

รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนพัฒนานักวิจัย

โครงการ การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเป็ปไทด์ของ
โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ของเชื้อวัณโรคใน
การช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคและระยะของโรค

ดร.พญ. บุษบัน เชื้ออินทร์

กรมควบคุมโรค
กระทรวงสาธารณสุข

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการและบริจาคเลือดเพื่อการศึกษาวิจัยทุกท่าน

ขอขอบคุณแพทย์ และเจ้าหน้าที่พยาบาลสถาบันบำราศนราดูร สถาบันราชประชาสมาสัย
กรมควบคุมโรค และสถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ ในการช่วยคัดเลือกอาสาสมัคร
ขอความยินยอม และเก็บตัวอย่างเลือด

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสถาบันราชประชาสมาสัย และงานวัณโรคและมัยโค
แบคทีเรีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการช่วยงานวิจัย
ทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนด้าน
งบประมาณแก่โครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ

RSA 4780023

ชื่อโครงการ

การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ของเชื้อวัณโรคในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค และระยะของโรค

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน

ดร.พญ. บุษัน เชื้ออินทร์

สถาบันบำราศนราดูร กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

E-mail Address

boosbun@gmail.com

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ 1. เพื่อค้นหาเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี เพื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนังและน้ำยาทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยแยกโรคการติดเชื้อวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (การผลิต interferon-gamma และ การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 กับระยะของโรค (activity of disease) ในผู้ป่วยวัณโรค เพื่อพัฒนาชุดทดสอบช่วยวินิจฉัยแยกโรคระหว่างวัณโรคระยะกำเริบ กับวัณโรคระยะสงบ 3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 เพื่อวินิจฉัยแยกโรคการติดเชื้อวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 4. เพื่อศึกษาการตอบสนองของ antibody ในน้ำช่องปอด ในการวินิจฉัยแยกผู้ป่วยวัณโรคปอดจากผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ 5. เพื่อค้นหาผู้สัมผัสโรคที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดเป็นวัณโรคในภายหลัง เพื่อผู้สัมผัสโรคกลุ่มนี้จะได้รับการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด หรือได้รับยาป้องกันการเกิดโรค

วิธีการวิจัย

1. ทำการทดสอบการตอบสนองของ IFN- γ ต่อเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบเพื่อหาเปปไทด์ที่กระตุ้นการตอบสนองที่ดี 2. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell-mediated immunity, CMI) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 โดยเทคนิค Proliferation Assay และ IFN- γ ELISA ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ (active) ที่มีผลการตรวจเสมหะเป็นบวก และลบ และผู้ป่วยวัณโรคระยะสงบ (inactive) ผู้ป่วยโรคเรื้อรัง ผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ และผู้สัมผัสโรค 3. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคระยะต่างๆ และที่ติดเชื้อ non-

tuberculous mycobacteria โดยเทคนิค ELISA 4. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง(antibody) ในน้ำช่องปอดของผู้ป่วยวัณโรคและไม่ใช้วัณโรคต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 โดยเทคนิค ELISA 5. ติดตามผู้สัมผัสโรคที่มีผลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 เหมือนผู้ป่วยโรควัณโรค เพื่อดูการกลายเป็นวัณโรคภายในระยะเวลา 2 ปี

ผลวิจัย 1. เปปไทด์ที่กระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้สัมผัสโรค (ผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ) คือ 5 เปปไทด์ จาก ESAT-6 (p1-16, 9-24, p17-32, 57-72 และ p81-96) และ 3 เปปไทด์ จาก CFP-10 (p13-28, p55-72 และ p75-92) จำนวนผู้ป่วยและผู้สัมผัสโรคที่ตอบสนองต่อส่วนผสมของเปปไทด์ (Peptide mixtures) ของ ESAT-6 และ CFP-10 มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนผู้ตอบสนองต่อ ESAT-6 recombinant protein แต่มากกว่า individual peptide เพื่อผลการตอบสนองเปรียบเทียบ mixtures,***, individual 2. พบมีการตอบสนองของ IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ ในระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน แต่ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง ในผู้สัมผัสโรค แต่ยังพบการตอบสนองที่ 6 วัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยวัณโรคระยะกำเริบจากระยะสงบ 3. พบว่าการตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคประเภทต่างๆในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสนใจว่าไม่พบการตอบสนองต่อโปรตีนทั้ง 2 ในผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ ต่อการติดเชื้อวัณโรค และ ประโยชน์ของการนำโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบทางน้ำเหลืองเพื่อช่วยการวินิจฉัยแยกวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ 4.พบมีการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องปอดในผู้ป่วยวัณโรคโดยมีความไวร้อยละ 63.6 และ 54.5 ตามลำดับ และความจำเพาะร้อยละ 70.4 และ 81.5 ตามลำดับ 5. ในกลุ่มผู้สัมผัสโรค คน มี คน (.....%) ที่มีการตอบสนองของ IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่ 24 ชั่วโมงและ 6 วัน

สรุปและวิจารณ์

ข้อเสนอแนะ

Abstract

Project Code RSA 4780023

Project Title Evaluation of immune responses to peptides of
Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins in
diagnosis of tuberculosis and activity of disease

Investigator Dr Boosbun Chua-Intra
Bamrasnaradura Infectious Disease Institute
Department of Disease Control Ministry of Public Health

E-mail Address boosbun@gmail.com

Fast and accurate diagnosis of tuberculosis is a very important element of global measure to control the disease. Current diagnostic tests for tuberculosis based on tuberculin have relatively poor specificity. Early secreted antigenic target 6 kDa protein (ESAT-6) and culture filtrate protein (CFP-10) are antigens of interest because they are expressed by *M.tuberculosis* but absent from *M. bovis* bacilli Calmette-Guerin (BCG) and most environmental mycobacteria. However, recently the homologues of these two proteins were identified in *M.leprae*. Thus, this study aims to identify the *Mycobacterium tuberculosis*-specific immunogenic peptides for the development of a species-specific skin test or IFN- γ blood tests for diagnosis of active tuberculosis and latent infection. The objectives of this preliminary study were 1) to identify the permissive *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 peptides 2) to compare the pattern of T cell recognition between active and latent tuberculosis and 3) to compare the T cell responses between to individual peptides, peptide mixtures and recombinant proteins. Peripheral blood mononuclear cells from 22 active tuberculosis patients and 19 healthy tuberculosis contacts with positive tuberculin reactions were tested for stimulation with 11 peptides from *M.tuberculosis* ESAT-6 protein and 5 peptides from *M.tb* CFP-10 protein, ESAT-6 peptide mixtures, CFP-10 peptide mixtures and ESAT-6 recombinant protein using the lymphocyte proliferation assay and IFN- γ ELISA assay. The results showed that five peptides (p1-16, 9-24, p17-32, 57-72 and p80-95) from ESAT-6 and 3 peptides from CFP-10 (p13-28, p55-72 and p75-92) were identified to be permissive in

both active tuberculosis patients and latent tuberculosis infected subjects. The frequency of lymphoproliferative and IFN- γ responses to ESAT-6 peptide mixtures were comparable to the ESAT-6 recombinant protein but higher than individual peptides. The application of the mixture of individual permissive peptides in combination with easily read-out systems like skin tests and IFN- γ ELISA assays could benefit the epidemiological estimation of the numbers of humans exposed to the tubercle bacilli. However, the differentiation between active and latent tuberculosis and confirmation of species-specificity of the identified permissive peptides require further evaluation.

