

การตรวจหาแบคทีเรียทรงแท่งหรือบาซิลลัสติดสีทึบกรด

(Acid-fast bacillus) ในวัณโรคทางพยาธิวิทยา

Detection of Acid-fast Bacillus in Tuberculosis in Pathology

สัญญา สุพนนิพนธ์^{๑,๒}

^๑ภาควิชาพยาธิวิทยา ศาสนาวิชาวิทยาศาสตร์ปริทัศน์ ประสาทวิทยาแพทยศาสตร์ สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตยสภา

^๒ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, sanya.suk@mahidol.ac.th

บทนำ

เมื่อก้าวถึงแบคทีเรียทรงแท่งหรือบาซิลลัสติดสีทึบกรด (Acid-fast bacillus) ซึ่งต่อไปจากนี้จะขอเรียกว่า เชื้อเอเอพี (AFB) แพทย์จะนึกถึงเชื้อแบคทีเรียสกุลไมโคแบคทีเรีย (Genus *Mycobacterium*) ซึ่งมีเชื้อก่อโรคร้อยละหลายชนิด ที่สำคัญได้แก่เชื้อก่อวัณโรค *ไมโคแบคทีเรีย ทูเบอร์คูโลซิส* (*Mycobacterium tuberculosis*) เชื้อก่อโรคเรื้อน *ไมโคแบคทีเรีย เลพร่า* (*Mycobacterium leprae*) (แต่นิยมออกเสียงว่า “ไม-โค-แบค-ที-เรีย เลพ-แพร”) และเชื้อไมโคแบคทีเรียชนิดที่ไม่ใช่เชื้อก่อวัณโรค (non-tuberculous mycobacterium species) อีกจำนวนหนึ่ง รอยโรคที่เกิดขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียสกุลไมโคแบคทีเรียมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อก่อโรคและระยะของโรคที่ขึ้นอยู่กับระดับภูมิคุ้มกัน (immune response) ของผู้ป่วยที่มีต่อเชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ ทั้งนี้ ในวัณโรคและโรคเรื้อนมักพบรอยโรคที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำเพาะในระดับหนึ่ง ซึ่งพยาธิแพทย์สามารถวินิจฉัยจากการตรวจเนื้อเยื่อที่ได้จากรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าน่าจะเป็นวัณโรคหรือโรคเรื้อน แต่ถ้าจะให้ระบุแน่ชัดว่าเป็นโรคใด ต้องตรวจพบเชื้อเอเอพีในรอยโรค และต้องยืนยันด้วยการตรวจทางจุลชีววิทยาว่าเป็นไมโคแบคทีเรียชนิดใด

การย้อมสีทึบกรด (acid-fast stain)

นับจากวันที่ Robert Koch แพทย์และนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมัน บรรยายเรื่องสมุฏฐานของวัณโรค (the etiology of tuberculosis หรือ Die Aetiologie der Tuberkulose) เมื่อวันที่ ๒๔ มีนาคม พ.ศ. ๒๔๒๕ (ค.ศ. 1882) นั้น เขาได้บรรยายถึงการย้อมสีแสดงเชื้อก่อวัณโรคให้วงการแพทย์ได้ทราบเป็นครั้งแรก จึงมีผู้สนใจพัฒนาเทคนิคการย้อมสีทึบกรด (acid-fast stain) เพื่อแสดงเชื้อก่อวัณโรคจนได้เทคนิคการย้อมสีภายในเวลา ๑๖ เดือน คือ Paul Ehrlich แพทย์และนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันผู้พัฒนาเทคนิคของ Koch, Franz Ziehl นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันผู้พัฒนาเทคนิคของ Ehrlich, Georg Eduard von Rindfleisch พยาธิแพทย์และนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันผู้พัฒนาเทคนิคของ Koch, และ Friedrich Neelsen พยาธิแพทย์ชาวเยอรมันผู้พัฒนาเทคนิคของ Ziehl เทคนิคการย้อมสีพิเศษนี้ใช้กันมาจนถึงปัจจุบันในชื่อ Ziehl-Neelsen (ZN) acid-fast stain เพื่อตรวจหาเชื้อเอเอพี โดยมีผู้พัฒนาเทคนิคให้ดีขึ้นอีก หลักการของ

