศัยผลการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนหรือโปรตีนแอนติเจนชนิดต่าง ๆ โดยจำแนกสถานะการติดเชื้อวัณโรคออกเป็น 5 สถานะ ได้แก่ 1) MTBC infection negative, 2) MTBC infection positive, 3) MTBC infection suspected, 4) NTM infection positive และ 5) Indeterminate โดยใช้เกณฑ์การแปลผลจากแผนผัง ดังภาพที่ 3 (17)



ตารางที่ 3 แปลผลการตอบสนองของ PBMCs โดยใช้ค่า cutoff ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

Criteria	PBMCs status
$eIFN\gamma \geq \text{cutoff}$	Positive (Pos)
$eIFN\gamma < \text{lowest conc. of the std curve}$	Negative (Neg)
$\text{lowest conc. of the std curve} < eIFN\gamma < \text{cutoff}$	Indeterminate (Ind)



ภาพที่ 3 แผนผังการแปลผลการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช้างด้วยวิธี IGRA (17)

### 3.5 การคัดกรองเพปไทด์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้าง

#### 3.5.1 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10

ใช้เพปไทด์สังเคราะห์ที่ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 (Overlapping peptides) โดยการสังเคราะห์เพปไทด์ความยาว 15-mers ที่มีจำนวนกรดอะมิโนซ้อนทับ 11 ตัว ของโปรตีน ESAT6 (E1-E21) และ CFP10 (C1-C23) ดังภาพที่ 4 และ 5 (JPT Peptide Technologies GmbH - Volmerstrasse, Germany) ซึ่งความบริสุทธิ์ของเพปไทด์ที่สังเคราะห์ได้มีค่ามากกว่า 95% ทำการละลายเพปไทด์ด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) โดยแต่ละสายให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งานจะทำการเจือจางใน Completed RPMI-1640 ที่ประกอบด้วย 0.05 มิลลิโมลาร์ Beta-mercaptoethanol ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาว PBMCs ดังข้อ 3 และมี DMSO ไม่เกิน 1%

Peptide No.	1 <sup>st</sup> aa		last aa
1	1	MTEQQWNFAGIEAAA	15
2	5	QWNFAGIEAAASAIQ	19
3	9	AGIEAAASAIQGNVT	23
4	13	AAASAIQGNVTSIHS	27
5	17	AIQGNVTSIHSLLDE	31
6	21	NVTSIHSLLDEGKQS	35
7	25	IHSLLDEGKQSLTKL	39
8	29	LDEGKQSLTKLAAAW	43
9	33	KQSLTKLAAAWGGSG	47
10	37	TKLAAAWGGSGSEAY	51
11	41	AAWGGSGSEAYQGVQ	55
12	45	GSGSEAYQGVQKWD	59
13	49	EAYQGVQKWDATAT	63
14	53	GVQKWDATATELNN	67
15	57	KWDATATELNNALQN	71
16	61	TATELNNALQNLART	75
17	65	LNNALQNLARTISEA	79
18	69	LQNLARTISEAGQAM	83
19	73	ARTISEAGQAMASTE	87
20	77	SEAGQAMASTEGNVT	91
21	81	QAMASTEGNVTGMFA	95

ภาพที่ 4 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ประกอบด้วยเพปไทด์จำนวน 21 สาย (E1-E21)

Peptide No.	1 <sup>st</sup> aa		last aa
1	1	MAEMKTDAAATLAQEA	15
2	5	KTDAATLAQEAGNFE	19
3	9	ATLAQEAGNFERISG	23
4	13	QEAGNFERISGDLKT	27
5	17	NFERISGDLKTQIDQ	31
6	21	ISGDLKTQIDQVEST	35
7	25	LKTQIDQVESTAGSL	39
8	29	IDQVESTAGSLQGQW	43
9	33	ESTAGSLQGQWRGAA	47
10	37	GSLQGQWRGAAGTAA	51
11	41	GQWRGAAGTAAQAAV	55
12	45	GAAGTAAQAAVRFQ	59
13	49	TAAQAAVRFQEAAAN	63
14	53	AAVRFQEAAANKQKQ	67
15	57	RFQEAAANKQKQELDE	71
16	61	AANKQKQELDEISTN	75
17	65	QKQELDEISTNIRQA	79
18	69	LDEISTNIRQAGVQY	83
19	73	STNIRQAGVQYSRAD	87
20	77	RQAGVQYSRADEEQQ	91
21	81	VQYSRADEEQQALS	95
22	85	RADEEQQALSSQMG	98-G
23	86	ADEEQQALSSQMGF	98-GF

ภาพที่ 5 เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ประกอบด้วยเพปไทด์จำนวน 23 สาย (C1-C23)

### 3.5.2 การกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน

เก็บตัวอย่างเลือดช้างจำนวน 20 เชือก โดยเป็นช้างเชือกที่ได้ทำการตรวจการติดเชื้อ MTBC และ NTM ในข้อ 3.4.2

ทำการแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือด ตามข้อ 3.4.1 เลี้ยงเซลล์ PBMCs ในจานแบบ 96 หลุม (Thermo Fisher Scientific, USA) จำนวน  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม โดยมีปริมาตรสุดท้าย 150 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นกระตุ้นเซลล์ PBMCs ด้วย ConA, รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (แบบ 2 สาย, 3 สาย และ 4 สาย) โดยแต่ละสายใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวช้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA ตามข้อ 3.2

### 3.5.3 กระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10

เก็บตัวอย่างเลือดข้าง จำนวน 15 เชือก จากข้าง 2 กลุ่ม ได้แก่ ข้างที่ใช้ในการคัดกรอง เพปไทด์ จำนวน 7 เชือก และที่มีประวัติผลตรวจ IGRA แบบ PBMC culture จากการศึกษา ก่อนหน้า จำนวน 8 เชือก ทำการแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือด ตามข้อ 3.4.1

เลี้ยงเซลล์ PBMCs ตามข้อ 3.5.2 จากนั้นกระตุ้นเซลล์ PBMCs ด้วย ConA, รีคอมบิแนนท์ โปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพปไทด์ สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยแต่ละสายใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อ ไมโครลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 37 องศาเซลเซียส และ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเซลล์ เม็ดเลือดขาวข้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA ตามข้อ 3.2

### 3.5.4 การแปลผลการกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน

ผลการกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน สามารถแปลผลได้จากปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน ที่จำเพาะ โดยการแปลผลจะใช้ค่า LOD ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของแต่ละการทดลอง เป็นค่า cutoff ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ Positive (Pos) เมื่อปริมาณ eIFN $\gamma$  มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า cutoff แสดงให้เห็นว่าแอนติเจนนั้นสามารถกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  กรณีที่ 2 คือ Negative (Neg) คือ ไม่สามารถวัดค่าปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ แสดงให้เห็นว่า แอนติเจนนั้นไม่มีผลในการกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  และกรณีสุดท้าย คือ Indeterminate (ตอบไม่ได้ว่าตอบสนองหรือไม่) เนื่องจากค่าปริมาณ eIFN $\gamma$  อยู่ระหว่างค่า cutoff กับค่าต่ำสุด ของกราฟมาตรฐาน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแอนติเจนนั้นมีผลในการกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ในข้างเชือกนั้น ดังตารางที่ 3

การแปลผลการคัดกรองเพปไทด์ด้วยวิธี IGRA ประกอบด้วยผลการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน โดยจำแนกการตอบสนองของ PBMCs เป็น 3 สถานะ ได้แก่ 1) Negative response, 2) Positive response of ESAT6 และ 3) Positive response of CFP10 โดยใช้เกณฑ์การแปลผลดังตารางที่ 4

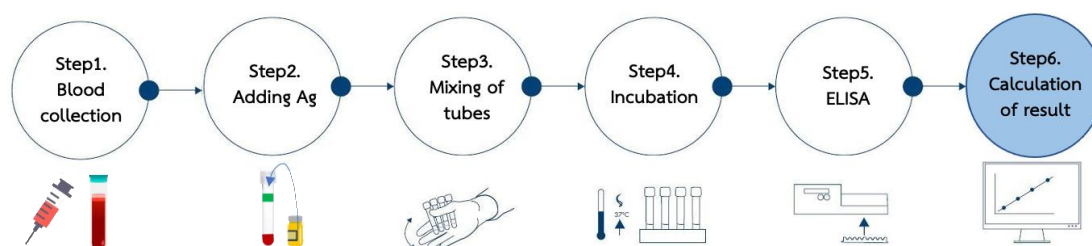
**ตารางที่ 4** การแปลผลการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์สายเดี่ยว และ/หรือ หลายสายรวมกัน

PBMC response		ConA	ESAT6	CFP10	Peptides
Negative response		+	-	-	-
Positive response	Of ESAT6	+	+	+/-	+
	Of CFP10	+	+/-	+	+

### 3.6 พัฒนาชุดทดสอบ IGRA โดยวิธี whole blood culture

#### 3.6.1 กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้างแบบ whole blood culture

นำตัวอย่างเลือดใส่ในหลอด Polypropylene Round-Bottom Tube ขนาด 5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาจากเลือดก่อน ด้วยการเติมไมโตเจน, โปรตีนแอนติเจนชนิดต่าง ๆ หรือเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 จากนั้นทำการเขย่าหลอดเพื่อผสมเลือดกับสารกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,000 - 4,000xg เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 6 จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA ตามข้อ 3.2



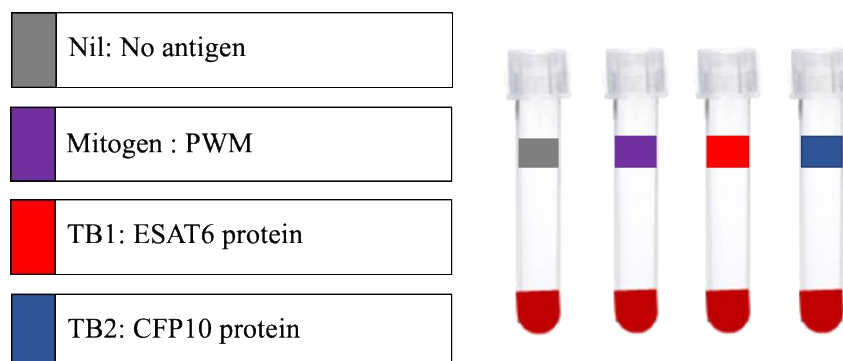
**ภาพที่ 6** ขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้างแบบ whole blood culture

### 3.6.2 การคัดเลือกไมโทเจน สำหรับกระตุ้นเซลล์ใน whole blood culture

คัดเลือกไมโทเจนเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นกลุ่มควบคุมบวกในการกระตุ้นแบบ whole blood culture ด้วยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้าง โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากเลือดก่อน ในช้างที่ทำการเลือกแบบสุ่ม จำนวน 10 เชือก ด้วยการเติมไมโทเจน ได้แก่ ConA, Pokeweed mitogen (PWM) (Sigma Aldrich, USA) และ ConA ร่วมกับ PWM โดยใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้างแบบ whole blood culture ตามข้อ 3.6.1

### 3.6.3 กระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

เก็บตัวอย่างเลือดช้าง จำนวน 15 เชือก โดยมาจาก 2 กลุ่ม ได้แก่ ช้างที่ถูกใช้ในขั้นตอนการคัดกรองเพปไทด์จำนวน 9 เชือก และช้างที่มีประวัติผลตรวจ IGRA แบบ PBMC culture จำนวน 6 เชือก ทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้าง โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกจากเลือดก่อน โดยแบ่งออกเป็น 4 หลอด ดังภาพที่ 7 ได้แก่ หลอดที่ 1 (Nil) ไม่มีสารกระตุ้น หลอดที่ 2 (Mitogen) ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 3 (TB1) และ 4 (TB2) ประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้างแบบ whole blood culture ตามข้อ 3.6.1

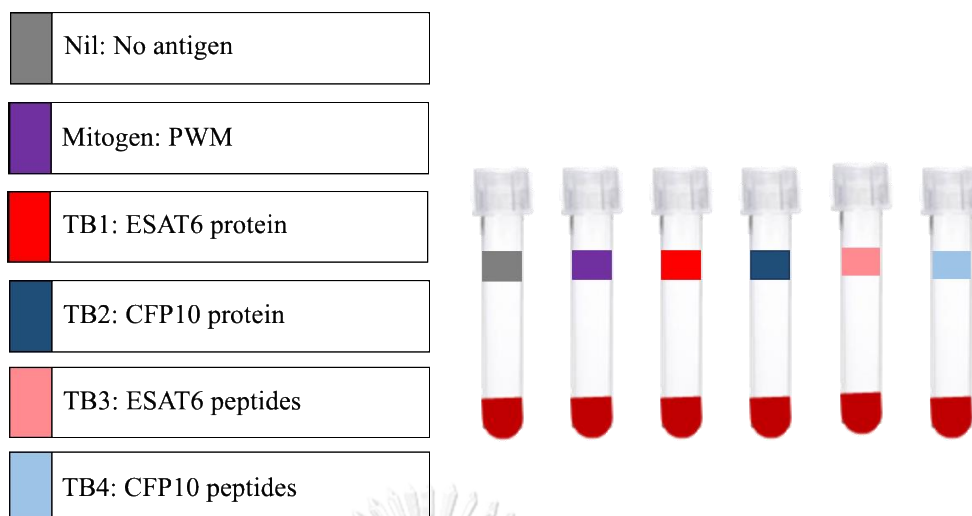


ภาพที่ 7 กระตุ้น PBMCs ในเลือดข้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

ชุดตรวจ IGRA แบบ whole blood culture ประกอบด้วย 4 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 Nil: ไม่มีสารกระตุ้น (หลอดสีเทา) หลอดที่ 2 Mitogen: ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดสีม่วง) หลอดที่ 3 TB1: รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ หลอดที่ 4 TB2: คอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดสีน้ำเงิน)

### 3.6.4 กระตุ้น PBMCs ในเลือดข้าง ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

เก็บตัวอย่างเลือดข้าง จำนวน 15 เข็อก ซึ่งเป็นข้างกลุ่มเดียวกับข้อ 3.5.3 ทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาจากเลือดก่อน โดยแบ่งออกเป็น 6 หลอด ดังภาพที่ 8 ได้แก่ หลอดที่ 1 (Nil) ไม่มีสารกระตุ้น หลอดที่ 2 (Mitogen) ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 3 (TB1) และ 4 (TB2) ประกอบด้วย รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 5 (TB5) ประกอบด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และหลอดที่ 6 (TB6) ประกอบด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ใช้ความเข้มข้นแต่ละสายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้างแบบ whole blood culture ตามข้อ 3.6.1



**ภาพที่ 8** กระตุ้น PBMCs ในเลือดช้าง ด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

ชุดตรวจ IGRA แบบ whole blood culture ประกอบด้วย 6 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 Nil: ไม่มีสารกระตุ้น (หลอดสีเทา) หลอดที่ 2 Mitogen: ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดสีม่วง) หลอดที่ 3 TB1: รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 4 TB2: คอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดสีน้ำเงิน) หลอดที่ 5 TB5: กลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 (หลอดสีชมพู) และหลอดที่ 6 TB6: กลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ใช้ความเข้มข้นแต่ละสายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หลอดสีฟ้า)

### 3.7 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลในงานวิจัยนี้จะวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้ One-way ANOVA ด้วยการทดสอบแบบสองทาง (Two-tailed test) และเปรียบเทียบข้อมูลเป็นคู่ (t-test) โดยให้ค่า *p-value* น้อยกว่า 0.05 ถือว่าข้อมูลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 9.0.0 (GraphPad Software, Incorporation, USA)



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด จำนวน 39 เชือก ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (จังหวัดชลบุรี) และจากโครงการคชอาณาจักร (จังหวัดสุรินทร์) ซึ่งอยู่ในความดูแลขององค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ โดยมีรายละเอียดการใช้ในแต่ละการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง