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การวินิจฉัยวัณโรคให้ได้รวดเร็วและแม่นยำ เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมวัณโรค เครื่องมือที่ช่วยการวินิจฉัยวัณโรคในปัจจุบัน เช่นน้ำยาทดสอบทูเบอร์คิวลิน (tuberculin) มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคต่ำ ทั้งการฉีดวัคซีนบีซีจี (BCG) และการสัมผัสเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อวัณโรค (non-tuberculous mycobacteria) ก็สามารถก่อให้เกิดการตอบสนองที่ใกล้เคียงกับการติดเชื้อจากวัณโรคได้ ดังนั้นจึงมีความต้องการน้ำยาทดสอบชนิดใหม่ที่มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อวัณโรคสูงมาใช้ทดแทนน้ำยาทดสอบทูเบอร์คิวลิน สำหรับโปรตีนที่จะนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบนอกจากจะใช้แยกการติดเชื้อวัณโรคจากการฉีดวัคซีนบีซีจีแล้ว ยังจะต้องแยกการติดเชื้อวัณโรคจากการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ด้วย อย่างไรก็ตามการใช้โปรตีนทั้งโมเลกุลก็ยังมีโอกาสก่อให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ร่วมกับการติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่ใกล้เคียงอื่น ๆ ได้ และยังมีความยุ่งยากในการผลิตไม่ว่าจะเป็นโปรตีนที่แยกมาจากตัวเชื้อหรือเป็นโปรตีนสังเคราะห์ โปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีวิศวกรรมก็อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการผลิตด้วย โครงการวิจัยนี้จึงเลือกโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค และไม่พบในบีซีจี และในมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ส่วนใหญ่ มาเพื่อค้นหาตำแหน่งที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ติดบนโปรตีนนั้น โดยการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีนทั้งสอง เพื่อประโยชน์ในการใช้เปปไทด์สังเคราะห์ซึ่งผลิตได้ง่ายกว่ามาเป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนัง และน้ำยาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ (Skin test และ In vitro test) แทนโปรตีนทั้งโมเลกุลซึ่งสามารถเพิ่มความไวของน้ำยาทดสอบ โดยใช้ส่วนผสมของเปปไทด์ (peptide mixtures) ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีแต่ละตัวมารวมกัน

ในผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 30-60% มีรอยแผลวัณโรคในปอด แต่เสมอตรวจไม่พบเชื้ออาการทางคลินิกใช้วินิจฉัยแยกผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ (active disease) จากผู้ป่วยระยะสงบ (inactive disease) ไม่ได้ ส่วนการทดสอบเพื่อช่วยวินิจฉัย เช่นการทดสอบทูเบอร์คิวลิน และการทดสอบทางน้ำเหลือง (serological tests) ที่มีใช้ในปัจจุบัน ไม่สามารถช่วยแยกผู้ป่วยสองกลุ่มดังกล่าวได้ ดังนั้นการวินิจฉัยแยกผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ (active disease) จากผู้ป่วยระยะสงบ (inactive disease) มีความจำเป็นต่อการตัดสินใจในการให้การรักษา และหลีกเลี่ยงการให้การรักษาที่ไม่จำเป็น แต่ปัจจุบันยังมีปัญหาในการวินิจฉัยแยกผู้ป่วยสองกลุ่มดังกล่าวอยู่ โครงการวิจัยนี้จึงเลือกโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อวัณโรค และถูกพบว่าเป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเชื้อขณะที่มีชีวิต และกำลังเติบโต (secreted proteins) เพื่อศึกษาหาความแตกต่างของรูปแบบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์ของโปรตีนเหล่านี้

ระหว่างผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบกับผู้ป่วยระยะสงบ เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยแยกโรคต่อไป

นอกจากนี้ การค้นหาผู้สัมผัสโรคที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นวัณโรคมีความสำคัญเนื่องจากสามารถให้การป้องกันหรือวินิจฉัยได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไปยังผู้อื่น

บททวนวรรณกรรม

เมื่อไม่นานมานี้ สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (low molecular mass antigen) ที่มีชื่อว่า ESAT-6 ได้ถูกพบในน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อ และพบว่าสามารถกระตุ้นการตอบสนองที่ดีในสัตว์ที่ติดเชื้อวัณโรค⁽¹⁾ ยีนของโปรตีนนี้พบว่ามียูนิคเฉพาะใน *M. tuberculosis complex* แต่ไม่พบในเชื้อบีซีจี (BCG) ทุกสายพันธุ์ และในเชื้อในสิ่งแวดล้อมยกเว้น *M. kansasii*, *M. marinum* และ *M. szulgai*⁽²⁻⁴⁾ อย่างไรก็ตามมีเพียง *M. szulgai* และ *M. kansasii* ที่สามารถทำให้เกิดโรคใกล้เคียงกับวัณโรคแต่เกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำมาก (0.5% ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ non-tuberculous mycobacteria)⁽⁵⁾ ต่อมาโปรตีนอีกชนิดหนึ่งมีชื่อว่า CFP-10 ซึ่งมีการกระจายในเชื้อชนิดต่างๆ เหมือนกับ ESAT-6 ได้ถูกค้นพบ⁽⁶⁾ ยีนของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 อยู่ในตำแหน่งที่เรียกว่า RD-1 และ RD-2, ตามลำดับ ซึ่งเป็นตำแหน่งในจีโนมของ *M. bovis* ที่หายไประหว่างการทำให้กลายพันธุ์เป็นเชื้อ บีซีจี⁽⁷⁾

โปรตีน ESAT-6 สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IFN- γ จากลิมโฟไซต์ของผู้ป่วยวัณโรค โปรตีน ESAT-6 ก่อให้เกิดการตอบสนองของทีลิมโฟไซต์ในการติดเชื้อวัณโรคระยะเริ่มแรกในหนู⁽¹⁾ และก่อให้เกิดการตอบสนองในผู้ป่วยวัณโรคได้ดีกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่เคยทดสอบ^(8,9) ในการศึกษาในประเทศที่มีความชุกของวัณโรคต่ำได้แก่ เดนมาร์ก, สหรัฐอเมริกา, เยอรมัน, และ Kuwait พบว่า 60-80% ของผู้ป่วยวัณโรคตอบสนองต่อ โปรตีน ESAT-6 ในขณะที่ไม่มีการตอบสนองในคนปกติที่ไม่สัมผัสโรค^(8,9,10,11) นอกจากนี้ไม่พบการตอบสนองต่อโปรตีน ESAT-6 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *M. avium*⁽¹⁰⁾ Lalvani และคณะ ได้ศึกษาการหลั่ง IFN- γ จากลิมโฟไซต์ที่จำเพาะต่อโปรตีน ESAT-6 โดยวิธี ELISPOT พบว่าเครื่องมือทดสอบนี้มีความไว (sensitivity) 90%⁽¹²⁾ โปรตีน ESAT-6 มี T-cell epitope หลายตำแหน่งที่กระตุ้นการตอบสนองในคนหลายคนที่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่ามีศักยภาพที่จะกระตุ้นการตอบสนองในประชากรที่มีพันธุกรรมหลากหลายในวงกว้าง

โปรตีน CFP-10 กระตุ้นการตอบสนองในผู้ป่วยวัณโรคในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับโปรตีน ESAT-6 และไม่พบการตอบสนองในผู้ที่ติดเชื้อบีซีจี^(13,14)

โปรตีนทั้งสองพบวก่อให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองทางผิวหนังชนิด delayed-type hypersensitivity ในหนูตะเภา (guinea pig) หลายตระกูล ที่ติดเชื้อด้วย *M. tuberculosis* แต่ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาในหนูตะเภาที่ติดเชื้อ *M. bovis* หรือ *M. avium*^(13,15-18)

ถึงแม้ว่ายีนของโปรตีนเหล่านี้จะไม่พบในมัคโคแบคทีเรียชนิดอื่นส่วนใหญ่ แต่เมื่อไม่นานมานี้ ได้มีการค้นพบ homologues ของโปรตีนทั้งสองในเชื้อโรคเรื้อน (*M. leprae*)^(19,20) ดังนั้นการใช้ส่วนผสมของเปปไทด์ (peptide mixtures) อาจมีความจำเป็นในการผลิตน้ำยาสำหรับการวินิจฉัย (diagnostic reagents) การติดเชื้อวัณโรค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี เพื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนังและน้ำยาทดสอบทางห้องปฏิบัติการการารเพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (การผลิต interferon-gamma และ การผลิต antibody) ต่อโปรตีน และเปปไทด์ของ โปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 กับระยะของโรค (activity of disease) ในผู้ป่วยวัณโรค
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (การผลิต interferon-gamma และ การผลิต antibody) ต่อโปรตีนและเปปไทด์ของ โปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 กับการติดเชื้อวัณโรคและการติดเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่นเพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยแยกโรค
4. เพื่อประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดเพื่อช่วยการวินิจฉัยวัณโรค
5. เพื่อค้นหาผู้สัมผัสโรคที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดเป็นวัณโรคในภายหลัง เพื่อผู้สัมผัสโรคกลุ่มนี้จะได้รับการเฝ้าระวังอย่างใกล้ชิด หรือได้รับยาป้องกันการเกิดโรค