ZN acid-fast stain คือการใช้สีย้อม carbol fuchsin ซึ่งมีสีแดงเข้มและละลายในลิพิด (lipid) ซึ่งจะจับกับผนังเซลล์ของเชื้อเออเฟปีได้ดีโดยอาศัย Phenol ช่วย จากนั้นก็ใช้กรดล้างสีออก ทำให้แบคทีเรียที่ไม่ใช่เชื้อเออเฟปีย้อมไม่ติดสีแดงของ carbol fuchsin เพราะถูกกรดล้างออกหมด แต่ถ้าเป็นเชื้อเออเฟปีก็จะทนกรดได้ และย้อมติดสีแดงของ carbol fuchsin กรดที่ Neelsen ใช้ นั้นเป็นสารละลายกรดกำมะถันร้อยละ ๒๕ แต่ในปัจจุบัน เราใช้น้ำยาผสมระหว่างกรดเกลือร้อยละ ๓ กับเอทานอลร้อยละ ๙๕ และเรียกชื่อว่า น้ำยาผสมกรด-แอลกอฮอล์ (acid-alcohol mixture) (Vilchèze & Kremer, 2017)

นอกจากนี้ ยังมีเทคนิคอื่น ๆ ที่พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจเชื้อเออเฟปี เช่น Kinyoun stain (Vilchèze & Kremer, 2017) หรือปรับลดความแรงของกรดที่ใช้ล้าง เรียกว่า modified acid-fast stain เช่น modified ZN, modified Kinyoun, Fite-Faraco, Wade-Fite ทั้งนี้ พบว่าเชื้อก่อโรคเรื้อนติดสีทนกรดได้บ้าง (partially acid-fast) แต่ไม่ดีเท่าเชื้อก่อวัณโรค และยังพบแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordonia* หรือโปรโตซัวบางชนิด เช่น *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* ก็ติดสีทนกรดได้บ้าง (Rice, 2023)

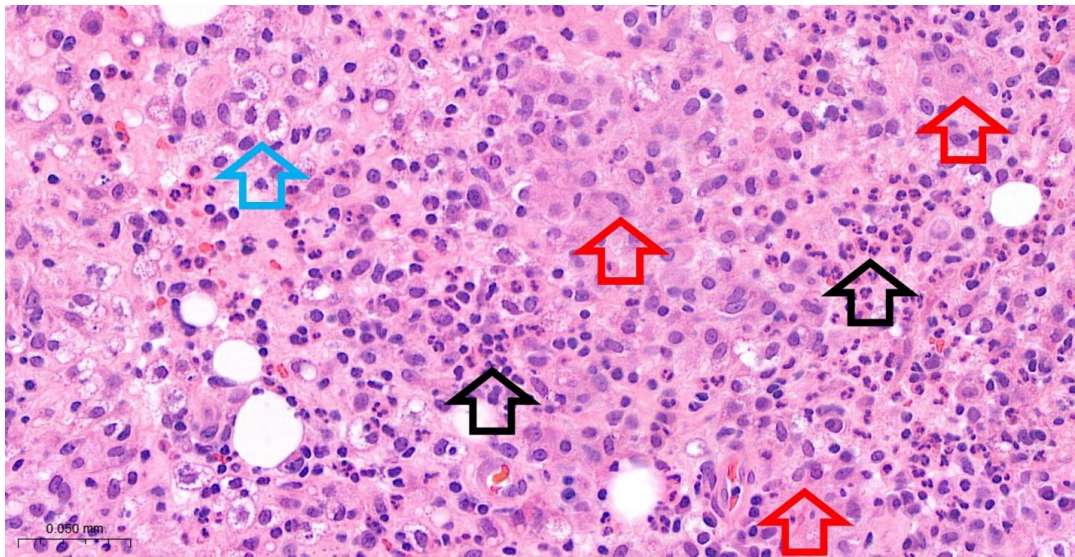
รอยโรคที่พบบ่อยในวัณโรคมีชื่อเรียกว่า แกรนูโลมา (Granuloma) ประกอบด้วย epithelioid macrophage จำนวนมากรวมกันเป็นกลุ่มก้อน ล้อมรอบด้วยเซลล์น้ำเหลืองหรือลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และเซลล์น้ำเลือดหรือเซลล์พลาสมา (plasma cell) จากประสบการณ์การทำงานเป็นพยาธิแพทย์มานานกว่า ๔๐ ปี ผู้นิพนธ์ได้พบความลำบากในการตรวจหาเชื้อเออเฟปีในรอยโรคทางพยาธิวิทยา แม้ว่าบางครั้งจะตรวจพบเชื้อเออเฟปีจำนวนมากมาก็ตาม สิ่งที่สังเกตได้คือรอยโรคของวัณโรคที่มีเนื้อตายตรงกลางนั้นมีโอกาสตรวจพบเชื้อเออเฟปีได้ง่ายกว่ารอยโรคที่เริ่มมีเนื้อเยื่อพังผืด ถ้ามีเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil) ปะปนด้วยมากเท่าใด ก็จะมีโอกาสตรวจพบเชื้อเออเฟปีได้มากขึ้นเท่านั้น ส่วนการพบเซลล์ยักษ์ที่มีหลายนิวเคลียส ซึ่งมักเรียงตัวเป็นพระจันทร์เสี้ยวและมีชื่อเรียกว่า Langhans giant cell นั้น ไม่ได้เพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อเออเฟปี ที่น่าแปลกใจก็คือบางครั้งเนื้อเยื่อส่งตรวจมีรอยโรคของวัณโรคเป็นบริเวณกว้าง แต่ตรวจหาเชื้อเออเฟปีได้ยาก จนมักต้องใช้เวลาตรวจหาเชื้ออยู่นาน บางครั้งมากกว่า ๑ รอบ จึงจะพบเชื้อเออเฟปีเพียงตัวเดียว แต่ก็นับว่าโชคดี เพราะถือว่าตรวจพบเชื้อก่อวัณโรคแล้ว