Elephant sample No.	IGRA โดยใช้ PBMC culture			IGRA โดยใช้ Whole blood culture		
	ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM (n=20)	คัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ (n=20)	ทดสอบประสิทธิภาพกลุ่มเพปไทด์ (n=15)	ทดสอบเพื่อคัดเลือกไมโตเจน (n=10)	ตรวจการติดเชื้อ MTBC (n=15)	ทดสอบประสิทธิภาพกลุ่มเพปไทด์ (n=15)
1	√	√	√	-	-	√
2	√	√	√	-	√	√
3	√	√	-	√	√	-
4	√	√	√	-	√	√
5	√	√	-	-	-	-
6	√	√	-	-	-	-
7	√	√	-	-	√	-
8	√	√	√	-	√	√

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

Elephant sample No.	IGRA โดยใช้ PBMC culture			IGRA โดยใช้ Whole blood culture		
	ตรวจการ ติดเชื้อ MTBC หรือ NTM (n=20)	คัดกรอง เพปไทด์ สังเคราะห์ (n=20)	ทดสอบ ประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)	ทดสอบเพื่อ คัดเลือก ไมโตเจน (n=10)	ตรวจการ ติดเชื้อ MTBC (n=15)	ทดสอบ ประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)
9	√	√	√	-	√	√
10	√	√	-	-	-	-
11	√	√	-	-	√	-
12	√	√	-	-	-	-
13	√	√	-	-	-	-
14	√	√	-	-	-	-
15	√	√	-	-	-	-
16	√	√	-	-	√	-
17	√	√	-	-	-	-
18	√	√	√	-	-	√
19	√	√	√	√	√	√
20	√	√	-	-	-	-
21	-	-	-	-	√	-
22	-	-	-	-	√	-

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

Elephant sample No.	IGRA โดยใช้ PBMC culture			IGRA โดยใช้ Whole blood culture		
	ตรวจการ ติดเชื้อ MTBC หรือ NTM (n=20)	คัดกรอง เพปไทด์ สังเคราะห์ (n=20)	ทดสอบ ประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)	ทดสอบเพื่อ คัดเลือก ไมโตเจน (n=10)	ตรวจการ ติดเชื้อ MTBC (n=15)	ทดสอบ ประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)
23	-	-	-	-	√	-
24	-	-	-	-	√	-
25	-	-	√	√	√	√
26	-	-	√	-	√	√
27	-	-	√	-	-	√
28	-	-	√	-	-	√
29	-	-	√	-	-	√
30	-	-	√	-	-	√
31	-	-	√	-	-	√
32	-	-	√	-	-	√
33	-	-	-	√	-	-
34	-	-	-	√	-	-
35	-	-	-	√	-	-
36	-	-	-	√	-	-

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเลือดช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

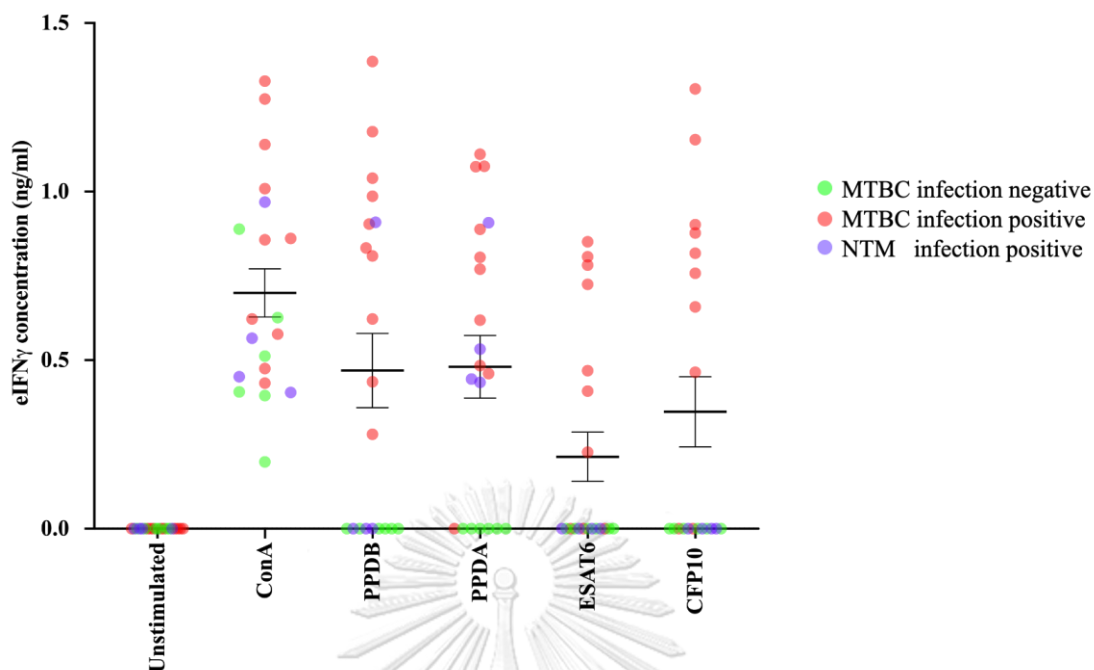
Elephant sample No.	IGRA โดยใช้ PBMC culture			IGRA โดยใช้ Whole blood culture		
	ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM (n=20)	คัดกรอง เพปไทด์ ล้างเคราะห์ (n=20)	ทดสอบประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)	ทดสอบเพื่อคัดเลือก ไมโตเจน (n=10)	ตรวจการติดเชื้อ MTBC (n=15)	ทดสอบประสิทธิภาพ กลุ่มเพปไทด์ (n=15)
37	-	-	-	√	-	-
38	-	-	-	√	-	-
39	-	-	-	√	-	-

#### 4.2 การตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้างด้วยวิธี Interferon gamma release assay (IGRA) โดยใช้ PBMCs

เก็บตัวอย่างเลือดช้าง 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 เชือก ได้แก่ ช้างที่มีประวัติผลตรวจ IGRA เป็นบวก และที่มีประวัติผลตรวจ IGRA เป็นลบ จากการทดลองก่อนหน้านี้ จากนั้นตรวจทดสอบการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี IGRA เพื่อยืนยันผลการตรวจสถานการณ์ติดเชื้อของช้างแต่ละเชือก เมื่อตอนเริ่มทำการทดลอง โดยทำการแยก PBMCs จากตัวอย่างเลือดช้าง จากนั้นกระตุ้นเซลล์ PBMCs ด้วยไมโตเจน ConA (กลุ่มควบคุมบวก) หรือแอนติเจน ได้แก่ PPDB, PPDA, รีคอมบิแนนท์ โปรตีน ESAT6 และ CFP10 จากนั้นตรวจวัดการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้น ซึ่งวัดได้จากปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้น โดยใช้ค่า LOD ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของแต่ละการทดลองเป็นค่า cutoff โดยสามารถจำแนกสถานะการติดเชื้อวัณโรค ออกเป็น 5 แบบ ได้แก่ 1) MTBC infection negative, 2) MTBC infection positive, 3) MTBC infection suspected, 4) NTM infection positive และ 5) Indeterminate ดังอธิบายไว้ในข้อ

#### 3.4.3

จากการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้างจำนวน 20 เชือกนี้ พบว่า PBMCs ของช้างแต่ละเชือก มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไมโตเจนและโปรตีนแอนติเจนต่าง ๆ ให้ผลดังตารางที่ 6 และปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้น ดังภาพที่ 9 โดยใช้เกณฑ์การแปลผลจากปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ตรวจวัดได้ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.3 พบว่า ช้างทั้งหมด 20 เชือก สามารถสรุปสถานะการติดเชื้อได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ 1) ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก (MP: MTBC infection positive) จำนวน 10 เชือก (50%) ได้แก่ ช้างหมายเลข 1-10 ซึ่งช้างที่มีผลบวกจะมีการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย PPDB และ/หรือ PPDA และมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ/หรือ CFP10 2) ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ (N: MTBC infection negative) จำนวน 6 เชือก (30%) ได้แก่ ช้างหมายเลข 11-16 ซึ่งพบว่า ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนแอนติเจน จึงไม่สามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ 3) ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวกที่เกิดจากการติดเชื้อในกลุ่ม NTM (NP: NTM infection positive) จำนวน 4 เชือก (20%) ได้แก่ ช้างหมายเลข 17-20 โดยจะพบว่าช้างจะมีการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย PPDA และ/หรือ PPDB แต่จะไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 จึงไม่สามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  เมื่อทำการเปรียบเทียบผลตรวจในครั้งนี้นี้กับผลตรวจในครั้งก่อนหน้า พบว่า มีช้างที่มีผลตรวจในครั้งนี้อย่างตรงกันกับประวัติผลตรวจเดิมจำนวน 14 เชือก ในขณะที่ช้างอีก 6 เชือก พบผลการตรวจที่เปลี่ยนไป โดยแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ 1) เปลี่ยนจากไม่ติดเชื้อเป็นติดเชื้อ MTBC ช้างหมายเลข 7, 9 และ 10 2) เปลี่ยนจากติดเชื้อ MTBC เป็นไม่ติดเชื้อ ช้างหมายเลข 16 และ 3) เปลี่ยนจากไม่ติดเชื้อเป็นติดเชื้อในกลุ่ม NTM ช้างหมายเลข 18 และ 20



ภาพที่ 9 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีแอนติเจนชนิดต่าง ๆ (n=20)

กระตุ้น PBMCs จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลอด ด้วย ConA, PPDB, PPDA, รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเม็ดเลือดขาวช้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของช้างแต่ละเชือก โดยแบ่งผลการทดสอบที่ได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ: MTBC infection negative (จุดสีเขียว), ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก: MTBC infection positive (จุดสีแดง) และช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวกจากการติดเชื้อ NTM: NTM infection positive (จุดสีม่วง)

ตารางที่ 6 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยตัวไม่โตเจนหรือแอนติเจนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ PBMCs (n=20)

		Elephant Sample No.																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Antigens	ConA	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	PPDB	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	PPDA	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	ESAT6	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	CFP10	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
Infection status	N	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	N	N	N	N	N	N	NP	NP	NP	NP



### 4.3 การคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ที่สามารถกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้าง

#### 4.3.1 การกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10

ทำการแยก PBMCs ของช้างทั้งหมด 20 เชือก ที่ได้ทำการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี IGRA ในข้อที่ 4.2 จากนั้นทำการกระตุ้น PBMCs ของช้างแต่ละเชือกด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโนซ้อนทับกัน (Synthetic overlapping peptides) ที่ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้กระตุ้นด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเพปไทด์เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทำการตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวช้างด้วยวิธี Sandwich ELISA และทำการแปลผลตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.5.4

ผลการทดลองกระตุ้น PBMCs ของช้างทั้งหมด 20 เชือก ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 (E) แสดงดังตารางที่ 7 และปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งออกมา ดังภาพที่ 10 พบว่า ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก โดยใช้โปรตีนทั้งสายเป็นแอนติเจน (whole protein IGRA) จำนวน 10 เชือก ได้แก่ช้างหมายเลข 1-10 ผลที่ได้ พบว่า มีช้างจำนวน 2 เชือก ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ได้แก่ ช้างหมายเลข 4 และ 10 ตามลำดับ และพบว่ามีช้างจำนวน 8 เชือก มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ในส่วนของช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ และติดเชื้อในกลุ่ม NTM รวมกัน จำนวน 10 เชือก ได้แก่ ช้างหมายเลข 11-20 พบว่าไม่มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ทุกสาย ดังนั้น เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น PBMCs ของช้างที่คาดว่าติดเชื้อ MTBC ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ได้ มีจำนวน 13 สาย ได้แก่ เพปไทด์สายที่ E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E13, E14 และ E16 ตามลำดับ



เมื่อกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 (C) ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน โดยผลการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้น แสดงดังตารางที่ 8 และปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งออกมา ดังภาพที่ 11 พบว่า ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก โดยใช้ whole protein IGRA จำนวน 10 เชือก ได้แก่ช้างหมายเลข 1-10 มีช้างจำนวน 2 เชือก ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ได้แก่ ช้างหมายเลข 1 และ 5 ตามลำดับ และพบว่า มีช้างจำนวน 8 เชือก มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ในส่วนของช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ และติดเชื้อในกลุ่ม NTM โดยใช้ whole protein IGRA รวมกันจำนวน 10 เชือก ได้แก่ ช้างหมายเลข 11-20 พบว่า ไม่มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ทุกสาย ดังนั้น เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น PBMCs ของช้างที่คาดว่าติดเชื้อ MTBC ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ได้ มีจำนวน 14 สาย ได้แก่ สายที่ C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C11, C12, C17, C18 และ C22 ตามลำดับ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

ตารางที่ 7 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยแอนเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20)

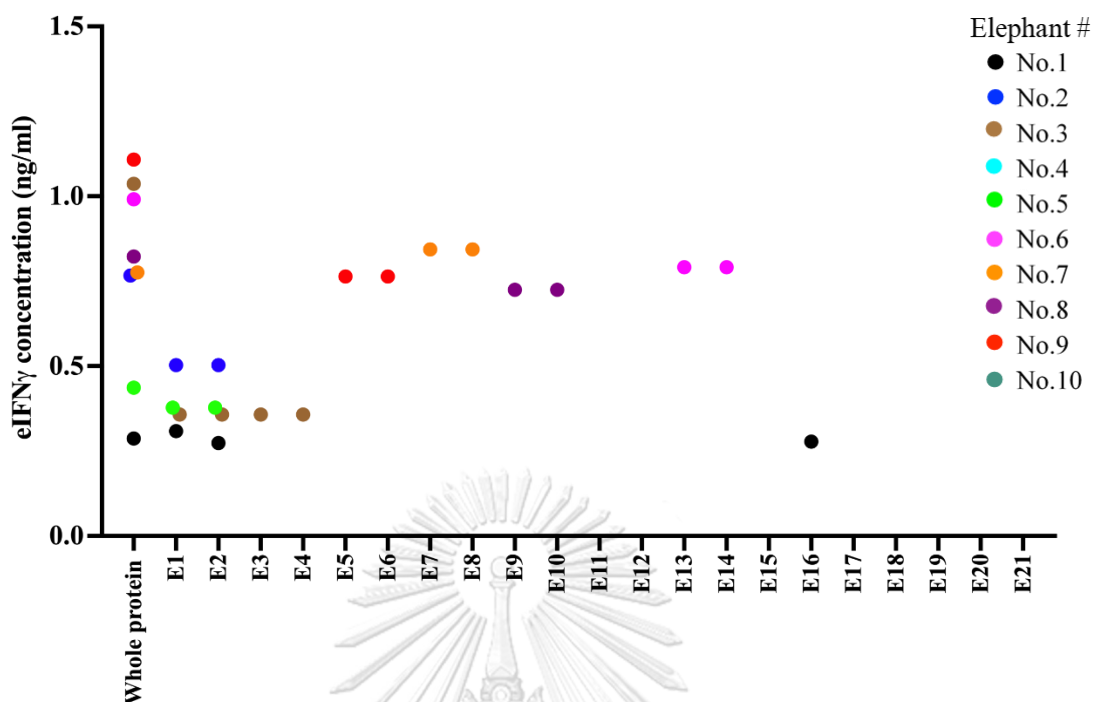
No.	Infection status	ESAT6 Peptides																					
		ESAT6	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21
1	MP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	MP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	MP	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	MP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	MP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	MP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	MP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	MP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Response    
 - Non-response