ระเบียบวิธีวิจัย

1. คัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการที่มีคุณสมบัติ (Inclusion Criteria) ดังนี้
 1. ผู้ป่วยวัณโรคปอดใหม่ที่มีผลการตรวจเสมหะพบเชื้อโดยการย้อมสี
 2. ผู้ป่วยวัณโรคปอดใหม่ที่มีผลการตรวจเสมหะไม่พบเชื้อโดยการย้อมสีและแพทย์วินิจฉัยว่าเป็นวัณโรคระยะกำเริบ และให้การรักษา ซึ่งภายหลังจะพบว่ามีการตอบสนองต่อการรักษา
 3. ผู้ป่วยวัณโรคปอดที่มีผลการตรวจเสมหะไม่พบเชื้อโดยการย้อมสีซึ่งแพทย์พิจารณาว่าเป็นวัณโรคระยะสงบไม่จำเป็นต้องรับการรักษาและได้ติดตามผู้ป่วยไม่พบการกำเริบของโรค
 4. ผู้ป่วยวัณโรคนอกปอดใหม่
 5. ผู้ป่วยวัณโรคปอดและนอกปอดที่รักษาหายแล้ว
 6. ผู้ป่วยติดเชื้อมัคโคแบคทีเรียอื่นๆ (non tuberculous mycobacteria) เช่น มัยโคแบคทีเรียเอเวียม (M. avium) และ โรคเรื้อน ก่อนการรักษา
 7. ผู้สัมผัสโรค ซึ่งอาสาสมัครกลุ่มนี้จะเป็นบุคลากรในโรงพยาบาล หรือผู้อาศัยร่วมบ้านกับผู้ป่วย

หมายเหตุ อาสาสมัครในกลุ่ม 1, 2, 3, 5 และ 6 มีทั้งที่มี anti HIV antibody เป็นบวกและลบ

 อาสาสมัครในกลุ่ม 4 มี anti HIV antibody เป็นบวก

 อาสาสมัครในกลุ่ม 7 มี anti HIV antibody เป็นลบ

การวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคปอดอาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิก (symptoms and signs) ผลตรวจเชื้อในเสมหะโดยการย้อมสี (sputum smear) ลักษณะของรอยโรคในปอดจากภาพรังสี (chest x-ray) การเพาะเชื้อ (sputum culture) และการตอบสนองต่อยารักษาวัณโรค (therapeutic diagnosis)

นิยามศัพท์

ผู้ป่วยวัณโรคปอดระยะกำเริบ (Active pulmonary tuberculosis cases)

มีลักษณะดังนี้

1. มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไข้ ไอ มีเสมหะ
2. ภาพรังสีทรวงอกอ่านโดยรังสีแพทย์ว่าพบรอยโรคเข้าได้กับวัณโรค
3. เสมหะย้อมพบเชื้อวัณโรคอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง
4. เพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะพบเชื้อวัณโรคอย่างน้อย 1 ตัวอย่าง

ผู้ป่วยวัณโรคระยะสงบ (Inactive pulmonary tuberculosis cases)

มีลักษณะดังนี้

1. มีหรือไม่มีอาการทางระบบทางเดินหายใจ เช่น ไข้ ไอ มีเสมหะ
2. ภาพรังสีทรวงอกอ่านโดยรังสีแพทย์ว่าพบรอยโรคเข้าได้กับวัณโรค
3. เสมหะย้อมไม่พบเชื้อวัณโรค 3 ตัวอย่าง
4. เพาะเชื้อวัณโรคจากเสมหะไม่พบเชื้อวัณโรค
5. ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาวัณโรค

การวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคนอกปอดอาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิก (symptoms and signs) การเพาะเชื้อจากตัวอย่าง (specimen culture) หรือ การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Histopathology) และการตอบสนองต่อยารักษาวัณโรค (therapeutic diagnosis)

การติดตามผู้ป่วยว่าตอบสนองต่อการรักษา หรือไม่ตอบสนองต่อการรักษา ใช้เวลา 6 เดือน หลังจากเริ่มให้การรักษา

ผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา คือ ผู้ป่วยที่ Chest x-ray ไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือนแล้ว

การวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อน อาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิก (symptoms and signs) ผลตรวจเชื้อในรอยโรคผิวหนัง (slit skin smear) และการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Histopathology)

การวินิจฉัยผู้ติดเชื้อ non tuberculous mycobacteria (NTM) เช่น มัยโคแบคทีเรียมเอเวียม อาศัยอาการและอาการแสดงทางคลินิก (symptoms and signs) ผลการเพาะเชื้อในเสมหะ และในเลือด (sputum and hemoculture)

ผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ หรือ ผู้สัมผัสโรค ได้แก่ ผู้ติดเชื้อวัณโรคแต่ไม่มีอาการของวัณโรค ผลตรวจเสมหะเป็นลบ ผลตรวจภาพรังสีทรวงอกปกติ ได้แก่ ผู้สัมผัสโรคในบ้าน และผู้สัมผัสโรคที่เป็นบุคลากรทางการแพทย์

ผู้สัมผัสโรคในบ้าน คือผู้อาศัยอยู่ชายคาเดียวกันกับผู้ป่วยก่อนการรักษาเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 เดือน

ผู้สัมผัสโรคที่เป็นบุคลากรทางการแพทย์ เป็นผู้ที่ทำงานสัมผัสกับผู้ป่วยวัณโรคอย่างน้อย 6 เดือน

เกณฑ์การแยกอาสาสมัครออกจากโครงการ (Exclusion Criteria)

1. เด็กอายุน้อยกว่า 15 ปี 2. หญิงตั้งครรภ์ 3. ผู้ไม่สมัครใจเข้าร่วมโครงการ
2. เจาะเลือดเข้าร่วมโครงการแต่ละคนในวันที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีคุณสมบัติตามที่กำหนดเป็นปริมาณ 15 มิลลิลิตร ใส่หลอดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง 10 มิลลิลิตร (defibrinated blood) และใส่หลอดที่ไม่ผสมสารกันเลือดแข็ง (clot blood) 5 มิลลิลิตร

ในผู้ป่วยที่มีน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด แบ่งเก็บน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ไม่ผสมสารกันเลือดแข็ง (หมายเหตุ: น้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอดแบ่งเก็บจากตัวอย่างที่เก็บเพื่อการวินิจฉัยโดยวิธีมาตรฐาน)

3. นำเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง แยกเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ออกมา แล้วนำมาเพาะเลี้ยงกับเปปไทด์ 11 สายของ โปรตีน ESAT-6 และ 5 สายของโปรตีน CFP-10, ส่วนผสมของเปปไทด์ (peptide mixture) เหล่านี้, โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 สังเคราะห์, PPD (purified protien derivative), และ Conavalin-A เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มีก๊าซ 5% CO₂ และความชื้น เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ใน culture (supernatant) เพื่อตรวจวัดปริมาณสารหลั่ง cytokines ชนิด Interferon-gamma (IFN- γ) โดยเทคนิค ELISA
4. นำเลือดที่ไม่ได้ผสมสารกันเลือดแข็ง (clot blood) มาแยกเก็บซีรัม (serum) และนำซีรัมมาทดสอบหาระดับแอนติบอดี (antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 โดยเทคนิค ELISA
5. นำน้ำจากช่องเยื่อหุ้มปอด มาทดสอบหาระดับแอนติบอดี (antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 โดยเทคนิค ELISA
6. วิเคราะห์การตอบสนองโดยการผลิต IFN- γ ต่อเปปไทด์ (แต่ละสาย และส่วนผสมของเปปไทด์เหล่านี้) ของ โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 และโปรตีนทั้งสอง ในผู้ป่วยวัณโรคปอดระยะกำเริบ (active disease) และผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ เพื่อค้นหาเปปไทด์ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี (antigenic)
7. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตอบสนองโดยการผลิต IFN- γ ต่อ โปรตีน ESAT-6 โปรตีน CFP-10 กับระยะของโรค (activity of disease) ในผู้ป่วยวัณโรค
8. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการตอบสนองโดยการผลิต IFN- γ และ การผลิตแอนติบอดี (ในน้ำเหลืองและน้ำในช่องเยื่อหุ้มปอด) ต่อ โปรตีน ESAT-6 โปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรค และไม่ใช้วัณโรค
หาค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบ
9. วิเคราะห์รูปแบบการตอบสนองโดยการผลิต IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้สัมผัสโรค เพื่อค้นหาผู้สัมผัสโรคที่เป็นกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดเป็นวัณโรคในภายหลัง