ผู้นิพนธ์สังเกตว่า เมื่อตรวจพบเชื้อเออเฟปีจำนวนมากเมื่อใด เชื้อเหล่านี้จะย้อมติดสีพิเศษอื่นได้ด้วย ไม่ว่าจะเป็นการย้อมจีเอ็มเอส (GMS stain) เพื่อหาเชื้อรา (ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป), การย้อมสี PAS (periodic acid Schiff), หรือการย้อมสี Warthin-Starry เพื่อหาเชื้อสไปโรคีต (spirochete) แต่การย้อมสี Gram หรือ Giemsa มักเห็นไม่ชัด การย้อมจีเอ็มเอสเป็นชื่อย่อของ Grocott-Gomori methenamine silver nitrate technique ตำราบางเล่มหรือบทความวิชาการบางบทก็ให้เกียรติเฉพาะชื่อแรก ขณะที่ตำราเล่มอื่นหรือบทความวิชาการบทอื่นก็ให้เกียรติเฉพาะชื่อหลัง ที่จริงแล้ว Gyorgi Gomori พยาธิแพทย์ชาวอเมริกันเชื้อสายฮังการี ที่มหาวิทยาลัยแพทยศาสตร์แห่งชิคาโก (University of Chicago Medical School) เป็นคนแรก que คิดค้นเทคนิคย้อมพิเศษนี้เมื่อ พ.ศ. ๒๔๘๙ (ค.ศ. 1946) ทำให้เกิดเกลื่อนเงินจับที่ผนังเซลล์เชื้อรา โดยใช้กรด