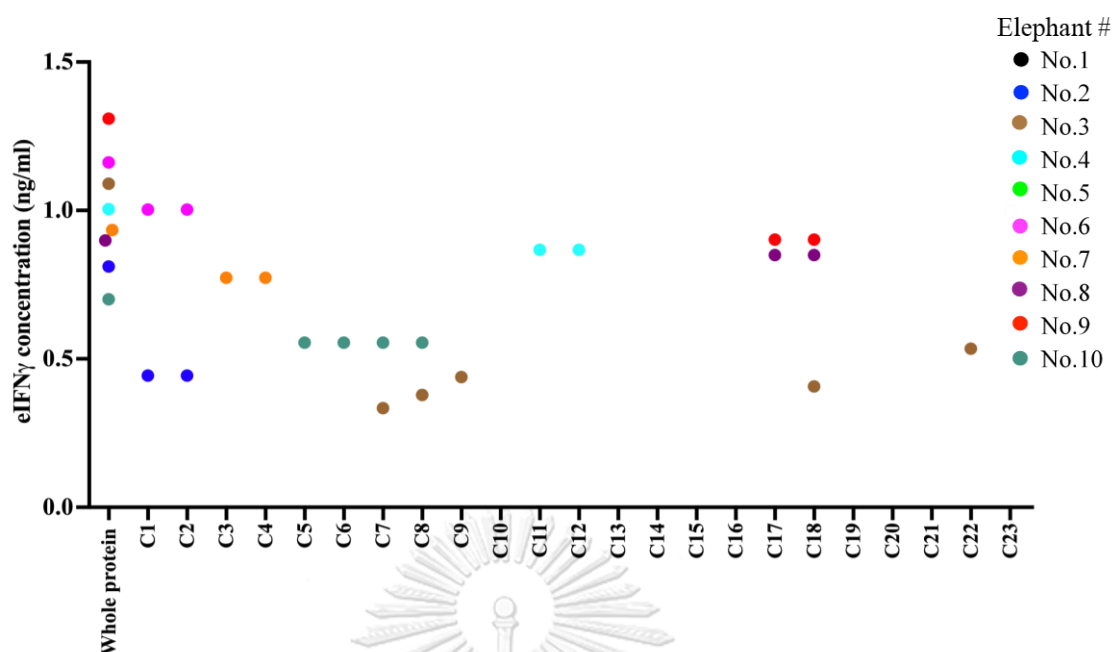
ตารางที่ 8 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20)

No.	Infection		CFP10 Peptides																							
	status	CFP10	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	
1	MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	MP	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	MP	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
4	MP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	MP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	MP	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	MP	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	MP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
9	MP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
10	MP	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	NTM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Response     
 - Non-response



ภาพที่ 10 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน กระตุ้น PBMCs จำนวน  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ด้วย ConA และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 โดยใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 โดยใช้กระตุ้นด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน ใช้ความเข้มข้นของเพปไทด์เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเม็ดเลือดขาวช้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของช้างแต่ละเชือก และสีที่แตกต่างกันแสดงถึงช้างแต่ละเชือก



ภาพที่ 11 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน กระตุ้น PBMCs จำนวน  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ด้วย ConA และรีคอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 โดยใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 โดยใช้กระตุ้นด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน ใช้ความเข้มข้นของเพปไทด์เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา จึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเม็ดเลือดขาวช้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของช้างแต่ละเชือก และสีที่แตกต่างกันแสดงถึงช้างแต่ละเชือก

#### 4.3.2 การกระตุ้น PBMCs ของข้างด้วยกลุ่มเปปไทด์สังเคราะห์แบบรวมหลายสายของโปรตีน ESAT6 และ CFP10

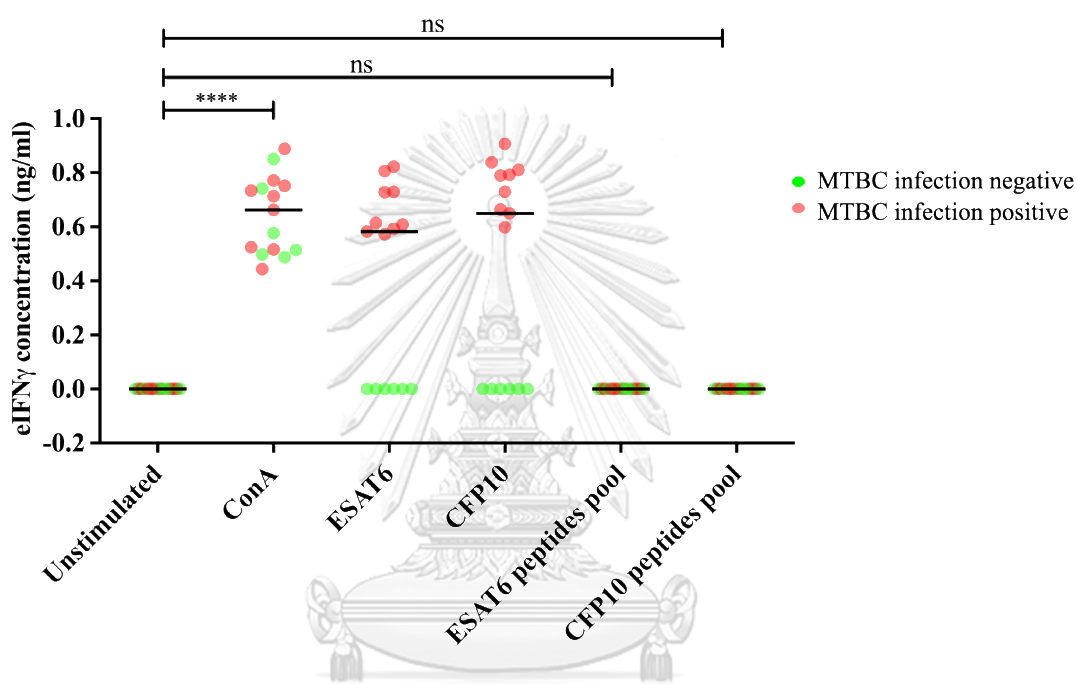
จากผลการคัดกรองเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ข้างต้น จึงทำการเลือกเปปไทด์ที่ใช้ในการกระตุ้น PBMCs ของข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก จากการใช้ whole protein IGRA จำนวน 10 เชือก จากข้อ 4.3.1 โดยทำการเลือกเฉพาะเปปไทด์สายที่สามารถกระตุ้น PBMCs ของข้างได้ครบทั้ง 10 เชือก ซึ่งสามารถจำแนก ได้ดังนี้ เปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ได้แก่ เปปไทด์ E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E13 และ E14 และเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ได้แก่ C1, C2, C3, C4, C7, C8, C11, C12, C17 และ C18

โดยเก็บตัวอย่างเลือดข้างจำนวน 15 เชือก จากข้าง 2 กลุ่ม ได้แก่ ข้างที่ใช้ในขั้นตอนการคัดกรองเปปไทด์ จำนวน 7 เชือก และที่มีประวัติผลตรวจ IGRA ด้วยวิธี PBMCs culture จากการศึกษาก่อนหน้านี้ จำนวน 8 เชือก (17) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเปปไทด์ที่คัดกรองได้

ทำการแยก PBMCs ของข้างทั้ง 15 เชือก โดยเป็นข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก โดยใช้ whole protein IGRA จำนวน 9 เชือก และข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ โดยใช้ whole protein IGRA จำนวน 6 เชือก จากนั้นทำการกระตุ้น PBMCs ของข้างแต่ละเชือกด้วยการรวมเปปไทด์สังเคราะห์ที่เลือกมา (peptide IGRA) โดยแบ่งเป็นกลุ่มของเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และกลุ่มของเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 แต่ละสายใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นที่ใช้ในการคัดกรองเปปไทด์ เพื่อให้มีความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนสายของเปปไทด์เป็น 10 สาย หลังจากการกระตุ้น ทำการตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวข้างด้วยวิธี Sandwich ELISA และทำการแปลผลตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.5.4

ผลการทดลอง ดังตารางที่ 9 พบว่า ข้างที่ก่อนหน้านี้มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ จำนวน 6 เชือก ได้แก่ ข้างหมายเลข 18, 19, 25, 27, 28 และ 31 พบว่า ไม่มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA และ peptide IGRA ในขณะที่ข้างก่อนหน้านี้ที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก โดยใช้ whole protein IGRA จำนวน 9 เชือก ได้แก่ ข้างหมายเลข 1, 2, 4, 8, 9, 26, 29, 30 และ 32 พบว่า มีการตอบสนองของ PBMCs ต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ซึ่งตรงกับผลก่อนหน้านี้ แต่ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย peptide IGRA จากการตรวจวัด

ปริมาณ eIFN $\gamma$  พบว่า ช้างทั้งหมด 15 เชือก มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย ConA ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมลบ นอกจากนี้พบว่า peptide IGRA ไม่สามารถกระตุ้น PBMCs ของช้างให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วย peptide IGRA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมลบ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ด้วยวิธี PBMCs culture (n=15) กระตุ้น PBMCs จำนวน  $5 \times 10^5$  เซลล์ต่อหลุม ด้วย ConA, รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ความเข้มข้นของเพปไทด์แต่ละสายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ผลิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวช้าง ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของช้างแต่ละเชือก โดยช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ: MTBC infection negative (จุดสีเขียว) และ ช้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก: MTBC infection positive (จุดสีแดง) (ns: not significant *p*-value มากกว่า 0.05, \*\*\*\*แสดงถึงค่า *p*-value น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.0001)



ตารางที่ 9 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ PBMCs (n=15)

\* ช้างเชือกที่ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ข้อ 4.2 และใช้ในการคัดกรองเพปไทด์ ESAT6 และ CFP10 ข้อ 4.3.1

		Elephant Sample No.														
		1*	2*	4*	8*	9*	18*	19*	25	26	27	28	29	30	31	32
Antigens	ConA															
	ESAT6															
	CFP10															
	ESAT6 peptides pool															
	CFP10 peptides pool															
Infection status		MP	MP	MP	MP	MP	N	N	N	MP	N	N	MP	MP	N	MP

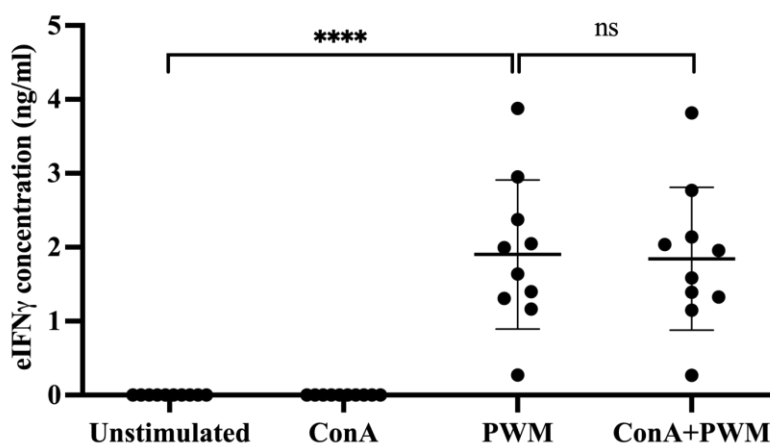
N	MTBC infection negative	Positive
MP	MTBC infection positive	Negative
NP	NTM infection positive	Indeterminate

#### 4.4 การพัฒนาชุดทดสอบ Interferon gamma release assays (IGRA) แบบ whole blood culture

##### 4.4.1 การคัดเลือกไมโตเจนสำหรับกระตุ้น whole blood culture

คัดเลือกไมโตเจนที่สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาก่อน เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นในกลุ่มควบคุมบวก โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของข้างที่ทำการเลือกแบบสุ่ม จำนวน 10 เซอิก ด้วยการเติมไมโตเจน ได้แก่ ConA, PWM และ ConA ร่วมกับ PWM ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดที่ไม่แข็งตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดเพื่อผสมเลือดและไมโตเจนให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บส่วนใส (พลาสมา) และตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA

ผลการทดลองพบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวใน whole blood culture ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย ConA โดยไม่สามารถตรวจพบการหลั่ง eIFN $\gamma$  แต่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PWM และ ConA ร่วมกับ PWM โดยพบว่า เมื่อกระตุ้นด้วย PWM มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ eIFN $\gamma$  เท่ากับ 1.902 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อกระตุ้นด้วย ConA ร่วมกับ PWM มีค่าเฉลี่ยของปริมาณ eIFN $\gamma$  เท่ากับ 1.844 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการกระตุ้นด้วย PWM และ ConA ร่วมกับ PWM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังภาพที่ 13 แต่การกระตุ้นด้วย PWM ทำให้มีการหลั่ง eIFN $\gamma$  ในปริมาณมากกว่าการกระตุ้นด้วย ConA ร่วมกับ PWM และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้น ดังนั้น จึงเลือกใช้ PWM เป็นสารกระตุ้นในกลุ่มควบคุมบวก ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture

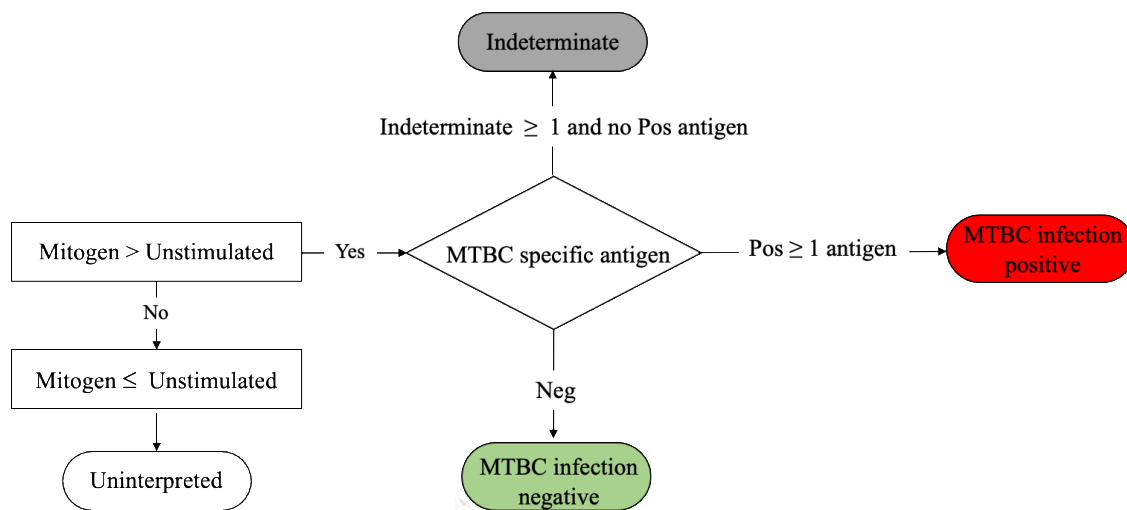


ภาพที่ 13 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของข้างหลังถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน ด้วยวิธี whole blood culture (n=10)

กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture ในข้างที่เลือกแบบสุ่ม จำนวน 10 เซอิก ด้วยการเติม ConA, PWM และ ConA ร่วมกับ PWM ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดที่ไม่แข็งตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ในพลาสมา ด้วยวิธี Sandwich ELISA (ns: not significant *p-value* มากกว่า 0.05, \*\*\*\*แสดงถึงค่า *p-value* น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.0001)

#### 4.4.2 แผนผังการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ในเลือดข้างแบบ whole blood culture

เกณฑ์การแปลผลการตรวจการติดเชื้อ MTBC ในข้างแบบ whole blood culture จะต้องอาศัยผลการตอบสนองของ PBMCs ในเลือด ต่อการถูกกระตุ้นด้วย PWM (Mitogen) และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 (MTBC specific antigen) โดยการตอบสนองของ PBMCs สามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ Positive (Pos) เมื่อปริมาณ eIFN $\gamma$  สูงกว่าค่า cutoff , Negative (Neg) เมื่อไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  และ Indeterminate (Ind) เมื่อปริมาณ eIFN $\gamma$  อยู่ระหว่างค่า cutoff กับค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน หลังจากระบุสถานะการตอบสนองของ PBMCs แล้ว จึงจะสามารถทำการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC โดยเริ่มต้นพิจารณาจากการตอบสนองของ PBMCs ต่อไมโตเจน จากนั้นจึงพิจารณาการตอบสนองของ PBMCs ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ซึ่งการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ในเลือดข้างแบบ whole blood culture สามารถจำแนกสถานะการติดเชื้อ MTBC ออกเป็น 3 สถานะ ได้แก่ MTBC infection negative, MTBC infection positive และ Indeterminate ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แผนผังการแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ของข้าง แบบ whole blood culture การแปลผลตรวจการติดเชื้อ MTBC ในเลือดข้างแบบ whole blood culture สามารถจำแนกสถานะการติดเชื้อ MTBC ออกเป็น 3 สถานะ ได้แก่ MTBC infection negative (กล่องสีเขียว), MTBC infection positive (กล่องสีแดง) และ Indeterminate (กล่องสีเทา)