วัตถุประสงค์ที่ 1

1. เพื่อค้นหาเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ดี เพื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนังและน้ำยาทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรค

วิธีการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ ได้แก่ผู้ป่วยวัณโรคปอดใหม่จำนวน 50 รายและผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ ได้แก่ ผู้สัมผัสโรคที่มีผลทิวเบอร์คูลินเป็นบวกจำนวน 50 ราย
2. นำเลือดที่ผสมสารกันเลือดแข็ง แยกเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (lymphocyte proliferation assay) ออกมา แล้วนำมาเพาะเลี้ยงกับเปปไทด์ 11 สายของโปรตีน ESAT-6 และ 5 สายของโปรตีน CFP-10, ส่วนผสมของเปปไทด์ (peptide mixture) เหล่านี้, โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 สังเคราะห์, PPD (purified protein derivative), และ สาร Mitogen Concanavalin-A เป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มีก๊าซ 5% CO₂ และความชื้น เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ใน culture (supernatant) ที่ 6 วัน เพื่อตรวจวัดปริมาณสารหลัง cytokines ชนิด Interferon-gamma (IFN- γ) โดยเทคนิค ELISA

ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ จากโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10

ESAT-6	P1-16	MTEQQWNFAGIEAAAS
	P9-24	AGIEAAASAIQGNVTS
	P17-32	AIQGNVTSIHSLLEDEG
	P25-40	IHSLLEDEGKQSLTKLA
	P33-48	KQSLTKLAAAWGGSGS
	P41-56	AAWGGSGSEAYQGVQQ
	P49-64	EAYQGVQQKWDATATE

	P57-72	KWDATATELNNALQNL
	P65-80	LNNALQNLARTISEAG
	P73-88	ARTISEAGQAMASTEG
	P80-95	GQAMASTEIGNVTGMFA
CFP-10	P1-18	MAEMKTDAAATLAQEAGNF
	P13-28	QEAGNFERISGDLKTQ
	P55-72	VRFQEAANKQKQELDEI
	P75-92	NIRQAGVQYSRADEEQQQ
	P85-100	RADEEQQQALSSQMGF

เทคนิค lymphocyte proliferation assay และตรวจวัดสาร Interferon-gamma

มีหลักการโดยสังเขปดังนี้

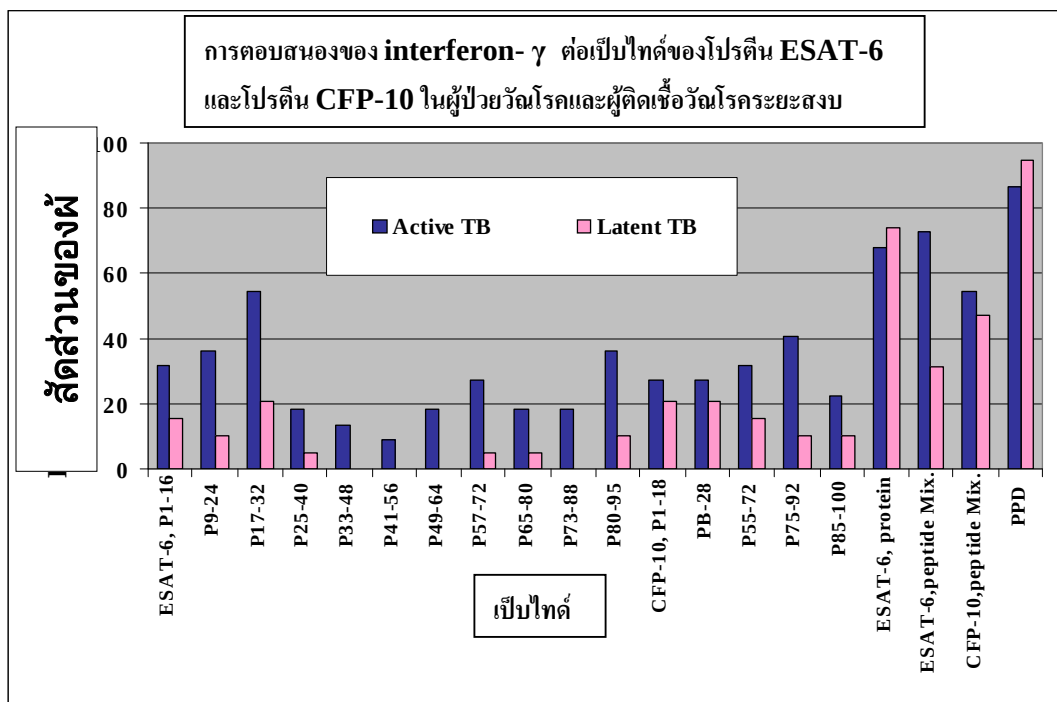
1. แยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) จากเลือดของผู้ที่ต้องการทดสอบ
2. นำ PBMCs ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ใน microwell plate ที่มี Ag ที่เรารู้จักทำการศึกษารวมหรือมีสารไมโตเจน (Mitogen) ซึ่งได้แก่ Canavalin-A อยู่ด้วย แล้วบ่มเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 5% ของ CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 6 วัน
3. เก็บ supernatant (น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์) ที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน
4. นำ supernatant (น้ำเพาะเลี้ยงเซลล์) มาตรวจวัดสาร interferon gamma ที่เซลล์ผลิตออกมาโดยวิธี ELISA

การตรวจวัดสาร Interferon-gamma โดยใช้วิธี ELISA

วิเคราะห์โดยเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ที่ 24 ชั่วโมงและ 6 วัน เก็บแช่แข็งที่ -20°C เมื่อต้องการทดสอบ นำน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ (supernatant) มาละลายและเติม anti-interferon immunoglobulin conjugate โดยใส่ในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่เคลือบด้วย anti-interferon gamma antibodies ใช้น้ำยา standard ในชุดทดสอบเป็นตัวควบคุมและเปรียบเทียบ จะเกิดการจับกันของแอนติบอดีต่อสาร interferon gamma (IFN - γ) และสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมาซึ่งเป็นแอนติเจน ภายหลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงหลีกเลี่ยงการถูกแสงควรบ่มไว้ในที่มืด ล้าง plate ด้วยน้ำยาล้าง (wash solution) เพื่อล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่

ไม่ได้จับกับแอนติเจนออก จากนั้นเติม substrate tetramethylbenzidine (TMB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังเสร็จการถูกแสงควรบ่มไว้ในที่มืด ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสีน้ำเงิน เติม stop solution ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาหยุดและจะเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง สามารถวัดปริมาณของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสาร interferon- γ จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ปริมาณของ interferon- γ ที่วัดได้ โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา(IU/ml) และค่า การดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

ผลวิจัย



ห้เปปไทด์ (p1-16, p9-24, p17-32, p57-72 และ p80-95) จาก ESAT-6 และ 3 peptides จาก CFP-10 (p13-28, p55-72 และ p75-92) กระตุ้นการตอบสนองที่ดีทั้งในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ (active tuberculosis patients) และผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ (latent tuberculosis infected subjects) อย่างไรก็ตาม ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบพบการตอบสนองที่ดีกว่าผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ (Fig.1). จำนวนผู้ที่มี IFN- γ responses ต่อส่วนผสมเปปไทด์ (peptide mixtures) ของ ESAT-6 และ CFP-10 มีค่าใกล้เคียงกับจำนวนผู้ตอบสนองต่อ ESAT-6 recombinant protein แต่ มากกว่าผู้ตอบสนองต่อ individual peptides ค่าเฉลี่ยของ IFN-g responses ต่อ p1-16, p9-24, p17-32, p57-72 และ p80-95 ของ ESAT-6 ใน ผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ คือ 285.9, 39.8,

758.7, 115.5 และ 142.2 pg/ml ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของ IFN- γ responses ต่อ p13-28, p55-72 และ p75-92 ของ CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ คือ 141.8, 154.1 และ 596.5 pg/ml ตามลำดับ

วิเคราะห์ผลวิจัย

เปปไทด์จากโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ที่กระตุ้นการตอบสนองที่ถี่ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสอง สามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำยาทดสอบผิวหนัง หรือน้ำยาทดสอบของห้องปฏิบัติการสำหรับการติดเชื้อวัณโรคได้ โดยใช้เป็นส่วนผสมของเปปไทด์ ซึ่งสามารถกระตุ้นการตอบสนองได้มากถึง 75% ของผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ ในขณะที่เปปไทด์แต่ละตัวจะครอบคลุมได้เพียง 30 – 55 % และถ้าสามารถนำไปรวมกับเปปไทด์ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีจากโปรตีน**วัณโรคของ** เป็นน้ำยาทดสอบที่มีความไวสูง

วัตถุประสงค์ที่ 2.