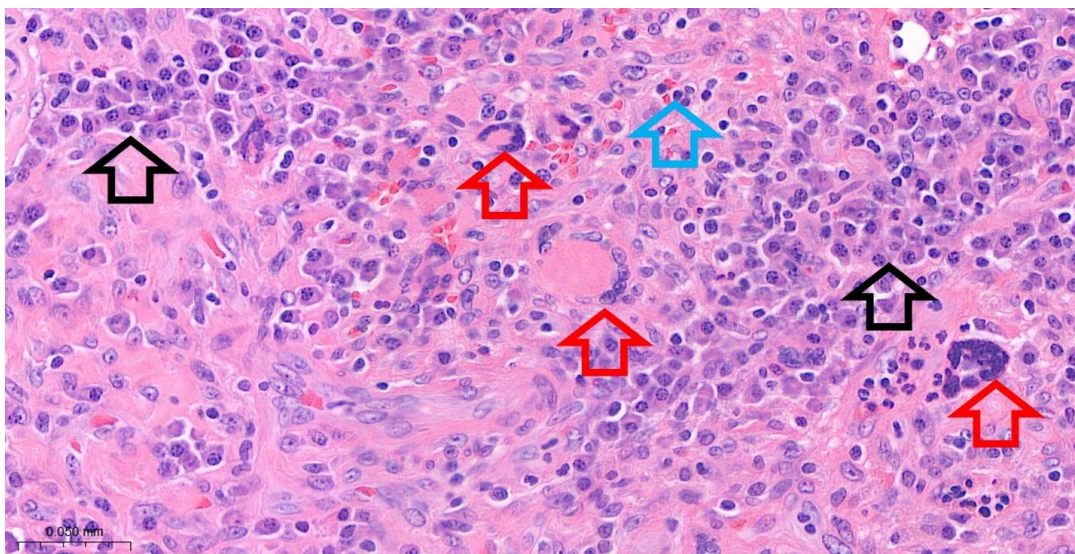
โครมิก (chromic acid) ซึ่งออกซิไดส์ (oxidise) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) หรือคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ของผนังเซลล์เชื้อราให้กลายเป็นแอลดีไฮด์ (aldehyde) จากนั้นรีดิวซ์ (reduce) ให้เป็นเกลือเงินที่มีสีดำ ทำให้เห็นเชื้อราที่ติดสีดำในรอยโรคที่เป็นพื้นสีขาวได้ ต่อมา ใน พ.ศ. ๒๔๙๘ (ค.ศ. 1955) Robert G. Grocott หัวหน้าเทคนิคการแพทย์ในห้องปฏิบัติการคณะกรรมการสุขภาพ (Board of Health Laboratory) ของโรงพยาบาลโกรกาซ (Gorgas Hospital) บริเวณภูเขาแอนคอน (Ancon Hill) อันเป็นที่จุดคลองปานามาในสมัยที่อยู่ในความดูแลของสหรัฐอเมริกา ได้ปรับปรุงเทคนิคการย้อมพิเศษของ Gomori เพื่อใช้ย้อมเชื้อราให้ดีขึ้น เป็นที่เชื่อถือและนิยมใช้เป็นมาตรฐานจนถึงปัจจุบัน โดยพัฒนา alkaline hexamine-silver solution รีดิวส์ให้ได้เกลือเงินที่เสถียร เห็นเชื้อราที่ติดสีดำในรอยโรคที่เป็นพื้นสีเขียวย่อ (Grocott, 1955)

ในทางปฏิบัติของผู้นิพนธ์ เมื่อตรวจพบแกรนูลوما ก็จะใช้ย้อมพิเศษ ZN acid-fast stain เพื่อตรวจหาเชื้อเอเอบี พร้อมกับย้อมจีเอ็มเอสเพื่อตรวจหาเชื้อราที่ก่อรอยโรคแกรนูลوماได้เช่นกัน บ่อยครั้งที่ผู้นิพนธ์ตรวจพบขีดสีดำในรอยโรคบนสไลด์ที่ย้อมจีเอ็มเอส และค่อนข้างมั่นใจว่าเป็นเชื้อเอเอบี ผู้นิพนธ์ก็จะพยายามตรวจหาเชื้อเอเอบีในรอยโรคบนสไลด์ที่ย้อม ZN อย่างตั้งใจจนกระทั่งพบตัวเชื้อเอเอบีได้ในที่สุด (ภาพที่ ๑-๔)