#### 4.4.3 การกระตุ้น PBMCs ในเลือดข้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

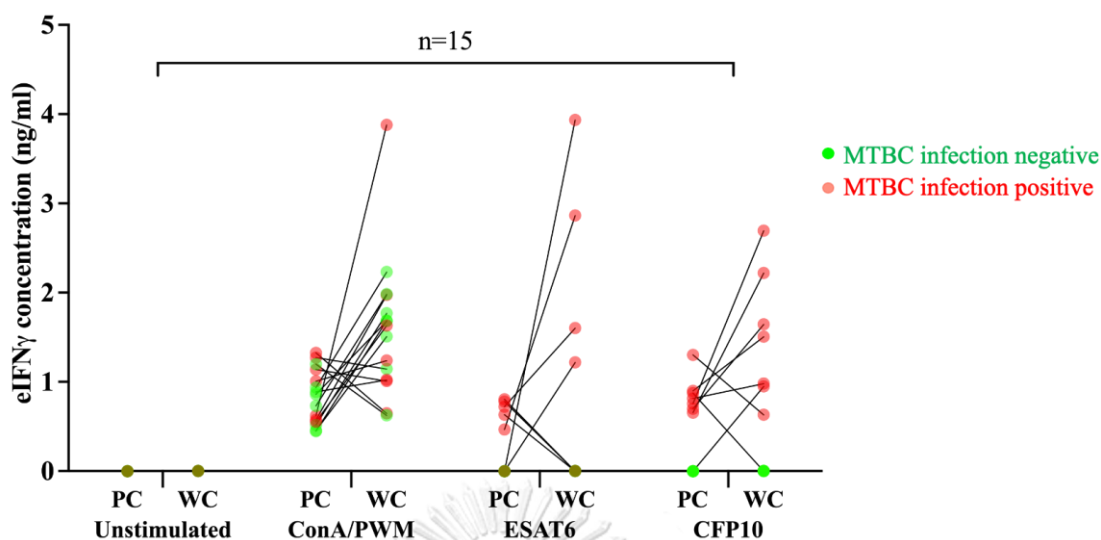
เก็บตัวอย่างเลือดข้าง จำนวน 15 เชือก โดยมาจาก 2 กลุ่ม ได้แก่ ข้างที่ทดสอบในขั้นตอนการคัดกรองเพปไทด์จำนวน 9 เชือก และข้างที่มีประวัติผลตรวจ IGRA แบบ PBMC culture จากการศึกษาก่อนหน้า จำนวน 6 เชือก (17)

ตรวจการติดเชื้อ MTBC ในข้างจำนวน 15 เชือก โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาก่อน โดยแบ่งออกเป็น 4 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 (Nil) ไม่มีสารกระตุ้น หลอดที่ 2 (Mitogen) ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 3 (TB1) และ 4 (TB2) ประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอดเพื่อผสมเลือดและแอนติเจนให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเก็บส่วนใส และตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA การวินิจฉัยจะต้องดูการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจากเซลล์เม็ดเลือดขาว

หลังถูกกระตุ้น ในการวัดการตอบสนองของ PBMCs จะใช้ค่า LOD ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของแต่ละการทดลองเป็นค่า cutoff ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ Positive, Negative และ Indeterminate ที่อธิบายไว้ในข้อ 3.4.3 และทำการแปลผลการวินิจฉัยจากแผนผังการแปลผลการกระตุ้น PBMCs ของข้างแบบ whole blood culture ดังภาพที่ 14

ผลการทดลอง ดังตารางที่ 10 พบว่า มีข้างจำนวน 8 เชือก ไม่มีการตอบสนองของเซลล์ในเลือดต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA โดยไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  เมื่อทำการแปลผลโดยใช้เกณฑ์จากแผนผัง ดังภาพที่ 14 สามารถวินิจฉัยได้ว่าข้างทั้ง 8 เชือก มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ (N: MTBC infection negative) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจแบบ PBMC culture ซึ่งเป็นวิธีหลัก พบว่า มีผลการตรวจที่ตรงกันจำนวน 7 เชือก คือ ข้างหมายเลข 11, 19, 21, 22, 23, 24 และ 25 และพบว่า ข้าง 1 เชือก ให้ผลการตรวจที่ตรงข้ามกับการตรวจแบบ PBMC culture คือ ข้างหมายเลข 7 ซึ่งตรวจแบบ PBMC culture ให้ผลตรวจ IGRA เป็นบวก เนื่องจากพบการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ดังภาพที่ 15

ในส่วนของข้างอีก 7 เชือก พบว่า มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ในข้างเชือกที่ 2, 3, 4, 8, 9, 16 และ 26 ตามลำดับ แต่ข้างหมายเลข 9, 16 และ 26 ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 เพียงอย่างเดียว เนื่องจากการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 ยังไม่สามารถระบุได้ เพราะปริมาณ eIFN $\gamma$  อยู่ระหว่างค่า cutoff กับค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน เมื่อทำการแปลผลการตรวจของข้างทั้ง 7 เชือก โดยใช้เกณฑ์จากแผนผัง ดังภาพที่ 14 สามารถวินิจฉัยได้ว่าข้างทั้ง 7 เชือก มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก (MP: MTBC infection positive) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยแบบ PBMC culture ซึ่งเป็นวิธีหลัก พบว่า มีผลการตรวจที่ตรงกันจำนวน 6 เชือก คือ ข้างหมายเลข 2, 3, 4, 8, 9 และ 26 และมีข้าง 1 เชือก ที่มีผลการตรวจที่ตรงข้ามกัน คือ ข้างหมายเลข 16 ซึ่งการตรวจแบบ PBMC culture ให้ผลตรวจ IGRA เป็นลบ เนื่องจากไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลังจาก PBMCs ของข้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ PBMCs culture (PC) และ whole blood culture (WC) (n=15) กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture ในข้าง จำนวน 15 เชือก ด้วยการเติม PWM ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดที่ไม่แข็งตัวปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ในพลาสมา ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของข้างแต่ละเชือก โดยข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ: MTBC infection negative (จุดสีเขียว) และ ข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก: MTBC infection positive (จุดสีแดง) โดยมีเส้นตรงเชื่อมระหว่างจุด แสดงให้เห็นว่าเป็นข้างเชือกเดียวกัน

ตารางที่ 10 ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบินแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture (n=15)  
 \* ช้างเชือกที่ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ข้อ 4.2 และใช้ในการคัดกรองของเพปไทด์ ESAT6 และ CFP10 ข้อ 4.3.1

		Elephant Sample No.														
		2*	3*	4*	7*	8*	9*	11*	16*	19*	21	22	23	24	25	26
Antigens	PWM	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	ESAT6	MP	MP	MP	N	MP	MP	MP	Indeterminate	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	CFP10	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
Whole blood culture		MP	MP	MP	N	MP	MP	N	MP	N	N	N	N	N	N	MP
PBMCs culture		MP	MP	MP	MP	MP	MP	N	N	N	N	N	N	N	N	MP

N MTBC infection negative  
MP MTBC infection positive  
NP NTM infection positive  
 Positive  
 Negative  
 Indeterminate

#### 4.4.4 การกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture

เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเพปไทด์ที่ได้ ในการกระตุ้น PBMCs แบบ whole blood culture โดยเก็บตัวอย่างเลือดช้าง จำนวน 15 เชือก ซึ่งเป็นช้างกลุ่มเดียวกับช้างในข้อ 4.3.2

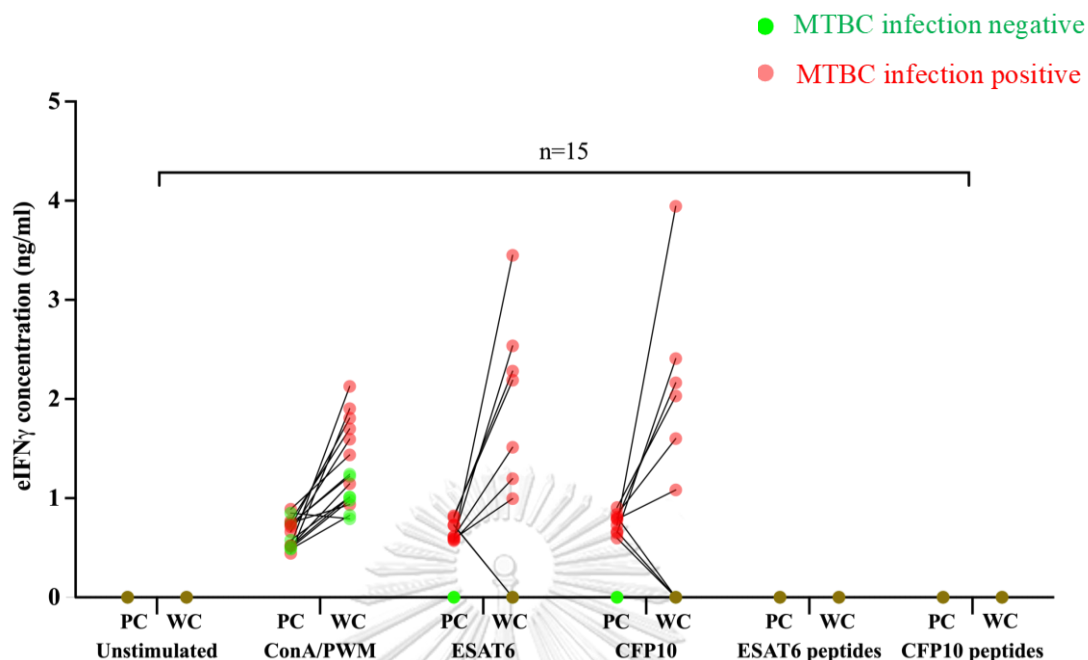
โดยทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้าง แบบ whole blood culture โดยแบ่งออกเป็น 6 หลอด ได้แก่ หลอดที่ 1 (Nil) ไม่มีสารกระตุ้น หลอดที่ 2 (Mitogen) ประกอบด้วย PWM ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 3 (TB1) และ 4 (TB2) ประกอบด้วย รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลอดที่ 5 (TB5) ประกอบด้วยกลุ่มเพปไทด์ ของโปรตีน ESAT6 ได้แก่ เพปไทด์ E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E13 และ E14 และหลอดที่ 6 (TB6) ประกอบด้วยกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ได้แก่ C1, C2, C3, C4, C7, C8, C11, C12, C17 และ C18 ใช้ความเข้มข้นแต่ละสายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นที่ใช้ในการคัดกรองเพปไทด์ เพื่อให้มีความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) เนื่องจากมีการเพิ่มจำนวนสายของ เพปไทด์เป็น 10 สาย ซึ่งมีจำนวนสายมากกว่าในขั้นตอนการคัดกรองเพปไทด์

ผลการทดลอง ดังตารางที่ 11 พบว่า ช้างทั้งหมด 15 เชือก ไม่มีการตอบสนองของ PBMCs ในเลือดต่อการกระตุ้นด้วย peptide IGRA โดยไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ลบ ดังภาพที่ 16 ในขณะที่ช้างบางเชือก พบว่ามีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ดังนั้น จึงทำการทดสอบ โดยอาศัยการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ซึ่งพบว่า ช้างจำนวน 7 เชือก ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA และไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  เมื่อทำการแปลผลโดยใช้เกณฑ์จากแผนผัง ดังภาพที่ 6 สามารถวินิจฉัยได้ว่าช้าง 7 เชือก มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ ผลการตรวจแบบ PBMC culture พบว่า มีผลการตรวจที่ตรงกันจำนวน 6 เชือก ได้แก่ ช้างหมายเลข 18, 19, 25, 27, 28 และ 31 โดยมีช้างเพียง 1 เชือก ที่มีผลการตรวจที่ตรงกันข้าม คือ ช้างหมายเลข 32 ซึ่งตรวจแบบ PBMC culture ให้ผลตรวจ IGRA เป็นบวก เนื่องจากมีการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ดังภาพที่ 16



ในส่วนของข้างอีก 8 เชือก พบว่า มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย whole protein IGRA ในข้างหมายเลข 1, 2, 4, 8, 9, 26, 29 และ 30 ตามลำดับ และข้างหมายเลข 8 และ 29 ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 เพียงอย่างเดียว ส่วนการกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 ยังไม่สามารถระบุได้ เนื่องจากปริมาณ eIFN $\gamma$  อยู่ระหว่างค่า cutoff กับค่าต่ำสุดของกราฟมาตรฐาน และข้างหมายเลข 4 ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 เพียงอย่างเดียว เมื่อทำการแปลผลการวินิจฉัยของข้างทั้ง 8 เชือก โดยใช้เกณฑ์จากแผนผัง ดังภาพที่ 14 พบว่า ข้างทั้ง 8 เชือก มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก ซึ่งมีผลการตรวจไม่แตกต่างกับการตรวจแบบ PBMC culture





ภาพที่ 16 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจาก PBMCs ของข้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และ เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ PBMCs culture (PC) และ whole blood culture (WC) (n=15)

กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดข้าง แบบ whole blood culture ในข้าง จำนวน 15 เชือก ด้วยการเติม PWM ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 ตามลำดับ ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ความเข้มข้นแต่ละสายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเลือดที่ไม่แข็งตัว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ในพลาสมา ด้วยวิธี Sandwich ELISA แต่ละจุดแสดงปริมาณ eIFN $\gamma$  ของข้างแต่ละเชือก โดยข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นลบ: MTBC infection negative (จุดสีเขียว) และ ข้างที่มีผลตรวจ IGRA เป็นบวก: MTBC infection positive (จุดสีแดง) โดยมีเส้นตรงเชื่อมระหว่างจุดแสดงให้เห็นว่าเป็นข้างเชือกเดียวกัน

**ตารางที่ 11** ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบินแนนท์โปรตีน และเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture (WC) (n=15)

\* ซ้ำงเชื้อที่ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ข้อ 4.2 และใช้ในการคัดกรองเพปไทด์ ESAT6 และ CFP10 ข้อ 4.3.1

		Elephant Sample No.														
		1*	2*	4*	8*	9*	18*	19*	25	26	27	28	29	30	31	32
Antigens	PWM	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	ESAT6	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	CFP10	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	ESAT6 peptides pool	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
	CFP10 peptides pool	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
Whole blood culture	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
PBMCs culture	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP
		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

N MTBC infection negative  
 MP MTBC infection positive  
 NP NTM infection positive

Positive  
 Negative  
 Indeterminate

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วัณโรค เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข และจัดเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน หรือจากคนสู่สัตว์ ซึ่งสามารถพบการติดเชื้อวัณโรคได้ในสัตว์หลายชนิด เช่น โค, กระบือ, สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (non-human primate), ช้างแอฟริกา และช้างเอเชีย (71, 72, 73) วัณโรคในสัตว์สามารถตรวจวินิจฉัยได้ยาก โดยเฉพาะในสัตว์ที่มีขนาดใหญ่ เช่น ช้าง เนื่องจากช้างที่ติดเชื้อวัณโรคในระยะแรกจะไม่แสดงอาการทางคลินิกที่สามารถสังเกตได้ เช่นเดียวกับการติดเชื้อระยะแฝงที่มักจะไม่แสดงอาการของโรคในมนุษย์ จนกระทั่งถึงระยะที่อาการรุนแรง การตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช้างตั้งแต่ระยะแรกนั้นมีความสำคัญ จึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ เพื่อที่จะควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อวัณโรคไปยังสัตว์อื่น ๆ และยังสามารถส่งผ่านมาสู่มนุษย์ได้ เนื่องจากมีการนำช้างมาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ที่ใกล้ชิดกับมนุษย์มากขึ้น

ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิค IGRA ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคโดยใช้ตัวอย่างเลือด เป็นวิธีการตรวจสอบด้วยการวัดปริมาณ IFN $\gamma$  ที่หลั่งจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหลังถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อวัณโรค ที่เกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ CMIR ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค เนื่องจากเป็นโปรตีนที่หลั่งจากเชื้อกลุ่ม MTBC เท่านั้น โปรตีนทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN $\gamma$  โดย Memory T cell ของ PBMCs ของผู้ที่เคยได้รับเชื้อวัณโรค (6, 8, 9) ซึ่งในปัจจุบัน IGRA ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ เนื่องจากมีความไวสูงและมีความสามารถในการจำแนกระหว่างผู้ที่ได้รับวัคซีน BCG และผู้ติดเชื้อ *M. tb* นอกจากนี้ ยังพบการพัฒนา IGRA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคในสัตว์ แต่ไม่มีการใช้งานเป็นประจำและยังไม่มีเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปจำหน่ายโดยทั่วไป (74)