การทดสอบการตอบสนอง Interferon-gamma ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 เพื่อแยกผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบจากผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ
วิธีวิจัย

1. จัดเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบทั้งที่ติดเชื้อ HIV และไม่ติดเชื้อ HIV และผู้สัมผัสโรคที่มีผลทิวเบอร์คูลินเป็นบวก รวมเป็นจำนวน ? ราย โดยแบ่งเป็น

ผู้ป่วยวัณโรคปอดใหม่ที่มีผลการตรวจเสมหะพบเชื้อโดยการย้อมสี จำนวน ? ราย เป็น

ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ? ราย เป็นผู้ป่วยไม่ติดเชื้อ HIV ? ราย

ผู้ป่วยวัณโรคปอดใหม่ที่มีผลการตรวจเสมหะไม่พบเชื้อโดยการย้อมสี จำนวน ? ราย

เป็นผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ? ราย เป็นผู้ป่วยไม่ติดเชื้อ HIV ? ราย

ผู้ป่วยวัณโรคปอดนอกปอดใหม่ จำนวน ? ราย

ผู้ป่วยวัณโรคปอดเก่า จำนวน ? ราย

ผู้ป่วยโรคเรื้อน ก่อนการรักษา รวม จำนวน ? ราย

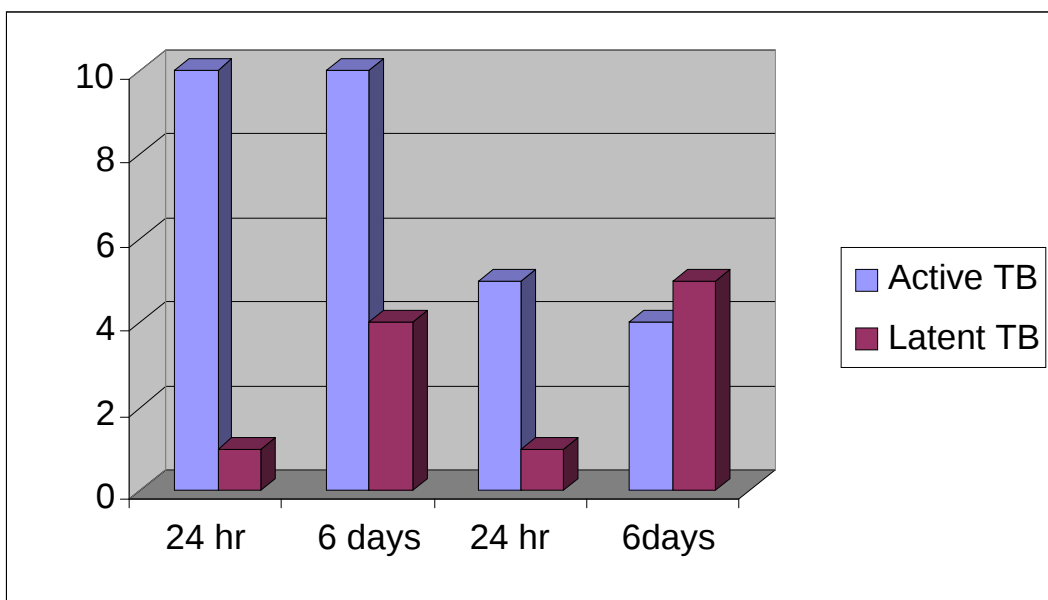
2. นำตัวอย่างเลือดมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) และเพาะเลี้ยงกับ Purified Protein Derivative (PPD) โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ที่นำมาทดสอบ โดยเทคนิค Proliferation assays เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 6 วัน และวัดระดับสาร IFN- γ ที่เม็ดเลือดขาวหลั่งออกมาในระยะเวลาต่างๆ โดยเทคนิค ELISA

3. เก็บ Supernatant (นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์) ที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน มาตรวจวัดสาร interferon gamma ที่เซลล์เม็ดเลือดขาวหลั่งออกมาในระยะต่างๆ โดยเทคนิค ELISA

เลือดของผู้ป่วยวัณโรคระยะ++และผู้สัมผัสโรคที่มีผล++เบอร์คูลินเป็นบวก

ผลวิจัย

การตอบสนองของ Interferon- γ ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ 24 ชั่วโมงและ 6 วัน
ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบและผู้ติดเชื้อวัณโรคระยะสงบ



วิเคราะห์ผลวิจัย

1. พบมีการตอบสนองของ IFN- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบ ในระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน แต่ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง ในผู้สัมผัสโรคที่มีผลทึบเบอร์คูลิน++ แต่ยังพบการตอบสนองที่ 6 วัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยวัณโรคระยะกำเริบจากระยะการติดเชื้อวัณโรค อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้ต้องยืนยันในการทดสอบในตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น

3. ทำการทดสอบการตอบสนอง antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 โดยเทคนิค ELISA

วิธีวิจัย

1. จัดเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคแพร่กระจายก่อนรักษาที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย จำนวน 25 ราย
ผู้ป่วยโรคปอดก่อนรักษาที่มีผลการตรวจเสมหะพบเชื้อและไม่พบเชื้อโดยการย้อมสีที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย จำนวน 38 ราย
ผู้ป่วยโรคปอดนอกปอดก่อนรักษา จำนวน 25 ราย
ผู้ป่วยติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นๆ (non tuberculous mycobacteria) เช่น มัยโคแบคทีเรียมเอเวียม (M. avium) ก่อนรักษาที่ติดเชื้อ HIV ร่วมด้วย จำนวน 9 ราย
ผู้ป่วยโรคที่มีผลการตรวจเสมหะพบเชื้อโดยการย้อมสีก่อนรักษาที่ไม่ติดเชื้อ HIV จำนวน 23 ราย
ผู้ป่วยโรคที่มีผลการตรวจเสมหะไม่พบเชื้อโดยการย้อมสีก่อนรักษาที่ไม่ติดเชื้อ HIV จำนวน 15 ราย
ผู้ป่วยโรคปอดนอกปอดที่รักษาครบ จำนวน 12 ราย
ผู้สัมผัสโรคที่ผลทิวเบอร์คูลินเป็นบวกที่ไม่ติดเชื้อ HIV จำนวน 22 ราย
ผู้ป่วยโรคเรื้อรังก่อนรักษาที่ไม่ติดเชื้อ HIV จำนวน 23 ราย
2. บั่นแยกซีรัม เก็บที่ -20°C
3. นำซีรัมที่เก็บไว้มาวัดระดับ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ด้วยวิธี ELISA

วิธีการทำ ELISA

มีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้

1. นำ แอนติเจนที่เจือจางใน coating buffer เข้มข้น $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ มาเคลือบบน 96 well micro titer plate หลุมละ 50 ul นำ plate ใส่ในกล่องที่มีความชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง
2. เติม Blocking buffer (5% skim milk in PBS-T) หลุมละ 50 ul นำ plate ใส่ในกล่องที่มีความชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 50 นาที แล้วนำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง
3. เติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจาง 1:2,000 ใน sample diluents (5% BSA, 0.2% Triron x 100 in PBS-T) หลุมละ 50 ul นำ plate ใส่ในกล่องที่มีความชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง
4. เติม conjugate (Protein A peroxidase เจือจางใน 1% BSA in PBS-T) ที่เจือจาง 1:

10,000 หลุมละ 50 ul นำ plate ใส่ในกล่องที่มีความชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วย PBS-T 5 ครั้ง

5. เติมซับสเตรท (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)) หลุมละ 50 ul แล้วนำ plate ไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

6. หยุดปฏิกิริยาการเกิดสี โดยเติม 1% HCl หลุมละ 50 ul แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 450 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สารเคมี

1. Coating buffer pH 9.6

Na₂CO₃ 15.94 mM

NaHCO₃ 34.87 mM

2. PBS (1x)

KH₂PO₄ 1.46 mM

Na₂HPO₄·12H₂O 20.42 mM

KCl 2.68 mM

NaCl 136.89 mM

3. PBS-T 1 L

PBS 999 ml

Tween 20 1 ml

4. Blocking Buffer

PBS-T + 5% Skim milk

5. Sample Diluent

PBS-T + 5% BSA + 0.2% Triton x 100

6. Conjugate

Protein A peroxidase + 1% BSA in PBS-T

7. Stop Solution

1% HCl

ผลการตอบสนองเป็นบวก หมายถึง ค่าผลต่างของ OD ในหลุมที่มีซีรัมและไม่มีซีรัมมากกว่า 2 standard deviation (2 SD)

ผลวิจัย

การตอบสนองของ Antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในซีรัมของ

ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็นโรคประเภทย่อยต่างๆ

จำนวน (เปอร์เซ็นต์)

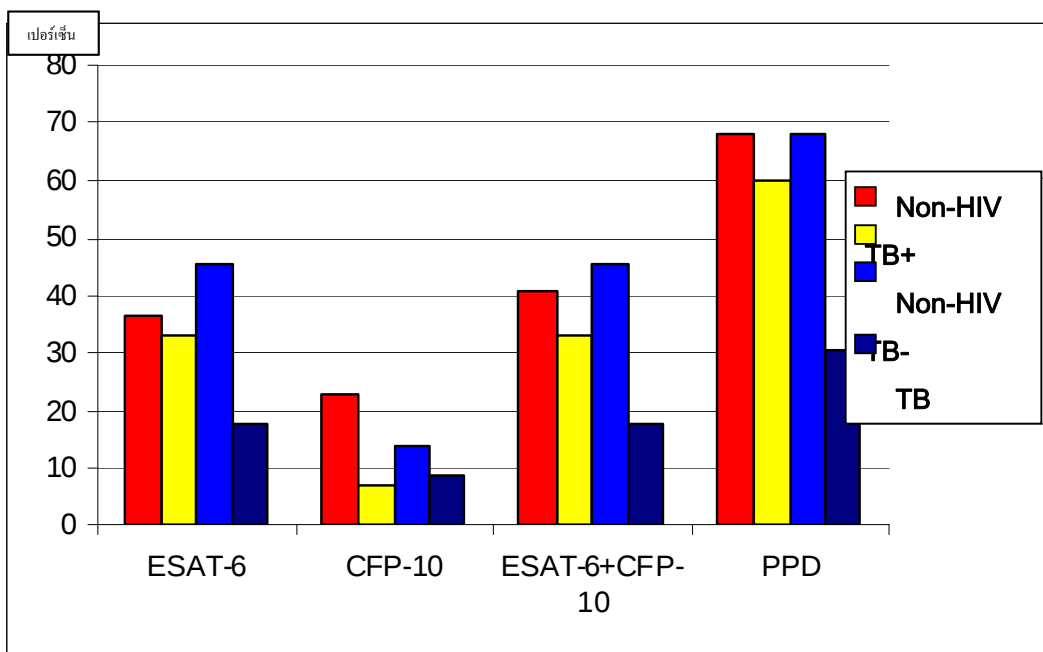
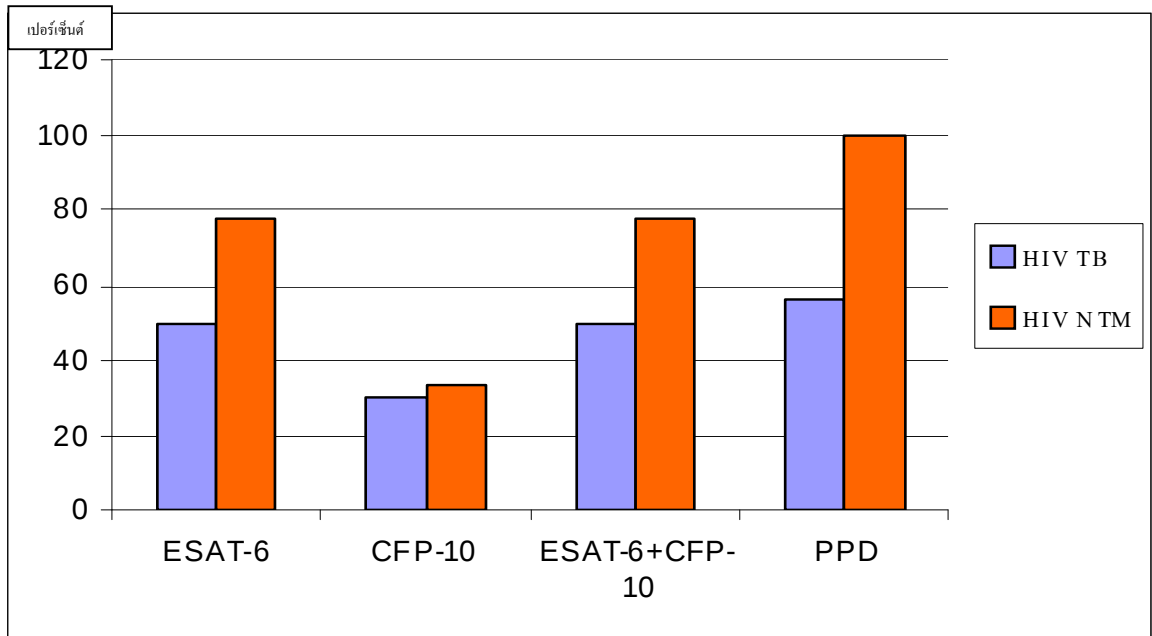
ประเภทผู้ป่วย (จำนวน)	IFN- γ response	
	ESAT-6	CFP-10
Pulm. TB (38)	32 (84.2)	32 (89.5)
Extrapulm. TB (44)	46 (100)	36 (81.8)
Dis. TB (25)	25 (100)	25 (100)

การตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในซีรัม

จ ำ น ว น

(เปอร์เซ็นต์)

ชนิดของโปรตีน	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6+CFP-10	PPD
HIV / TB (107)	73 (68.2)	68 (63.5)	73 (68.2)	60 (56)
HIV / NTM (9)	7 (77.8)	3 (33.3)	7 (77.8)	9 (100)
Non-HIV / TB +ve (22)	8 (36.4)	5 (22.7)	9 (40.9)	15 (68.2)
Non HIV / TB -ve (15)	5 (33.3)	1 (6.8)	5 (33.3)	9 (60)
Non HIV/ TB contacts (22)	10 (45.5)	3 (13.6)	10 (45.5)	15 (68.2)
Non HIV / Leprosy (23)	4 (17.4)	2 (8.7)	4 (17.4)	7 (30.4)



วิเคราะห์ผลวิจัย

1. พบมีการตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคประเภทต่างๆ (Disseminated TB, Pulmonary TB และ Extrapulmonary TB) ในสัดส่วนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างประเภทต่างๆของวัณโรค (uni-agar tant,PSP,05) พบการตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็นวัณโรคประเภท

2. ชุดทดสอบที่ตรวจวัด antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6, โปรตีน CFP-10 และส่วนผลสมของโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 รวมกัน มีค่า sensitivity (ความไว) และค่า specificity (ความจำเพาะ)ที่ต่ำ จึงไม่เหมาะต่อการนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการช่วยวินิจฉัยแยกโรค สาเหตุที่ค่าความจำเพาะต่ำเพราะเป็นการตรวจวัด IgG antibody ซึ่งระดับของ antibody ยังคงอยู่ถึงแม้จะไม่ใช่วัณโรคระยะกำเริบ (active infection) ดังนั้นการพบการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในกลุ่ม non-tuberculous mycobacterial infection อาจไม่ได้เกิดจาก cross reaction ระหว่าง species แต่อาจเป็นจาก ผู้ป่วย non-tuberculous mycobacterial infection เหล่านี้ เคยมี previous TB infection มาก่อน