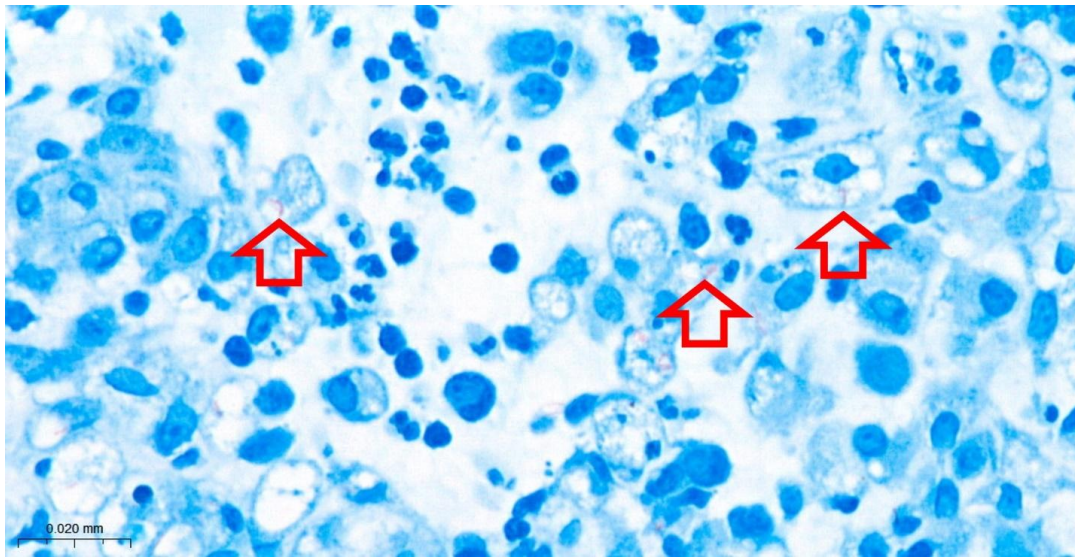
แม้ว่าการตรวจหาเชื้อก่อวัณโรคด้วยวิธีที่ไวกว่า เช่น พีซีอาร์ (PCR) จะเป็นที่ยอมรับใช้ในโรงพยาบาลหรือห้องปฏิบัติการที่พร้อม (Aslanzadeh et al., 1998) แต่ในปัจจุบัน พยาธิแพทย์ก็ยังนิยมย้อมสีพิเศษ ZN เพื่อหาเชื้อเอเอบีในรอยโรคของเนื้อเยื่อ ซึ่งหลายครั้งสามารถยืนยันเชื้อได้ภายในเวลา ๒๔-๔๘ ชั่วโมง เมื่อได้รับชิ้นเนื้อส่งตรวจที่สงสัยว่าติดเชื้อวัณโรค ทำให้แพทย์เริ่มการรักษาวัณโรคได้ นับว่าเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่แพทย์ผู้รักษาต้องการคำยืนยันจากพยาธิแพทย์ว่าตรวจพบรอยโรคของวัณโรคและเชื้อเอเอบีในรอยโรคนั้น บางครั้ง แม้ไม่พบเชื้อวัณโรค แต่ก็ไม่พบเชื้อราหรือสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดแกรนูลوما แพทย์ก็อาจลองรักษาวัณโรคดูก่อน เมื่อผลตรวจทางจุลชีววิทยายืนยันว่าเป็นเชื้อก่อวัณโรคจริง ก็รักษากันต่อไปหรือปรับยาให้เหมาะสมถ้ามีผลทดสอบเชื้อไวหรือดื้อต่อยาชนิดใด นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อก่อวัณโรคอาจทนกรดไม่ได้ ทำให้ย้อมไม่ติดสีทนกรดในการย้อมพิเศษ ZN แต่เชื้อก่อวัณโรคที่ไม่ติดสีทนกรดนี้อาจจะไม่รุนแรง เพียงแต่แฝงตัวซ่อนอยู่และอาจกลับมาก่อโรคใหม่ได้ ทำให้แพทย์ต้องพยายามหาวิธีตรวจยืนยันเชื้อก่อวัณโรคกันต่อไป (Vilchèze & Kremer, 2017)



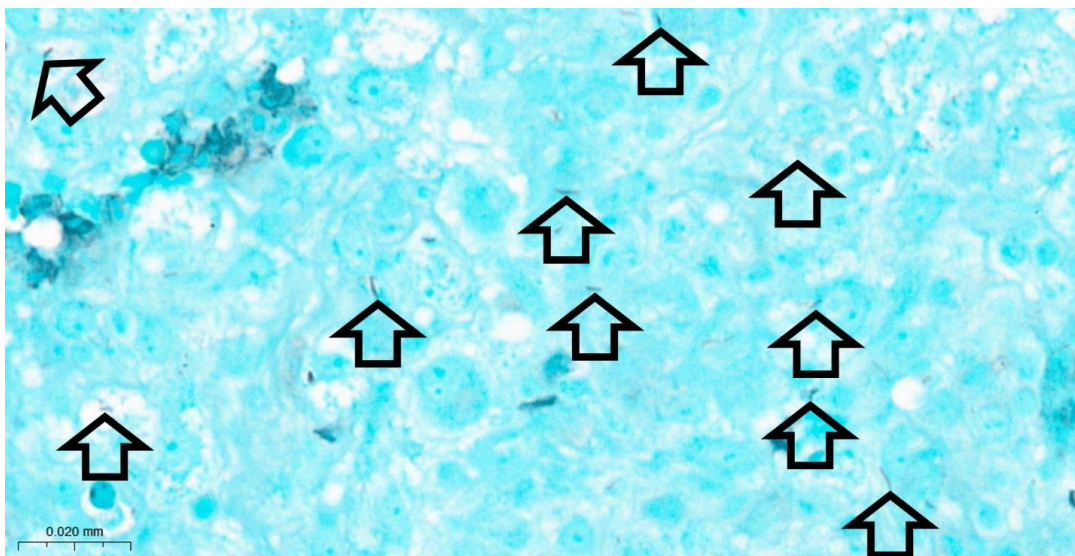
ภาพที่ ๑ แกรนูโลมา (Granuloma) ประกอบด้วย epithelioid macrophage (ลูกศรสีแดง) บางเซลล์จะมีฟองเล็ก ๆ ในไซโทพลาซึม (ลูกศรสีฟ้า) เรียกชื่อว่า foamy macrophage ในภาพนี้ ยังพบนิวโทรฟิล (neutrophil) จำนวนมาก (ลูกศรสีดำ) (H&E, กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า)