ชุดตรวจสำเร็จรูปในช้างที่มีจำหน่ายจะเป็นการตรวจทางเซรัมวิทยา ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการวินิจฉัยวัณโรคในช้าง จะเป็นการตรวจวัดระดับแอนติบอดีในเซรัมตัวอย่างที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อ MTBC (6) ซึ่งได้มีการพัฒนาเป็นชุดตรวจ จำนวน 3 แบบ ได้แก่ Multi-antigen print immunoassay, Elephant TB Stat-Pak และ Dual-path platform VetTB test

ในปี พ.ศ. 2555 ได้มีการใช้ชุดตรวจเหล่านี้ในการทดสอบกับช่าง 14 เชือก ที่ติดเชื้อ *M. tb* พบว่าให้ผลเป็นบวก ก่อนที่จะสามารถเพาะแยกเชื้อจากน้ำล้างวงได้ โดยใช้เวลาหลายเดือน (50) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในช่างด้วย Elephant TB Stat-Pak อาจให้ผลบวกปลอม ในกรณีของเชื้อกลุ่ม NTM ซึ่งเกิดจาก cross reactivity ของแอนติเจนบางตัวในชุดตรวจ เช่น MPB83 เป็นต้น (7) อย่างไรก็ตาม พบช่างบางเชือกที่ติดเชื้อ *M. tb* ไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนหลัก คือ ESAT6 และ CFP10 ที่ตรึงอยู่ในชุดตรวจนี้ ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับการตรวจแอนติบอดีในช่าง พบว่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อวัณโรคของแม่ช่างที่ตั้งครรภ์ไปสู่ลูกช่าง (51, 52) จากการติดตามลูกช่างที่เกิดจากแม่ที่เป็นวัณโรคและตรวจเพาะเชื้อเป็นเวลา 11 ปี ไม่พบว่าลูกช่างมีอาการป่วยและการเพาะเชื้อให้ผลลบมาตลอด ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการตรวจพบแอนติบอดีในลูกช่างเป็นแอนติบอดีที่ได้รับมาจากแม่ไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อของลูกช่าง (52)

ในปี พ.ศ. 2563 (17) ทรงเกียรติ ทรงธรรมานภาพ ได้พัฒนาเทคนิค IGRA เพื่อใช้ในการวินิจฉัยวัณโรคของช่างเอเชีย ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหาการติดเชื้อ *M. tb* ในช่าง และแยกการติดเชื้อในกลุ่ม MTBC และ NTM ได้ด้วย โดยทำการกระตุ้น PBMCs ของช่างด้วยไมโตเจน ConA (กลุ่มควบคุมบวก) หรือโปรตีนแอนติเจน ได้แก่ PPDB, PPDA, รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 จากนั้นทำการตรวจวัด eIFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA โดยใช้พอลิคลอนอลแอนติบอดีในการตรึงและมอโนคลอนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจวัด อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อจำกัด ในการเตรียมตัวอย่างเลือด คือ จะต้องมีการปั่นแยก PBMCs และการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง eIFN $\gamma$  จะต้องใช้เวลานาน 72 ชั่วโมง (PBMCs IGRA) อีกทั้งต้องมีการเตรียมรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ CFP10 งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธี IGRA ต่อยอดจากผลที่ผ่านมาด้วยการคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ที่ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 (synthetic overlapping peptides) เพื่อใช้เป็นแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช่าง ซึ่งจะปรับให้ง่ายต่อผู้ใช้งาน ด้วยการกระตุ้นแบบ whole blood culture เพื่อนำไปสู่การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคของช่างในประเทศไทยที่แม่นยำและรวดเร็ว (whole blood IGRA)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้าง จำนวน 20 เชือก ด้วยวิธี IGRA แบบ PBMCs culture (17) จากผลการศึกษาพบการตอบสนองของ PBMCs ต่อการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่าง ๆ และสามารถวัด eIFN $\gamma$  ได้ด้วย Sandwich ELISA ที่ใช้พอลิคลอนอล แอนติบอดีในการตรึงและมอโนคลอนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจวัด โดยช้างที่ติดเชื้อ จะพบการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังถูกกระตุ้นด้วย PPDB, PPDA และรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ/หรือ CFP10 และช้างที่มีการติดเชื้อในกลุ่ม NTM จะมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PPDA และ/หรือ PPDB เท่านั้น เนื่องจาก PPDA และ PPDB เป็นแอนติเจนที่สามารถระบุความแตกต่างในการทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ MTBC และ NTM ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค (11, 15, 16) โดยวิธีการตรวจดังกล่าว สามารถระบุสถานการณ์ติดเชื้อวัณโรคของช้างทั้ง 20 เชือก ได้อย่างแม่นยำและตรงกับผลการตรวจจากการศึกษาก่อนหน้านี้ คิดเป็น 70% และผลการตรวจที่ไม่ตรงกัน คิดเป็น 30% คือ มีช้าง 6 เชือก พบผลการตรวจที่เปลี่ยนไป โดยแบ่งได้เป็น 3 กรณี ได้แก่ 1) เปลี่ยนจากไม่ติดเชื้อเป็นติดเชื้อ MTBC และ 2) เปลี่ยนจากไม่ติดเชื้อเป็นติดเชื้อในกลุ่ม NTM จาก 2 กรณีนี้ อาจเนื่องมาจาก ในการตรวจครั้งก่อนหน้านี้ ช้างอาจจะเพิ่งได้รับเชื้อครั้งแรก จึงยังไม่เกิดการตอบสนองของ Memory T cell เมื่อทำการตรวจจึงไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  หรือช้าง มีการสัมผัสกับเชื้อในช่วงระยะเวลาหลังจากการตรวจในครั้งก่อน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวินิจฉัย ในปัจจุบันที่ทำการตรวจวัดแอนติบอดีด้วยวิธี MAPIA ของช้างเชือกที่มีผลตรวจดังกรณีที่ 1 พบว่า มีผลตรวจเป็นบวก (ภาคผนวก) และกรณีที่ 3) เปลี่ยนจากติดเชื้อ MTBC เป็นไม่ติดเชื้อ ซึ่งจาก ผลตรวจในครั้งก่อน พบว่า ช้างเชือกนี้มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย CFP10 เพียงอย่างเดียว และพบผลการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันที่ทำการตรวจวัดแอนติบอดีด้วยวิธี MAPIA พบว่า มีผลตรวจ เป็นบวก (ภาคผนวก) ดังนั้น ผลที่ได้ในครั้งนี้อาจเกิดจากช้างเชือกนี้อยู่ในสถานะที่มีการติดเชื้อ ที่รุนแรงในขณะที่เก็บตัวอย่างเลือดมาทำการทดลอง ทำให้มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดต่ำกว่า ปกติ หรือเกิดปัญหาจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเลือดหรือการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวในครั้ง นี้ ส่งผลให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนในการตรวจครั้งนี้ต่ำลง ทำให้มีการหลั่ง eIFN $\gamma$  ออกมาในปริมาณที่ต่ำจน Sandwich ELISA ที่ถูกพัฒนาขึ้นไม่สามารถ ตรวจวัดได้

ในการพัฒนาการวินิจฉัยวัณโรคทั้งในมนุษย์และสัตว์ พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้น T cell ให้หลั่ง IFN $\gamma$  โดยพบการตอบสนองของ PBMCs ของผู้ป่วยวัณโรค (12) อีกทั้งยังพบการใช้โปรตีน 2 ชนิดนี้ เป็นแอนติเจนที่จำเพาะต่อการติดเชื้อ MTBC ในการวินิจฉัยวัณโรค ด้วยวิธี IGRA ในสัตว์หลายชนิด (15, 57, 75) มีการศึกษาการใช้โปรตีน ESAT6 เชื่อมกับ CFP10 เพื่อกระตุ้น PBMCs ช่วยเพิ่มโอกาสในการตอบสนองของ PBMCs ต่อ MTBC ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการวินิจฉัยมีความไวเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ ESAT6 หรือ CFP10 เพียงตัวเดียว (17) และมีรายงานผลที่คล้ายกัน คือ การรวมกันของ ESAT6 และ CFP10 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัยของ IGRA มากกว่าการใช้โปรตีนชนิดเดียวเป็นแอนติเจนในมนุษย์และวัว (70)

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ โดยใช้ IGRA มีการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *M. tb* เป็นแอนติเจนในการกระตุ้น PBMCs ให้หลั่ง IFN $\gamma$  ซึ่งเป็นการตรวจที่จำเพาะมากกว่าการทดสอบทางผิวหนัง และไม่เกิดผลบวกปลอมจากการได้รับวัคซีน BCG หรือติดเชื้อ NTM นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงได้ อีกทั้งเป็นชุดตรวจที่ใช้เวลาที่ไม่นานและง่ายต่อผู้ใช้งาน (63)

ในการพัฒนาวิธี IGRA ด้วยการคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์ที่ครอบคลุมลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เพื่อใช้เป็นแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้าง โดยทำการสังเคราะห์เพปไทด์ที่มีความยาว 15-mers ที่มีจำนวนกรดอะมิโนซ้อนทับ 11 ตัว ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แต่ละโปรตีนสามารถสังเคราะห์เพปไทด์ได้ จำนวน 21 สาย (E1-E21) และ 23 สาย (C1-C23) ตามลำดับ จากนั้นทำการคัดกรองเพปไทด์สังเคราะห์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$  ของเซลล์เม็ดเลือดขาวของช้าง ผลการทดลองพบว่า ช้างที่ติดเชื้อวัณโรคมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนทั้งสาย และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 สายเดียว และ/หรือหลายสายรวมกัน โดยแต่ละสายใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 7 และ 8) ซึ่งการกระตุ้น PBMCs ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ พบว่า มีปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ใกล้เคียงกับการกระตุ้นด้วยโปรตีนทั้งสาย (ภาพที่ 10 และ 11) สอดคล้องกับการศึกษาของ Arend และคณะ ที่มีการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ในการกระตุ้นการตอบสนองของ T cell

ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยวัณโรค ด้วยเทคนิค IGRA พบว่า การใช้เพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 มีประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงเทียบเท่ากับการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 (67) และพบว่า ช้างบางเชือกที่เป็นวัณโรคตอบสนองต่อโปรตีนทั้งสายของโปรตีน ESAT6 หรือ CFP10 และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 หรือ CFP10 อย่างใดอย่างหนึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Philip และคณะ ที่ทำการศึกษาโปรตีนที่เชื่อมระหว่าง ESAT6 และ CFP10 และเพปไทด์สังเคราะห์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *M. tb* พบว่า 18% ของตัวอย่างตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ของโปรตีน CFP10 เพียงอย่างเดียว, 30% ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 เพียงอย่างเดียว และ 39% ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 จะเห็นได้ว่าการติดเชื้อ *M. tb* ไม่จำเป็นต้องตอบสนองต่อโปรตีนทั้ง 2 ชนิด อาจจะตอบสนองเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น (70) และพบว่าช้างที่ไม่มีการติดเชื้อ MTBC หรือติดเชื้อกลุ่ม NTM ไม่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยโปรตีนทั้งสาย หรือเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 เนื่องจากไม่เคยได้รับเชื้อมาก่อนจึงไม่เกิดการตอบสนองของ Memory T cell ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อวัณโรคแต่เคยฉีดวัคซีน BCG หรือติดเชื้อ NTM จะมีผลตรวจ IGRA เป็นลบ (13)

จากนั้นได้ทำการคัดเลือกกลุ่มของเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ชนิดละ 10 สาย ที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้น PBMCs ของช้างที่ติดเชื้อ MTBC ให้หลั่ง eIFNY โดยแต่ละสายใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าที่ใช้ในการคัดกรองเพปไทด์ นำมากระตุ้น PBMCs ของช้างเชือกที่เคยตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ดังกล่าว และ PBMCs ของช้างเชือกอื่นที่ไม่เคยถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์กลุ่มดังกล่าว เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเพปไทด์ที่คัดกรองได้ จากการศึกษา พบว่า ช้างที่ติดเชื้อ MTBC มีการตอบสนองต่อโปรตีนทั้งสายแต่ไม่ตอบสนองต่อกลุ่มของเพปไทด์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดความเข้มข้นของเพปไทด์แต่ละสายลงในการใช้เป็นกลุ่มเพปไทด์ เพื่อให้มีความเข้มข้นของ DMSO ไม่เกิน 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งจะไม่ส่งผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ (76) เนื่องจากความเข้มข้นของ DMSO ที่มากกว่า 1% มีผลทำให้การรอดชีวิตของเซลล์ลดลงเหลือ 73% (77) จากการลดความเข้มข้นของเพปไทด์สังเคราะห์อาจทำให้ปริมาณของแอนติเจนไม่มากพอที่จะเหนี่ยวนำการตอบสนองของ T cell



จากผลการทดลองพบว่า ข้างส่วนมากจะมีการตอบสนองต่อเพปไทด์สายที่แตกต่างกัน แต่มีบางเชื้อที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์สายเดียวกัน ดังนั้น อาจจำเป็นต้องใช้ เพปไทด์จำนวนหลายสาย เพื่อให้ครอบคลุมความหลากหลายของ MHC เนื่องจากสิ่งมีชีวิต แต่ละสายพันธุ์ก็มีความหลากหลายของ MHC ที่แตกต่างกัน (68) เนื่องจากโมเลกุล MHC มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของ T cell และ T helper cell (Th cell) ที่รับรู้แอนติเจนผ่าน MHC peptide complex ผ่านการทำงานของกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น APC แต่เนื่องจากโมเลกุล MHC class I และ II มีมากมายหลากหลายอัลลีล (78, 79, 80) โดย MHC peptide complex ที่แตกต่างกันจะจับ กับ TCR เพื่อกระตุ้น T lymphocytes โคลนต่างกันอย่างจำเพาะ (81, 82) ขณะที่ในมนุษย์ HLA แต่ละ haplotype สามารถเข้าจับกับเพปไทด์ต่างกันตาม MHC ของเจ้าบ้าน เพื่อสร้าง MHC peptide complex ได้แตกต่างกัน เป็นเหตุให้ Th cell รับรู้แอนติเจนได้ (82, 83, 84) เหตุผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Benacerraf และ McDevitt (85, 86) ซึ่งรายงานว่า หนูสายพันธุ์ต่างกันมีการตอบสนองเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อเพปไทด์สังเคราะห์สายสั้นแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า ผู้ที่มียีนอัลลีลของ MHC class II ต่างกัน ก็ให้ผลการตอบสนองทาง ภูมิคุ้มกัน ต่อการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดแตกต่างกัน (87, 88)

มีรายงานการศึกษาความหลากหลายของ MHC ของข้าง ซึ่งพบว่า MHC ของข้าง มีความหลากหลายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ เนื่องจากข้างมีลักษณะ ประวัติชีวิตที่แตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ เช่น ขนาดลำตัวที่ใหญ่มาก และมีช่วงชีวิต ยาวนาน ซึ่งคาดว่าลักษณะเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้ข้างมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อก่อโรคนานมาก ส่งผลให้มีความหลากหลายของ MHC ที่ค่อนข้างสูง (89, 90) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Archie และคณะ ที่ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่ง DQA บน MHC ของข้าง เป็นข้างแอฟริกา จำนวน 30 เชื้อ และข้างเอเชีย จำนวน 3 เชื้อ ในการศึกษาพบว่า รูปแบบของ ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง DQA ของข้าง ส่วนใหญ่มีคล้ายคลึงกับความหลากหลาย ของ DQA ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น ลิงบาบูนป่า และแมวป่าเวดเดลล์ (91)

จากการศึกษาที่ผ่านมา การพัฒนาวิธีการวินิจฉัยวัณโรคในข้าง เป็นการกระตุ้น PBMCs ของข้าง ซึ่งจะต้องมีการปั่นแยก PBMCs และการใช้โปรตีน ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจน ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของข้างให้หลั่ง eIFN $\gamma$  จะต้องใช้ระยะเวลาานาน 72 ชั่วโมง (17)

งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจ โดยลดขั้นตอนในกระบวนการกระตุ้นเซลล์เพื่อง่ายต่อผู้ใช้งาน และลดระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้น โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด (whole blood) โดยไม่ต้องแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาก่อน โดยอาศัยหลักการเดียวกับชุดตรวจ QFT ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ ซึ่งเป็นการกระตุ้น whole blood ด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6, CFP10 และ TB7.7 (13) และพบการใช้หลักการนี้ในการวินิจฉัยวัณโรคในสัตว์ เช่น ควายป่าแอฟริกา, หมาป่าแอฟริกา และ แรดขาว (54, 55, 92)

การวินิจฉัยวัณโรคแบบ whole blood culture คือ การกระตุ้น PBMCs ของข้างใน whole blood โดยการเติมไมโตเจนหรือแอนติเจนให้ผสมกับเลือด (15, 16) ซึ่งจะต้องมีกลุ่มควบคุมบวก เพื่อยืนยันการตอบสนองของเซลล์ในเลือด โดย IGRA ที่การกระตุ้นแบบ PBMC culture ที่ถูกพัฒนาโดย ทรงเกียรติ ทรงธรรมานุภาพ มีการใช้ ConA เป็นกลุ่มควบคุมบวก เนื่องจากพบว่า ConA และ PWM มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการหลั่ง eIFN $\gamma$  ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ แต่พบว่า ConA ทำให้มีการหลั่ง eIFN $\gamma$  ในปริมาณมากกว่าการกระตุ้นด้วย PWM จึงเลือกใช้ ConA เป็นสารกระตุ้นในกลุ่มควบคุมบวก (17) การกระตุ้นดังกล่าวเป็นการแยก PBMCs ออกมาจากเลือดก่อน จึงทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีเฉพาะกลุ่มของ T cell ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของ ConA ที่เป็นไมโตเจนที่สามารถกระตุ้นได้เฉพาะ T cell เท่านั้น (93) ในทางตรงกันข้าม PWM สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T cell และ B cell จึงอาจมีโมเลกุลของ PWM บางส่วนไปจับกับ B cell receptor ทำให้มีจำนวนโมเลกุลของ PWM ที่จะไปกระตุ้น T cell ลดน้อยลง ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PWM น้อยลง จึงมีปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่ต่ำกว่าการกระตุ้นด้วย ConA (94) ในขณะที่การกระตุ้นแบบ whole blood culture ไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  หลังกระตุ้น PBMCs ในเลือดด้วย ConA แต่พบการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PWM และ ConA ร่วมกับ PWM และพบว่ากระตุ้นด้วย PWM ทำให้มีการหลั่ง eIFN $\gamma$  ในปริมาณมากกว่าการกระตุ้นด้วย ConA ร่วมกับ PWM ดังนั้น จึงเลือก PWM เป็นไมโตเจนในกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปี พ.ศ. 2556 มีการรายงาน PWM สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ในช้างเอเชียและช้างแอฟริกา และสามารถกระตุ้นได้ทั้งช้างที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อวัณโรค (15) หลังจากนั้นมีการพัฒนาการตรวจการติดเชื้อวัณโรคในช้าง โดยทำการคัดเลือกไมโตเจนที่ใช้ในกลุ่มควบคุมบวก พบว่า PWM มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดให้หลั่ง eIFN $\gamma$  ได้

และมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้ PHA ที่เป็นกลุ่มควบคุมบวกในชุดตรวจ QFT ในการวินิจฉัยวัณโรคในมนุษย์ (16) และพบว่า PWM มีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างกับหลอดไมโตเจนในชุดตรวจ QFT-Plus ในการกระตุ้นเลือดหมาป่าแอฟริกา (53) อีกทั้งยังพบการใช้ PWM เป็นกลุ่มควบคุมบวกใน Bovigam assay (95) และมีประสิทธิภาพในการกระตุ้น Bovine-PBMCs ให้หลั่ง Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 and IFN $\gamma$  ได้ดีกว่าการใช้ PHA และ ConA ตามลำดับ (96) อาจเนื่องมาจาก PWM มีโดเมนที่จำเพาะ 2 โดเมน สำหรับเชื่อมโยงกับ membrane receptors (97) จึงมีศักยภาพสูงกว่าในการกระตุ้น กล่าวอีกนัยหนึ่ง พบการรายงานที่ ConA เป็นโมเลกุลที่สามารถจับกับ glycoprotein บริเวณผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งในเลือดมีองค์ประกอบของเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้น ในการกระตุ้นแบบ whole blood culture มีโอกาสที่ ConA จะไปจับกับบริเวณผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง จึงเหลือจำนวนโมเลกุลของ ConA ที่สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดน้อยลง ส่งผลให้มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย ConA น้อยกว่าจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PWM ทำให้พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  ออกมาในปริมาณที่น้อยจนไม่สามารถวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ได้ (98, 99, 100)

การตรวจการติดเชื้อวัณโรคในช้าง ด้วยการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด โดยการเติมไมโตเจนหรือแอนติเจนให้ผสมกับเลือด (15) จากการทดลองได้ทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดช้าง จำนวน 15 เชือก ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 (จากผลการศึกษาที่ 4.4.3) พบว่า มีช้างจำนวน 13 เชือก มีผลตรวจด้วยทั้ง 2 วิธี ที่ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ช้างอีก 2 เชือก มีผลตรวจด้วยทั้ง 2 วิธี แตกต่างกัน ซึ่งทำการทดลองในเวลาเดียวกัน และใช้ตัวอย่างเลือดเดียวกัน แบ่งเป็น 2 กรณี คือ กรณีที่ 1 ช้างที่มีผลตรวจด้วยวิธี PBMCs culture เป็นบวก แต่เมื่อตรวจด้วยวิธี whole blood culture พบผลเป็นลบ อาจเกิดจากการที่ช้างเชือกนี้มีอาการของวัณโรคที่รุนแรงทำให้มีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือดต่ำกว่าช้างเชือกอื่น ๆ สอดคล้องกับข้อจำกัดของการตรวจวัณโรคในมนุษย์ที่พบว่าชุดตรวจ QFT อาจให้ผลที่ผิดพลาดในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จึงมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ต่ำจนไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  (101) และกรณีที่ 2 ช้างที่มีผลตรวจด้วยวิธี PBMCs culture เป็นลบ แต่เมื่อตรวจด้วยวิธี whole blood culture พบผลเป็นบวก ซึ่งมีรายงานการตรวจวัณโรคของช้างเชือกนี้ เมื่อปี พ.ศ. 2560 พบว่าช้างเชือกนี้มีผลตรวจเป็นบวก โดยมีการตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วย CFP10 เพียงอย่างเดียว

และพบผลการตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันที่ทำการตรวจวัดแอนติบอดีด้วยวิธี MAPIA พบว่า มีผลตรวจเป็นบวก (ภาคผนวก)

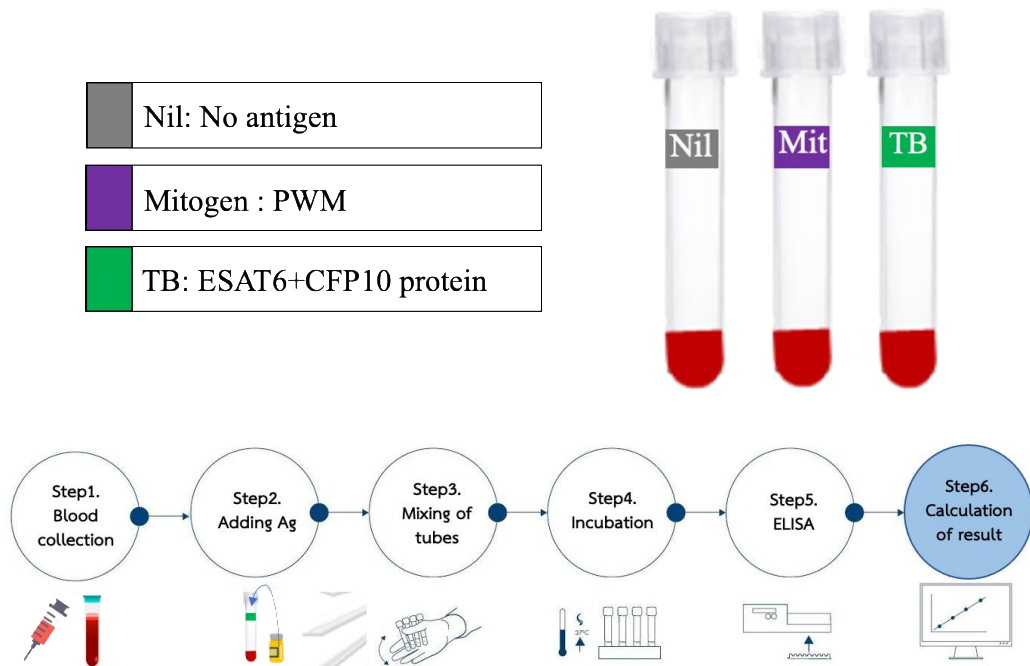
จากนั้นได้นำกลุ่มของเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ชนิดละ 10 สาย ที่คาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้น PBMCs ของช้างที่ติดเชื้อ MTBC ให้หลั่ง eIFN $\gamma$  โดยแต่ละสาย ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยกว่าที่ใช้ในการคัดกรองเพปไทด์ นำมากระตุ้น PBMCs ของช้างเชือกที่เคยตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์ดังกล่าว และ PBMCs ของช้างเชือกอื่นที่ไม่เคยถูกกระตุ้นด้วยเพปไทด์กลุ่มดังกล่าว เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกลุ่มเพปไทด์ที่คัดกรองได้ ว่าสามารถกระตุ้น PBMCs ในเลือดได้หรือไม่ ซึ่งพบว่า PBMCs ในเลือด ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยกลุ่มเพปไทด์ที่คัดกรองได้ โดยไม่พบการหลั่ง eIFN $\gamma$  ทั้งในช้างที่ไม่เคยกระตุ้นด้วยเพปไทด์นี้มาก่อน และช้างที่เคยตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยเพปไทด์บางสายในกลุ่มของเพปไทด์นี้ในขั้นตอนการคัดกรองเพปไทด์ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการกระตุ้นแบบ PBMCs culture ที่กล่าวไว้ข้างต้น ดังนั้น จึงไม่สามารถใช้เพปไทด์ที่คัดกรองได้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้น PBMCs ในเลือด แทนการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ CFP10 หรืออาจจะต้องรวมสายเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 ดังที่มีการรายงานการรวมกันของเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเซลล์เทียบเท่ากับการใช้โปรตีนทั้งสายของ ESAT6 และ CFP10 ในการตรวจหาการติดเชื้อวัณโรค (67)

จากศึกษาครั้งนี้ เพื่อพัฒนาวิธี IGRA ด้วยการกระตุ้นแบบ whole blood culture สำหรับการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้าง พบว่า กลุ่มของเพปไทด์ที่คัดกรองได้ ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ด้วยการกระตุ้นทั้ง 2 แบบ ดังนั้นควรมีการคัดกรองเพปไทด์ โดยเพิ่มช้างที่ใช้ในการคัดกรองให้มีจำนวนมากขึ้น และทำการคัดกรองด้วยการใช้เพปไทด์สายเดียวในการกระตุ้น เพื่อให้ได้เพปไทด์ที่มีความจำเพาะในการกระตุ้นมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อปริมาตรเลือดที่ใช้ต่อหลอด เนื่องจากช้างแต่ละเชือกอาจมีจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่แตกต่างกันในเลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตร อาจส่งผลต่อปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งออกมา และควรมีการทดสอบการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวต่อการถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนหรือเพปไทด์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อหาความเข้มข้นของแอนติเจน

หรือเพปไทด์สังเคราะห์ที่เหมาะสมที่จะใช้กระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด อีกทั้งในการวิเคราะห์ผลการตรวจอาจจะต้องมีการทำการวินิจฉัยควบคู่กับการสังเกตอาการทางคลินิกของข้างด้วย อย่างไรก็ตามการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี IGRA จะต้องใช้ตัวอย่างเลือด โดยมีข้อจำกัดในเรื่องของตัวอย่างเลือดที่ได้จะต้องทำการทดลองภายในเวลา 8-24 ชั่วโมง หลังจากทำการเก็บ เนื่องจากความล่าช้าอาจส่งผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของเซลล์และการตอบสนองของเซลล์ ทำให้ประสิทธิภาพของการทดสอบลดลง (61)

ดังนั้น การตรวจการติดเชื้อ MTBC ในข้าง ด้วยวิธี IGRA โดยใช้การกระตุ้นแบบ whole blood culture สามารถใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ESAT6 และ CFP10 เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นการตอบสนองของ PBMCs ในเลือด แทนการใช้เพปไทด์สังเคราะห์ที่คัดกรองได้ และยังคงเป็นวิธีการตรวจที่สามารถตรวจการติดเชื้อวัณโรคได้ทั้งระยะที่แสดงอาการและระยะ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อผู้ใช้งาน เนื่องจากไม่ต้องมีการปั่นเก็บ PBMCs และลดระยะเวลาในการตรวจให้เร็วขึ้น ดังนั้น IGRA ที่ได้พัฒนาขึ้น มีศักยภาพในการใช้เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการวินิจฉัยวัณโรคในข้างในประเทศไทยที่แม่นยำและรวดเร็ว

ในอนาคตสามารถนำผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปในการตรวจการติดเชื้อ MTBC ในข้าง โดยทำการตรึงสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ไมโตเจนและแอนติเจนบริเวณก้นหลอด Polypropylene Round-Bottom Tube โดยในชุดตรวจนี้จะประกอบด้วยหลอดทดลองทั้งหมด 3 หลอด (ภาพที่ 17) ได้แก่ หลอดที่ 1 Nil: ไม่มีสารกระตุ้น (หลอดสีเทา) หลอดที่ 2 Mitogen: ประกอบด้วย PWM (หลอดสีม่วง) และหลอดที่ 3 TB: รีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 ร่วมกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน CFP10 (หลอดสีเขียว) โดยการตรวจนั้น ผู้ตรวจสามารถเจาะเลือดข้าง และแบ่งเลือดใส่ในแต่ละหลอดได้ทันที จากนั้นทำการเขย่าหลอดเพื่อให้เลือดผสมกับแอนติเจนที่ทำการตรึงไว้ในหลอด และทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเก็บส่วนใสเพื่อทำการตรวจวัดปริมาณ eIFN $\gamma$  ด้วยวิธี Sandwich ELISA



ภาพที่ 17 ชุดตรวจ IGRA สำเร็จรูปที่ใช้ในการตรวจการติดเชื้อ MTBC ในช้าง



## ภาคผนวก ก

## 1. 1x Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม
Type 1 water	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 2. 10x Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4	กรัม
Type 1 water	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 3. PBST (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

10x PBS	100	มิลลิลิตร
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
Type 1 water	900	มิลลิลิตร



#### 4. 0.2 M 3,5',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) buffer pH4 (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

Tri- potassium citrate monohydrate ( $C_6H_5K_3O_7 \cdot H_2O$ )	0.0665	กรัม
Citric acid	39.38	กรัม
Type 1 water	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จนมีค่าเท่ากับ 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 5. TMB substrate solution (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

TMB	0.003	กรัม
Dimethylsulfoxide (DMSO)	0.3	มิลลิลิตร
0.2 TMB buffer pH 4	10	มิลลิลิตร
30% Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )	0.0025	มิลลิลิตร

ละลาย TMB ใน DMSO 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย TMB ปริมาตร 0.250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับ TMB buffer pH4 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สุดท้ายเติม  $H_2O_2$  และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และป้องกันไม่ให้โดนแสง

#### 6. 1M $H_2SO_4$ (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

96% $H_2SO_4$	56	มิลลิลิตร
Type 1 water	944	มิลลิลิตร

#### 7. Completed RPMI 1640 media (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

RPMI 1640	87	มิลลิลิตร
FBS	10	มิลลิลิตร
1 M HEPES	1	มิลลิลิตร
100 mM Sodium pyruvate	1	มิลลิลิตร
100x Penicillin- Streptomycin	1	มิลลิลิตร
Beta-Mercaptoethanol	45.5	ไมโครลิตร