3.การพบความถี่ของผู้ที่มีการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในผู้สัมผัสโรคที่มีทุบอร์ลินเป็นบวกมีระดับที่ใกล้เคียงกับผู้ป่วยวัณโรคทั้งเสมหะบวกและเสมหะลบ ทำให้ไม่สามารถนำชุดทดสอบนี้มาใช้ในการแยกวัณโรคระยะกำเริบจากวัณโรคระยะสงบได้

วิธีการตรวจวิเคราะห์สาร Interferon gamma โดยวิธี ELISA

วิเคราะห์โดยเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ (supernatant) ที่ 24 ชั่วโมงและ 6 วัน เก็บแช่แข็งที่ -20OC เมื่อต้องการทดสอบ นำน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ (supernatant) มาละลายและเติม anti-interferon immunoglobulin conjugate โดยใส่ในแต่ละหลุมของ microtiter plate ที่เคลือบด้วย anti-interferon gamma antibodies ใช้น้ำยา standard ในชุดทดสอบเป็นตัวควบคุมและเปรียบเทียบ จะเกิดการจับกันของแอนติบอดีต่อสาร interferon gamma (IFN - γ)และสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมาซึ่งเป็นแอนติเจน ภายหลังบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมงหลีกเลี่ยงการถูกแสงควรบ่มไว้ในที่มืด ล้าง plate ด้วยน้ำยาล้าง (wash solution) เพื่อล้างแอนติบอดีส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับแอนติเจน จากนั้นเติม substrate tetramethylbenzidine (TMB) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลีกเลี่ยงการถูกแสงควรบ่มไว้ในที่มืด ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะทำให้เกิดสีน้ำเงิน เติม stop solution ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาหยุดและจะเปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นเหลือง สามารถวัดปริมาณของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ความเข้มข้นของสาร interferon- γ จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ปริมาณของ interferon- γ ที่วัดได้ โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (IU/ml) และค่า การดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

วิธีวิจัย

ผู้สัมผัสโรคที่มีผลทดสอบ tuberculin เปลี่ยนเป็นบวกภายในเวลา 2 ปี (Recent tuberculin converter) จำนวน 33 ราย ได้ถูกเจาะเลือดเพื่อนำมาทดสอบกับโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 โดยเทคนิค proliferation assay และ ตรวจวัด สาร interferon- γ

ผลวิจัย

ผู้สัมผัสโรค 33 ราย มีผล positive 20 ราย negative 13 ราย ในกลุ่ม negative เมื่อทำการตรวจวัดสาร interferon- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 พบว่า 7 ราย ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง แต่ยังพบการตอบสนองที่ 6 วัน ส่วนอีก 6 ราย ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง และ 6 วัน

วิเคราะห์ผลวิจัย

ผู้สัมผัสโรคที่มีผลทดสอบ tuberculin เปลี่ยนเป็นบวกภายในเวลาไม่เกิน 2 ปี (Recent tuberculin converter) เป็นผู้ที่มี tuberculosis infection มาไม่เกิน 2 ปีกว่า ผลการทดสอบ และการตรวจวัดการตอบสนองของสาร interferon- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 มีความจำเพาะ (specificity) ต่อการติดเชื้อวัณโรคมากกว่า ผลทดสอบ tuberculin ผู้ที่ผลการทดสอบตรวจวัดปริมาณสาร interferon- γ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง) เป็นบวก คาดว่าเป็นผู้ที่มี tuberculosis infection และยังคงอยู่ในระยะกำเริบ ยังมีความเสี่ยงที่จะดำเนินเป็นวัณโรคได้ ส่วนผู้ที่ผลการทดสอบ ตรวจวัดปริมาณสาร interferon- γ เป็นลบ อาจเป็นได้ทั้งผู้ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อวัณโรค หรือเคยติดเชื้อวัณโรคแต่อยู่ในระยะสงบ ในรายที่การตรวจวัดสาร interferon- γ ต่อโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ไม่พบการตอบสนองที่ 24 ชั่วโมง แต่ยังพบการตอบสนองที่ 6 วัน คาดว่าเป็นผู้ที่เคยติดเชื้อวัณโรคแต่อยู่ในระยะสงบ ส่วนผู้ที่ไม่พบการตอบสนองทั้ง 24 ชั่วโมง และ 6 วัน น่าจะเป็นผู้ที่ไม่เคยมีการติดเชื้อวัณโรค

4. ทำการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางน้ำเหลือง (การผลิต antibody) ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดเพื่อช่วยการวินิจฉัยวัณโรค

วิธีวิจัย

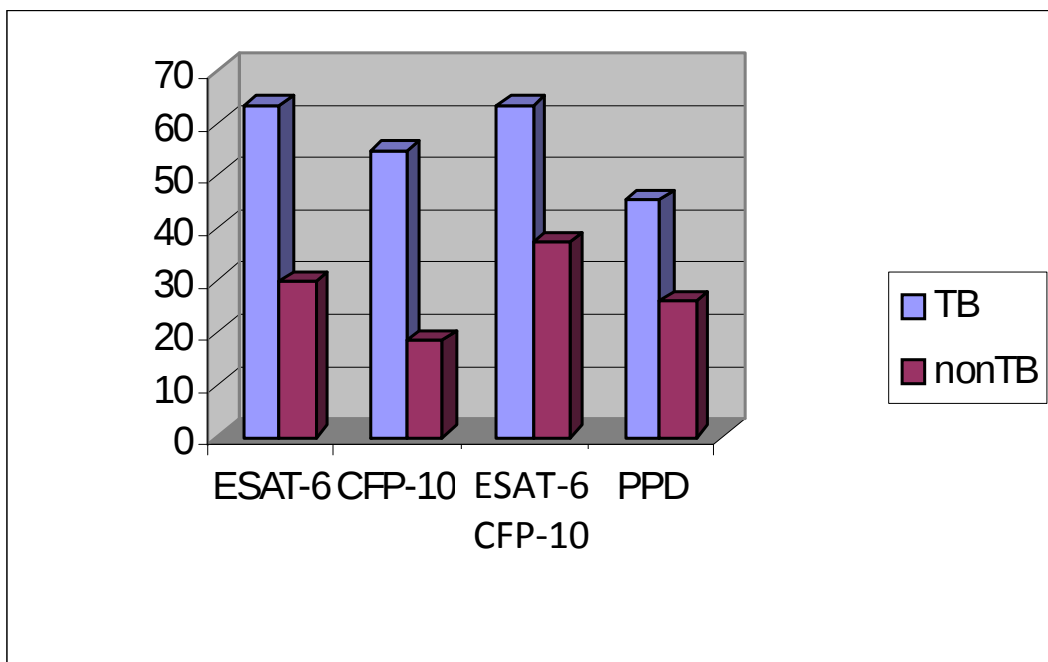
น้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid) จากผู้ป่วยวัณโรค จำนวน 11 ราย และไม่ใช่วัณโรค จำนวน 27 ราย (ยืนยันผลการวินิจฉัยโดยผลเพาะเชื้อวัณโรค) ได้ถูกนำมาทดสอบหา antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และ โปรตีน CFP-10 โดยวิธี ELISA

ผลวิจัย

การตอบสนองของ antibody ต่อโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid) ในผู้ป่วยวัณโรคและผู้ป่วยที่ไม่ใช่วัณโรค

ประเภทของผู้ป่วย	จำนวนผู้ตอบสนอง (เปอร์เซ็นต์)			
	ESAT-6	CFP-10	ESAT-6+CFP-10	PPD
TB(11)	7 (63.6)	6 (54.5)	7 (63.6)	5 (45.4)
Non TB(27)	8 (29.6)	5 (18.5)	10 (37)	7 (25.9)

เปอร์เซ็นต์



วิเคราะห์ผลวิจัย

1.พบว่ามีการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดในผู้ป่วยวัณโรคโดยมีความไวร้อยละ 63.6 และ 54.5 ตามลำดับ และความจำเพาะร้อยละ 70.4 และ 81.5 ตามลำดับ