ภาพที่ ๒ แกรนูโลมานี้มีเซลล์ยักษ์ที่มีหลายนิวเคลียสเรียงตัวเป็นพระจันทร์เสี้ยว มีชื่อเรียกว่า Langhans giant cell (ลูกศรสีแดง) นอกจากนี้ ยังมีเซลล์น้ำเหลืองหรือลิมโฟไซต์ (ลูกศรสีฟ้า) และเซลล์น้ำเลือดหรือเซลล์พลาสมา (ลูกศรสีดำ) (H&E, กำลังขยาย ๔๐๐ เท่า)



ภาพที่ ๓ แบคทีเรียทรวงแท่งหรือบาซิลลัสติดสีทนกรด (Acid-fast bacillus) หรือเชื้อเอเเอฟบี (AFB) ในรอยโรคของผู้ป่วยวัณโรค เห็นเป็นขีดสีแดง (ลูกศรสีแดง) (Ziehl-Neelsen acid-fast stain, กำลังขยาย ๑,๐๐๐ เท่า)



ภาพที่ ๔ ขีดสีดำ (ลูกศรสีดำ) ที่พบในการย้อมจีเอ็มเอสเพื่อตรวจหาเชื้อรา นั่นคือเชื้อเอเเอฟบี (AFB) สังเกตว่ามีจำนวนมากกว่าเชื้อเอเเอฟบีในภาพที่ ๓ ซึ่งมาจากรอยโรคเดียวกันของผู้ป่วยวัณโรค (GMS stain, กำลังขยาย ๑,๐๐๐ เท่า)

บทสรุป

การตรวจพบเชื้อเอเอฟพีในรอยโรคของวัณโรคได้นั้นมีความสำคัญในการดูแลรักษาผู้ป่วย ผู้นิพนธ์จึงอยากให้ใช้ประโยชน์จากการย้อมจีเอ็มเอสในแผ่นสไลด์ถัดไปจากการย้อมพิเศษ ZN เมื่อตรวจพบแกรนูลโลมาหรือรอยโรคอื่นที่อาจจะตรวจพบได้ในวัณโรค ถ้าตรวจพบขีดสีดำในรอยโรคบนสไลด์ย้อมจีเอ็มเอส ก็น่าจะมีโอกาสสูงในการตรวจพบเชื้อเอเอฟพีในบริเวณรอยโรคนั้น พยาธิแพทย์ควรตั้งใจตรวจหาให้ละเอียดถี่ถ้วนมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Aslanzadeh, J., de la Viuda, M., Fille, M., Smith, W. B., & Namdari, H. (1998). Comparison of culture and acid-fast bacilli stain to PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Mol Cell Probes*, 12(4), 207–11.
- Grocott, R. G. (1955). A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol*, 25(8), 975–79.
- Rice, B. M. (2023). Modified Acid-Fast. In: ASCP BOC's Content Guideline for the Technologist in Microbiology, M(ASCP), and the Specialist in Microbiology, SM(ASCP).
<https://microbiology.mlsascp.com/modified-acid-fast.html>
- Vilchèze, C., & Kremer, L. (2017). Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *Microbiol Spectr*, 5(2), 10.1128/microbiolspec. tbtb2-0003-2015.