### 8. Freezing media 10% DMSO (ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

Completed RPMI 1640 media	0.9	มิลลิลิตร
DMSO	0.1	มิลลิลิตร

### 9. Red blood cell lysis buffer (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

NH <sub>4</sub> Cl	8.3	กรัม
0.5 M EDTA	0.2	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	1	กรัม
Type 1 water	1000	มิลลิลิตร

จากนั้นกรองผ่าน filter ที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1 ข้อมูลของช้างที่ใช้ในการทดลอง

Elephant sample No.	ชื่อ	เพศ	อายุ	เลขไมโครชิพ	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (*)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (**)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM MAPIA (***)
1	พลายโชคดี	ผู้	8	122912325A	MP	MP	MP
2	พังอภัสรา	เมีย	34	121719154A	MP	MP	MP
3	พังกรุงศรี	เมีย	70	116713452A	MP	MP	MP
4	พังวาสนา	เมีย	20	4D00004024	MP	MP	MP
5	พังน้ำฝน	เมีย	19	114824737A	-	MP	MS
6	พังน้ำอ้อย	เมีย	7	116526571A	-	MP	MP
7	พลายปู้ตี	ผู้	34	115326316A	N	MP	MP
8	พังวนิดา	เมีย	16	114776514A	-	MP	MP
9	พังมนต์	เมีย	34	TN*006*805*528	N	MP	MP

(\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดย นายทรงเกียรติ พรธรรมานุภาพ

(\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 (ช่วงบางเชือกเข้าร่วมโครงการในภายหลัง)

(\*\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี MAPIA ผลการตรวจปี พ.ศ. 2564 โดย ดร. วันดี ยินดียั่งยืน

(-) ไม่ได้ตรวจ หรือไม่ทราบข้อมูล

MP: MTBC infection positive    N: MTBC infection negative    NTM: NTM infection positive    MS: MTBC infection suspected

ตารางที่ 1 ข้อมูลของช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

Elephant sample No.	ชื่อ	เพศ	อายุ	เลขไมโครชิพ	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (*)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (**)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM MAPIA (***)
10	พังจิม (สวนสัตว์)	เมีย	27	4D00022562	N	MP	-
11	พังแสนดาว	เมีย	10	9.00012E+14	N	N	-
12	พลายเปียก	ผู้	76	4D00031922	N	N	-
13	พลายเขาเขียว	ผู้	17	4D00002012	N	N	-
14	พลายปู้ที (บุญส่ง)	ผู้	7	115316696A	-	N	N
15	พังน้องเล็ก	เมีย	15	4D00027637	N	N	MS
16	พังน้ำโชค	เมีย	16	4D00032408	MP	N	MP
17	พังลินดา	เมีย	18	116836733A	-	NTM	MP
18	พังน้ำหวาน	เมีย	10	114644570A	N	NTM	N
19	พังแม่บ่อทอง	เมีย	31	4D00031068	-	NTM	N

(\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดย นายทรงเกียรติ ทรงธรรมานภาพ

(\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 (ข้างบางเชื้อถูกใช้ร่วมโครงการในภายหลัง)

(\*\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี MAPIA ผลการตรวจปี พ.ศ. 2564 โดย ดร. วันดี ยืนตั้งยืน

(-) ไม่ได้ตรวจ หรือไม่ทราบข้อมูล

MP: MTBC infection positive    N: MTBC infection negative    NTM: NTM infection positive    MS: MTBC infection suspected

ตารางที่ 1 ข้อมูลของช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

Elephant sample No.	ชื่อ	เพศ	อายุ	เลขไมโครชิพ	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (*)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (**)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM MAPIA (***)
20	พลายทรัพย์ทวี	ผู้	4	122719237A	N	NTM	N
21	พังจันทร์เพ็ญ (สวนสัตว์)	เมีย	46	4D00000235	N	N	-
22	พังนนท์	เมีย	60	122767316A	N	N	-
23	พลายมงคล	ผู้	31	122749764A	N	N	-
24	พังทองค้ายาย	เมีย	80	115231125A	-	N	MP
25	พังสมหวัง	เมีย	21	4D00004638	N	N	N
26	พังบัวเงิน	เมีย	19	4D00033577	MP	MP	MP
27	พังทองเงิน	เมีย	11	116818716A	N	N	MS
28	พลายธงชัย	ผู้	65	116929751A	-	N	N
29	พังกำไลทอง	เมีย	18	115215592A	MP	MP	N

(\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดย นายทรงเกียรติ ทรงธรรมานภาพ

(\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 (ข้างบางเชือกเข้าร่วมโครงการในภายหลัง)

(\*\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี MAPIA ผลการตรวจปี พ.ศ. 2564 โดย ดร. วันดี ยินดียั่งยืน

(-) ไม่ได้ตรวจ หรือไม่ทราบข้อมูล

MP: MTBC infection positive    N: MTBC infection negative    NTM: NTM infection positive    MS: MTBC infection suspected

ตารางที่ 1 ข้อมูลของช้างที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

Elephant sample No.	ชื่อ	เพศ	อายุ	เลขไมโครชิพ	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (*)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM PBMCs IGRA (**)	ประวัติการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM MAPIA (***)
30	พังสมใจ	เมีย	36	6809868	-	MP	MP
31	พังศรีจันทร์	เมีย	4	122761677A	N	N	MS
32	พังแม่หางดี	เมีย	15	4D00015153	MP	MP	N
33	พังบีใหม่	เมีย	3	123126144A	-	MS	N
34	พังน้องต่าย	เมีย	16	4D00033241	MP	MP	N
35	พังคำแสน (พีเม)	เมีย	10	122912285A	-	MP	N
36	พังแดงโม	เมีย	13	114776257A	-	MP	N
37	พังแม่น้อย	เมีย	15	114558563A	-	MP	N
38	พังแสนหลวง	เมีย	33	AVID*001*256*572	N	MP	-
39	พลายวัง	ผู้	-	ไม่มีข้อมูล	-	MP	MP

(\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดย นายทรงเกียรติ ทรงธรรมานภาพ

(\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี PBMCs IGRA ระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 (ช่วงบางเชือกเข้าร่วมโครงการในภายหลัง)

(\*\*\*) ตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ด้วยวิธี MAPIA ผลการตรวจปี พ.ศ. 2564 โดย ดร. วันดี ยืนดียั่งยืน

(-) ไม่ได้ตรวจ หรือไม่ทราบข้อมูล

MP: MTBC infection positive    N: MTBC infection negative    NTM: NTM infection positive    MS: MTBC infection suspected

ตารางที่ 2 ปริมาณ eIFN $\gamma$  ที่หลั่งจาก PBMCs ของช้างหลังถูกกระตุ้นด้วยรีแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ในการตรวจการติดเชื้อ MTBC หรือ NTM ในช้างด้วยวิธี IGRA โดยใช้ PBMCs

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration					Infection status
	Stimulating antigens					
	ConA	PPDB	PPDA	ESAT6	CFP10	
1	0.432	0.280	0.460	0.227	0.000	MP
2	0.577	0.809	0.619	0.469	0.758	MP
3	0.622	0.622	ND	IND	0.658	MP
4	1.140	1.178	1.074	ND	0.902	MP
5	0.475	0.436	0.484	0.408	0.000	MP
6	0.857	0.904	1.075	0.851	1.154	MP
7	1.275	1.040	0.770	0.807	0.877	MP
8	1.009	0.986	1.111	0.725	0.817	MP
9	1.328	1.386	0.888	0.782	1.305	MP
10	0.861	0.833	0.805	ND	0.464	MP
11	0.395	ND	ND	ND	ND	N
12	0.512	ND	ND	ND	ND	N
13	0.626	ND	ND	ND	ND	N
14	0.406	ND	ND	ND	ND	N
15	0.198	ND	ND	ND	ND	N
16	0.889	ND	ND	ND	ND	N
17	0.565	ND	0.533	ND	ND	NTM
18	0.969	0.909	0.908	ND	ND	NTM
19	0.451	ND	0.434	ND	ND	NTM
20	0.404	0.000	0.444	ND	ND	NTM

MP: MTBC infection positive, N: MTBC infection negative, NTM: NTM infection positive

ND = Not detected, IND = Indeterminate

ตารางที่ 3 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือ หลายสายรวมกัน (n=20)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration										
	ESAT6 peptides										
	ESAT6	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
1	0.287	0.309	0.274	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0.767	0.503	0.503	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	1.037	0.358	0.358	0.358	0.358	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	0.437	0.378	0.378	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	0.991	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	0.776	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.844	0.844	ND	ND
8	0.823	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.725	0.725
9	1.108	ND	ND	ND	ND	0.764	0.764	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected



ตารางที่ 3 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20) (ต่อ)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration										
	ESAT6 peptides										
	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21
1	ND	ND	ND	ND	ND	0.278	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	0.791	0.791	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 4 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration								
	CFP10 peptides								
	CFP10	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	0.811	0.444	0.444	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	1.090	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.334	0.378
4	1.004	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	1.162	1.003	1.003	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	0.934	ND	ND	0.773	0.773	ND	ND	ND	ND
8	0.899	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	1.309	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	0.701	ND	ND	ND	ND	0.555	0.555	0.555	0.555
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 4 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20) (ต่อ)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration								
	CFP10 peptides								
	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	0.439	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	0.867	0.867	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.850
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.902
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 4 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน CFP10 ด้วยสายเดี่ยว และ/หรือหลายสายรวมกัน (n=20) (ต่อ)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration					
	CFP10 peptides					
	C18	C19	C20	C21	C22	C23
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	0.407	ND	ND	ND	0.534	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	0.850	ND	ND	ND	ND	ND
9	0.902	ND	ND	ND	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 5 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 โดยใช้ PBMCs (n=15)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration				
	Stimulating antigens				
	ConA	ESAT6	CFP10	ESAT6 peptides pool	CFP10 peptides pool
1	0.888	0.615	0.838	ND	ND
2	0.771	0.806	0.906	ND	ND
4	0.752	0.730	0.789	ND	ND
8	0.662	0.592	0.664	ND	ND
9	0.443	0.608	0.649	ND	ND
18	0.576	ND	ND	ND	ND
19	0.497	ND	ND	ND	ND
25	0.741	ND	ND	ND	ND
26	0.524	0.823	0.792	ND	ND
27	0.487	ND	ND	ND	ND
28	0.850	ND	ND	ND	ND
29	0.516	0.573	0.598	ND	ND
30	0.714	0.583	0.729	ND	ND
31	0.514	ND	ND	ND	ND
32	0.734	0.727	0.810	ND	ND

ND = Not detected

ตารางที่ 6 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยไมโตเจน ด้วยวิธี whole blood culture (n=10)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration			
	Stimulating mitogens			
	Unstimulated	ConA	PWM	ConA+PWM
3	ND	ND	3.879	3.818
19	ND	ND	1.398	1.391
33	ND	ND	1.163	1.327
34	ND	ND	1.637	1.586
35	ND	ND	2.950	2.771
36	ND	ND	1.306	1.148
37	ND	ND	2.375	2.139
38	ND	ND	2.048	2.037
39	ND	ND	1.995	1.958
39	ND	ND	0.270	0.269

ND = Not detected

ตารางที่ 7 ผลการกระตุ้น PBMCs ของช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ PBMCs culture (PC) และ whole blood culture (WC) (n=15)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration							
	Stimulating antigens							
	PBMCs culture (PC)				whole blood culture (WC)			
ConA	ESAT6	CFP10	Infection status	PWM	ESAT6	CFP10	Infection status	
2	0.577	0.469	0.758	MP	1.974	2.865	2.695	MP
3	0.622	IND	0.658	MP	3.879	3.935	2.221	MP
4	1.140	ND	0.902	MP	1.010	1.218	1.506	MP
7	1.275	0.807	0.877	MP	1.145	ND	ND	N
8	1.009	0.725	0.817	MP	1.240	1.604	0.981	MP
9	1.328	0.782	1.305	MP	0.649	IND	0.631	MP
11	0.733	ND	ND	N	1.983	ND	ND	N
16	0.889	ND	ND	N	1.023	IND	0.949	MP
19	0.451	ND	ND	N	1.687	ND	ND	N
21	0.456	ND	ND	N	1.508	ND	ND	N
22	0.937	ND	ND	N	2.231	ND	ND	N
23	0.862	ND	ND	N	1.682	ND	ND	N
24	1.201	ND	ND	N	0.624	ND	ND	N
25	0.519	ND	ND	N	1.769	ND	ND	N
26	0.557	0.634	0.702	MP	1.630	ND	1.644	MP

MP: MTBC infection positive, N: MTBC infection negative, NTM: NTM infection positive

ND = Not detected, IND = Indeterminate

ตารางที่ 8 ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดข้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ PBMCs culture (n=15)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration					
	Stimulating antigens					
	PBMCs culture					
	ConA	ESAT6	CFP10	ESAT6 peptides pool	CFP10 peptides pool	Infection status
1	0.888	0.615	0.838	ND	ND	MP
2	0.771	0.806	0.906	ND	ND	MP
4	0.752	0.730	0.789	ND	ND	MP
8	0.662	0.592	0.664	ND	ND	MP
9	0.443	0.608	0.649	ND	ND	MP
18	0.576	ND	ND	ND	ND	N
19	0.497	ND	ND	ND	ND	N
25	0.741	ND	ND	ND	ND	N
26	0.524	0.823	0.792	ND	ND	MP
27	0.487	ND	ND	ND	ND	N
28	0.850	ND	ND	ND	ND	N
29	0.516	0.573	0.598	ND	ND	MP
30	0.714	0.583	0.729	ND	ND	MP
31	0.514	ND	ND	ND	ND	N
32	0.734	0.727	0.810	ND	ND	MP

MP: MTBC infection positive, N: MTBC infection negative, NTM: NTM infection positive

ND = Not detected, IND = Indeterminate



ตารางที่ 8 ผลการกระตุ้น PBMCs ในเลือดช้างด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน และเพปไทด์ของโปรตีน ESAT6 และ CFP10 แบบ whole blood culture (n=15) (ต่อ)

Elephant Sample No.	eIFN $\gamma$ concentration					
	Stimulating antigens					
	whole blood culture					
	PWM	ESAT6	CFP10	ESAT6 peptides pool	CFP10 peptides pool	Infection status
1	1.436	1.514	1.602	ND	ND	MP
2	1.700	2.282	2.032	ND	ND	MP
4	0.937	0.000	1.084	ND	ND	MP
8	1.596	0.997	IND	ND	ND	MP
9	1.904	2.536	2.409	ND	ND	MP
18	1.014	0.000	0.000	ND	ND	N
19	0.978	0.000	0.000	ND	ND	N
25	1.221	0.000	0.000	ND	ND	N
26	2.127	2.190	2.164	ND	ND	MP
27	0.827	0.000	0.000	ND	ND	N
28	0.792	0.000	0.000	ND	ND	N
29	1.145	1.197	IND	ND	ND	MP
30	1.806	3.451	3.944	ND	ND	MP
31	1.008	0.000	0.000	ND	ND	N
32	1.241	0.000	0.000	ND	ND	N

MP: MTBC infection positive, N: MTBC infection negative, NTM: NTM infection positive

ND = Not detected, IND = Indeterminate



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## บรรณานุกรม

1. Mason RJ, Slutsky A, Murray JF, Nadel JA, Gotway MB. Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book: Elsevier Health Sciences; 2015.
2. Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 2001;81(1-2):23-41.
3. Montali RJ, Mikota SK, Cheng LI. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev Sci Tech*. 2001;20(1):291-303.
4. Michalak K, Austin C, Diesel S, Bacon MJ, Zimmerman P, Maslow JN. *Mycobacterium tuberculosis* infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(2):283-7.
5. Murphree R, Warkentin JV, Dunn JR, Schaffner W, Jones TF. Elephant-to-human transmission of tuberculosis, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(3):366-71.
6. Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Olsen JH, Ball R, Dumonceaux G, et al. Tuberculosis in elephants: antibody responses to defined antigens of *Mycobacterium tuberculosis*, potential for early diagnosis, and monitoring of treatment. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(7):722-32.
7. Greenwald R, Lyashchenko O, Esfandiari J, Miller M, Mikota S, Olsen JH, et al. Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(5):605-12.
8. Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci*. 1990;49(1):46-9.
9. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitt's essential immunology*: John Wiley & Sons; 2017.
10. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Martins TB, Litwin CM. Evaluation of an in vitro assay for gamma interferon production in response to *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(6):1089-93.