ส่วนการตอบสนองของ antibody ต่อส่วนผสมของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดในผู้ป่วยวัณโรคมีความไวร้อยละ 63.6 และความจำเพาะร้อยละ 63

2. ชุดทดสอบวัดการตอบสนองของ antibody ต่อ โปรตีน ESAT-6 และโปรตีน ESAT-6 ในน้ำช่องเยื่อหุ้มปอดถึงแม้จะมีความไวไม่สูง แต่เนื่องจากมีความจำเพาะที่สูง ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกสามารถช่วยวินิจฉัยวัณโรคเยื่อหุ้มปอด

งานที่จะทำต่อไปในอนาคต

1. การประเมินชุดทดสอบการตรวจวัดแอนติเจน (antigens) ของเชื้อวัณโรคในปัสสาวะและน้ำในช่องอวัยวะต่างๆ ในการวินิจฉัยวัณโรคประเภทต่างๆและระยะของโรค

เอกสารอ้างอิง

1. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long – lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995 ; **154**:3359-72.
2. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low – molecular – mass T – cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996; **63**: 1710-17.
3. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andresen P. Evidence for occurrence of the ESAT – 6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1996; **64**: 16-22.
4. Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT –6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 1997; **175** : 1251-54.
5. Non-tuberculosis mycobacteria 1995-1996. [Serial online] *EPINEWS* 1997; Week 50. Available from : [http:// www.ssi.dk/dk/epi-nyt/1997/uge50.html](http://www.ssi.dk/dk/epi-nyt/1997/uge50.html)(accessed Sept 1,2000).
6. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT – 6 and a novel low – molecular – mass culture filtrate protein (CFP – 10) . *Microbiol* 1998 ; **144** : 3195-203.
7. Mahairas GG, Sabo PJ , Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic difference between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M bovis*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 1274-82.
8. Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, et al. Comparison of antigen specific T cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 1998; **48**: 535-43.
9. Ulrichs T, Muck ME, Mollenkopf H, et al. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT – 6 in tuberculosis patients and health donors. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3949-58.
10. Lein AD, von – Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR, Alexander LN, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT – 6 discriminate patients with pulmonary disease

due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab* 1999; **6**: 606-09.

11. Ravn P, Demissie A, Equale T, et al. Human T cell responses to the ESAT – 6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999; **179**: 637-45.
12. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, et al. Human cytolytic and interferon gamma – secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 270-75.
13. van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigen ESAT – 6 and CFP 10. *Clin Diag Lab Immunol* 2000; **7**: 155-60.
14. Skjot RLV, Oettinger T, Rosenkrands I, et al. Comparative evaluation of low molecular mass T cell antigens from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT–6 family as immunodominant (in press).
15. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell response to early – secreted antigenic target 6 kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 2000 May; **181**: 1850-54.
16. Haslov K, Andersen A, Nagai S, Gottschau A, Sorensen T, Andersen P. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1995; **63**: 804-10.
17. Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P. Delayed – type hypersensitivity responses to ESAT –6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect Immun* 1998; **66**: 3454-56.
18. Brock I, Weldingh K, Leyten EMS, Arend SM, Ravn P, Andersen P. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Clin. Microbiol* 2004; **42 (6)**: 2379-87.
19. Spensor JS, Marques MA, Lima MC, Junqueira-Kipnis AP, Gregory BC, Truman RW, Brennan PJ. Antigenic specificity of the *Mycobacterium leprae* homologue of ESAT-6. *Infect Immun* 2002; **70 (2)**: 1010-3.
20. Spensor JS, Kim HJ, Marques AM, Gonzalez-Juarerro M, Lima MC, Vissa VD, Truman RW, Gennaro ML, Cho SN, Cole ST, Brennan PJ. Comparative analysis of B-

and T-cell epitopes of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein 10. *Infect Immun* 2004; **72** (6): 3161-70.

Output จากโครงการวิจัยนี้

1. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Boosbun Chua-Intra, Panadda Dhepakson, and Charoen Chuchottaworn, Antibody responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins in pleural fluid, in preparation.

คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสาร Tubercle and Lung Disease ฉบับเดือนธันวาคม 2556

2. Boosbun Chua-Intra, Panadda Dhepakson, Sopa Srisungngam, Samroui Kaewsard, Phatchara Tunteerapat, Varaporn Thientong, Benjawan Petsuksiri and Charoen Chuchottaworn, Interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins in active and latent tuberculosis, in preparation.

คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสาร Tubercle and Lung Disease ฉบับเดือนธันวาคม 2556

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ

1. เป็นวิทยากรบรรยาย เรื่องภูมิคุ้มกันวิทยาของวัณโรค ให้แก่ แพทย์ และเจ้าหน้าที่สาธารณสุข โดยบางส่วนของเนื้อหาการบรรยายมีความเกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้
2. มีการอบรมฝึกปฏิบัติเทคนิคทางห้องปฏิบัติการต่างๆแก่นักวิทยาศาสตร์การแพทย์

เชิงสาธารณะ

1. มีเครือข่ายความร่วมมือทางวิชาการกับแพทย์และนักวิจัยทั้งในและต่างประเทศ

- นายแพทย์เจริญ ชูโชติถาวร อายุรแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคระบบทางเดินหายใจ จากสถาบันโรคทรวงอก กรมการแพทย์ เป็นผู้ให้คำแนะนำถึงปัญหาของการวินิจฉัยวัณโรคที่ต้องการการศึกษาวิจัย และมีความสนใจที่จะนำองค์ความรู้จากการศึกษาวิจัยนี้ไปใช้ในการเรียนการสอนเรื่องวัณโรค และพัฒนาชุดทดสอบช่วยการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบที่มีผลการตรวจเสมหะเป็นลบ และผู้ป่วยวัณโรคนอกปอด

- ดร. ปณิตดา เทพอักษร นักวิทยาศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและวัณโรค จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นผู้บริจาคโปรตีน ESAT-6 และโปรตีนCFP-10 และมีความสนใจที่จะนำองค์ความรู้จากการศึกษาวิจัยนี้ไปใช้พัฒนาชุดทดสอบช่วยการวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบที่มีผลการตรวจเสมหะเป็นลบและผู้ป่วยวัณโรคนอกปอด

-Dr. Martin Vordermeier นักวิทยาศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญด้านชีววิทยาและวัณโรค จาก TB Research Group, Bacteriology Department, Veterinary Laboratories Agency-Weybridge, ประเทศอังกฤษ เป็นผู้ให้คำแนะนำด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ และเป็นผู้บริจาคเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และ CFP-10 เพื่อใช้ในการวิจัยเบื้องต้น

-Dr Robert Wilkinson นายแพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและวัณโรค จาก Faculty of Medicine, Imperial College London, ประเทศอังกฤษ ผู้ให้คำแนะนำด้านเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้

2. นำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยวัณโรคระยะกำเริบที่มีผลการตรวจเสมหะเป็นลบและผู้ป่วยวัณโรคนอกปอดและผู้ป่วยวัณโรคนอกปอดในคลินิกผู้ป่วยนอกอายุรกรรม ที่สถาบันบำราศนราดูร และสถาบันโรคทรวงอก

3.อื่นๆ

เสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการต่างๆ ได้แก่

- **เสนอผลงานวิจัยด้วยวาจา**

1. “การประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเปปไทด์ของโปรตีน ESAT-6 และโปรตีน CFP-10 ของเชื้อวัณโรคในการช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคและระยะของโรค” ในการสัมมนา “รวมพลคนรักงานวิจัย” จัดโดยกรมควบคุมโรค, 24 ธันวาคม 2551, กรุงเทพมหานคร

- **เสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์**

1. “T cell recognition of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins and peptides in active and latent tuberculosis” ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.”, 13-15 ตุลาคม 2548, จังหวัดเพชรบุรี
2. “Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins and peptides in active and latent tuberculosis” ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.”, 12-14 ตุลาคม 2549, จังหวัดเพชรบุรี
3. “Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 and CFP-10 proteins and peptides in active and latent tuberculosis” ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.”, 11-13 ตุลาคม 2550, จังหวัดชลบุรี