11. Stavri HR, Murgoci G, Ulea I, Popa LG, Popa M. Prospective Comparison of Two Brands of Tuberculin Skin Tests and Quantiferon-TB Gold in-tube Assay Performances for Tuberculosis Infection in Hospitalized Children. *Maedica (Bucur)*. 2010;5(4):271-6.
12. Skjot RL, Oettinger T, Rosenkrands I, Ravn P, Brock I, Jacobsen S, et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun*. 2000;68(1):214-20.
13. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2009;33(5):956-73.
14. Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis*. 2008;88(6):510-7.
15. Angkawanish T, Morar D, van Kooten P, Bontekoning I, Schreuder J, Maas M, et al. The elephant interferon gamma assay: a contribution to diagnosis of tuberculosis in elephants. *Transbound Emerg Dis*. 2013;60 Suppl 1:53-9.
16. Paudel S, Villanueva MA, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Subedi S, et al. Development and evaluation of an interferon-gamma release assay in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J Vet Med Sci*. 2016;78(7):1117-21.
17. Songthammanuphap S, Puthong S, Pongma C, Buakeaw A, Prammananan T, Warit S, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in Asian elephants (*Elephas maximus*) using an interferon gamma release assay in a captive elephant herd. *Sci Rep*. 2020;10(1):14551.
18. Gilpin C, Korobitsyn A, Migliori GB, Raviglione MC, Weyer K. The World Health Organization standards for tuberculosis care and management. *Eur Respiratory Soc*; 2018.
19. Bouakaze C, Keyser C, de Martino SJ, Sougakoff W, Veziris N, Dabernat H, et al. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex species by use of a SNaPshot Minisequencing-based assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1758-66.
20. Collard CD. *Harrison's Pulmonary and Critical Care Medicine*. Texas Heart Institute Journal. 2010;37(6):736.
21. Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King Jr TE, Lazarus SC, Murray JF, et al. *Murray & Nadel's textbook of respiratory medicine*: Elsevier; 2016.

22. Mason RJ, Broaddus VC, Martin TR, King TE, Schraufnagel D, Murray JF, et al. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine E-Book: 2-Volume Set: Elsevier Health Sciences; 2010.
23. Loscalzo J. Harrison's Pulmonary and Critical Care Medicine, 2e: McGraw-Hill Publishing; 2013.
24. Euzéby J. List of prokaryotic names with standing in nomenclature, genus Mycobacterium. Société de Bactériologie Systématique et Vétérinaire, Blagnac, France. 2012.
25. Halstrom S, Price P, Thomson R. Environmental mycobacteria as a cause of human infection. International journal of mycobacteriology. 2015;4(2):81-91.
26. Wagner D, Young L. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. Infection. 2004;32(5):257-70.
27. Kampitak T, Suwanpimolkul G, Browne S, Suankratay C. Anti-interferon- $\gamma$  autoantibody and opportunistic infections: case series and review of the literature. Infection. 2011;39(1):65-71.
28. Chetchotisakd P, Kiertiburanakul S, Mootsikapun P, Assanasen S, Chaiwarith R, Anunnatsiri S. Disseminated nontuberculous mycobacterial infection in patients who are not infected with HIV in Thailand. Clinical infectious diseases. 2007;45(4):421-7.
29. Henry M, Inamdar L, O'riordain D, Schweiger M, Watson J. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. European Respiratory Journal. 2004;23(5):741-6.
30. Horsburgh Jr CR, editor Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Seminars in respiratory infections; 1996.
31. Sungkanuparph S, Sathapatayavongs B, Prachartam R. Infections with rapidly growing mycobacteria: report of 20 cases. International Journal of Infectious Diseases. 2003;7(3):198-205.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology E-book: Elsevier; 2021.
33. Rivera A, Siracusa MC, Yap GS, Gause WC. Innate cell communication kick-starts pathogen-specific immunity. Nature immunology. 2016;17(4):356-63.

34. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(4):289-99.
35. Zlot A, Vines J, Nystrom L, Lane L, Behm H, Denny J, et al. Diagnosis of Tuberculosis in Three Zoo Elephants and a Human Contact - Oregon, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;64(52):1398-402.
36. Obanda V, Poghon J, Yongo M, Mulei I, Ngotho M, Waititu K, et al. First reported case of fatal tuberculosis in a wild African elephant with past human-wildlife contact. *Epidemiol Infect*. 2013;141(7):1476-80.
37. Zachariah A, Pandiyan J, Madhavalatha GK, Mundayoor S, Chandramohan B, Sajesh PK, et al. Mycobacterium tuberculosis in Wild Asian Elephants, Southern India. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):504-6.
38. Une Y, Mori T. Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2007;30(5-6):415-25.
39. Mikota SK, Maslow JN. Tuberculosis at the human-animal interface: an emerging disease of elephants. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(3):208-11.
40. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Whipple DL. Mycobacterial isolations in captive elephants in the United States. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;969:256-8.
41. Dumonceaux GA, St Leger J, Olsen JH, Burton MS, Ashkin D, Maslow JN. Genitourinary and pulmonary multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis infection in an Asian elephant (*Elephas maximus*). *J Zoo Wildl Med*. 2011;42(4):709-12.
42. Lewerin SS, Olsson SL, Eld K, Roken B, Ghebremichael S, Koivula T, et al. Outbreak of Mycobacterium tuberculosis infection among captive Asian elephants in a Swedish zoo. *Vet Rec*. 2005;156(6):171-5.
43. Angkawanish T, Wajjwalku W, Sirimalaisuwan A, Mahasawangkul S, Kaewsakhorn T, Boonsri K, et al. Mycobacterium tuberculosis infection of domesticated Asian elephants, Thailand. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(12):1949-51.
44. Ong BL, Ngeow YF, Razak MF, Yakubu Y, Zakaria Z, Mutalib AR, et al. Tuberculosis in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) in Peninsular Malaysia. *Epidemiol Infect*. 2013;141(7):1481-7.

45. Lassausaie J, Bret A, Bouapao X, Chanthavong V, Castonguay-Vanier J, Quet F, et al. Tuberculosis in Laos, who is at risk: the mahouts or their elephants? *Epidemiology & Infection*. 2015;143(5):922-31.
46. Mikota SK, Gairhe K, Giri K, Hamilton K, Miller M, Paudel S, et al. Tuberculosis surveillance of elephants (*Elephas maximus*) in Nepal at the captive-wild interface. *European Journal of Wildlife Research*. 2015;61(2):221-9.
47. Yakubu Y, Ong BL, Zakaria Z, Hassan L, Mutalib AR, Ngeow YF, et al. Evidence and potential risk factors of tuberculosis among captive Asian elephants and wildlife staff in Peninsular Malaysia. *Preventive veterinary medicine*. 2016;125:147-53.
48. Zachariah A, Pandiyan J, Madhaviatha G, Mundayoor S, Chandramohan B, Sajesh P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* in wild Asian elephants, southern India. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(3):504.
49. Lyashchenko KP, Singh M, Colangeli R, Gennaro ML. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *J Immunol Methods*. 2000;242(1-2):91-100.
50. Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Mikota S, Miller M, Moller T, et al. Field application of serodiagnostics to identify elephants with tuberculosis prior to case confirmation by culture. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(8):1269-75.
51. Vogelnest L, Hulst F, Thompson P, Lyashchenko KP, Herrin KA. Diagnosis and management of tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) in an Asian elephant (*Elephas maximus*) with a newborn calf. *J Zoo Wildl Med*. 2015;46(1):77-85.
52. McGee JL, Wiedner E, Isaza R. Prenatal passive transfer of *Mycobacterium tuberculosis* antibodies in Asian elephant (*Elephas maximus*) calves. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2014;45(4):955-7.
53. Higgitt RL, Schalkwyk OLV, deKlerk-Lorist LM, Buss PE, Caldwell P, Rossouw L, et al. An Interferon Gamma Release Assay for the Detection of Immune Sensitization to *Mycobacterium Bovis* in African Wild Dogs (*Lycaon Pictus*). *J Wildl Dis*. 2019;55(3):529-36.
54. Chileshe J, Roos EO, Goosen WJ, Buss P, Hausler G, Rossouw L, et al. An interferon-gamma release assay for the diagnosis of the *Mycobacterium bovis* infection in white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). *Vet Immunol Immunopathol*. 2019;217:109931.



55. Bernitz N, Clarke C, Roos EO, Goosen WJ, Cooper D, van Helden PD, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in African buffaloes (*Syncerus caffer*) using QuantiFERON((R))-TB Gold (QFT) tubes and the Qiagen cattle type((R)) IFN-gamma ELISA. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018;196:48-52.
56. Vordermeier H, Whelan A, Cockle P, Farrant L, Palmer N, Hewinson R. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2001;8(3):571-8.
57. Maas M, Van Kooten P, Schreuder J, Morar D, Tijhaar E, Michel A, et al. Development of a lion-specific interferon-gamma assay. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2012;149(3-4):292-7.
58. Waters W, Palmer M, Thacker T, Orloski K, Nol P, Harrington N, et al. Blood culture and stimulation conditions for the diagnosis of tuberculosis in cervids by the Cervigam assay. *Veterinary record.* 2008;162(7):203-8.
59. Chambers M. Review of the diagnosis of tuberculosis in non-bovid wildlife species using immunological methods—an update of published work since 2009. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2013;60:14-27.
60. Prevention ECfD, Control. Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. ECDC. 2011.
61. Gormley E, Doyle M, McGill K, Costello E, Good M, Collins J. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2004;102(4):413-20.
62. Association NTC. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep.* 2005;54:1-47.
63. Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, Iademarco MF, Vernon A. Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB G Test for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States. *MMWR.* 2005;15:49-55.

64. Mak TW, Saunders ME. The immune response. Part I: Basic Immunology. 2006:373-401.
65. Prasad TSK, Verma R, Kumar S, Nirujogi RS, Sathe GJ, Madugundu AK, et al. Proteomic analysis of purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis. *Clinical proteomics*. 2013;10(1):1-9.
66. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live Mycobacterium tuberculosis-, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;16(7):991-8.
67. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infection and immunity*. 2000;68(6):3314-21.
68. Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SH, Munk ME. Increased numbers of ESAT-6- and purified protein derivative-specific gamma interferon-producing cells in subclinical and active tuberculosis infection. *Infection and immunity*. 2000;68(10):6073-6.
69. Scarpellini P, Tasca S, Galli L, Beretta A, Lazzarin A, Fortis C. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3469-74.
70. Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, Franken KL, Lugos MD, Jeffries DJ, et al. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(5):2070-4.
71. Ghodbane R, Drancourt M. Non-human sources of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. 2013;93(6):589-95.
72. Ocepek M, Pate M, Žolnir-Dovč M, Poljak M. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from human to cattle. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(7):3555-7.
73. Michalak K, Austin C, Diesel S, Bacon M, Zimmerman P, Maslow JN. Mycobacterium tuberculosis infection as a zoonotic disease: transmission between humans and elephants. *Emerging infectious diseases*. 1998;4(2):283.

74. Maslow J, Mikota S. Tuberculosis in elephants—a reemergent disease: diagnostic dilemmas, the natural history of infection, and new immunological tools. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA; 2015.
75. Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Andersen P, de Lisle GW. Use of ESAT-6 in the interferon- $\gamma$  test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary microbiology*. 2001;80(1):37-46.
76. León-García MC, Ríos-Castro E, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Evaluation of cell wall damage by dimethyl sulfoxide in *Candida* species. *Research in microbiology*. 2017;168(8):732-9.
77. Chen X, Thibeault S, editors. Effect of DMSO concentration, cell density and needle gauge on the viability of cryopreserved cells in three dimensional hyaluronan hydrogel. 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC); 2013: IEEE.
78. Ballingall KT, Bontrop RE, Ellis SA, Grimholt U, Hammond JA, Ho C-S, et al. Comparative MHC nomenclature: report from the ISAG/IUIS-VIC committee 2018. *Immunogenetics*. 2018;70(10):625-32.
79. Agrawal S, Kishore MC. MHC class I gene expression and regulation. *Journal of hematotherapy & stem cell research*. 2000;9(6):795-812.
80. Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. Expression of MHC II genes. *Molecular Analysis of B Lymphocyte Development and Activation*. 2005:147-70.
81. Schmitt L, Boniface JJ, Davis MM, McConnell HM. Conformational isomers of a class II MHC-peptide complex in solution. *Journal of molecular biology*. 1999;286(1):207-18.
82. Zarutskie JA, Sato AK, Rushe MM, Chan IC, Lomakin A, Benedek GB, et al. A conformational change in the human major histocompatibility complex protein HLA-DR1 induced by peptide binding. *Biochemistry*. 1999;38(18):5878-87.
83. Murin CD, Wilson IA, Ward AB. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses. *Nature microbiology*. 2019;4(5):734-47.

84. Shirai M, Arichi T, Chen M, Nishioka M, Ikeda K, Takahashi H, et al. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *The Journal of Immunology*. 1999;162(1):568-76.
85. Benacerraf B, McDevitt HO. Histocompatibility-linked immune response genes. *Science*. 1972;175(4019):273-9.
86. McDevitt H. The discovery of linkage between the MHC and genetic control of the immune response. *Immunological reviews*. 2002;185(1):78-85.
87. Konnai S, Takeshima Sn, Tajima S, Yin SA, Okada K, Onuma M, et al. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiology and immunology*. 2003;47(3):223-32.
88. Sarri CA, Markantoni M, Stamatis C, Papa A, Tsakris A, Pervanidou D, et al. Genetic contribution of MHC class II genes in susceptibility to West Nile virus infection. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165952.
89. Alberts S. Thirteen Mhc-DQA1 alleles from two populations of baboons. *Immunogenetics*. 1999;49(9):825-7.
90. Lehman N, Decker DJ, Stewart BS. Divergent patterns of variation in major histocompatibility complex class II alleles among Antarctic phocid pinnipeds. *Journal of Mammalogy*. 2004;85(6):1215-24.
91. Archie EA, Henry T, Maldonado JE, Moss CJ, Poole JH, Pearson VR, et al. Major histocompatibility complex variation and evolution at a single, expressed DQA locus in two genera of elephants. *Immunogenetics*. 2010;62(2):85-100.
92. Higgitt RL, Louis van Schalkwyk O, de Klerk-Lorist LM, Buss PE, Caldwell P, Rossouw L, et al. Mycobacterium bovis Infection in African Wild Dogs, Kruger National Park, South Africa. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(7):1425-7.
93. Simon M, Hochgeschwender U, Brugger U, Landolfo S. Monoclonal antibodies to interferon-gamma inhibit interleukin 2-dependent induction of growth and maturation in lectin/antigen-reactive cytolytic T lymphocyte precursors. *The Journal of Immunology*. 1986;136(8):2755-62.

94. Keightley RG, Cooper MD, Lawton AR. The T cell dependence of B cell differentiation induced by pokeweed mitogen. *The Journal of Immunology*. 1976;117(5 Part 1):1538-44.
95. Bass K, Nonnecke B, Palmer M, Thacker T, Hardegger R, Schroeder B, et al. Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013;20(12):1827-35.
96. Norian R, Delirez N, Azadmehr A, editors. Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Research Forum*; 2015: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
97. Symons D, Lay CA, MacDonald A. Stimulation of pig lymphocytes with anti-immunoglobulin serum and mitogens. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1977;54(1):67-77.
98. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annual review of immunology*. 2009;27:591-619.
99. Miller RA, Flurkey K, Molloy M, Luby T, Stadecker MJ. Differential sensitivity of virgin and memory T lymphocytes to calcium ionophores suggests a buoyant density separation method and a model for memory cell hyporesponsiveness to Con A. *The Journal of Immunology*. 1991;147(9):3080-6.
100. Zhao S-y, Zhao X-x, Su H-l, LIU X-y, SUO X. Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine. *Chin Anim Husbandry Vet Med*. 2010;37(12):35-8.
101. Ryu MR, Park M-S, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(11).



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	จิตสุตา พงษ์มา
วัน เดือน ปี เกิด	12 มีนาคม 2538
สถานที่เกิด	กาฬสินธุ์
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาตรี
ที่อยู่ปัจจุบัน	อาคารนิสรีนเฮาส์ ห้อง 201 เลขที่ 15/1 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY