

ประสิทธิภาพของชุดนํ้ายาตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก Dengue

ชนิดที่ตรวจหาทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี

Validation of the Rapid Diagnostic Test for Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever which Detecting both Antigen and Antibody

วิชัย สติมัย พ.บ ศ.ศ.ม.*

Wichai Satimai M.D., M.A.*

พงษ์วิทย์ บัวลอมไบ พ.ด.*

Pongwit Bualombai Ph.D*

วิบูลย์ศักดิ์ วุฒินโซติ พ.บ.**

Wiboonsak Wutthithanachot M.D.**

ทิตถากร รอดนาค ว.บ. *

Ditthakorn Rodnak B.Sc.*

คณินิจ คงพวง พ.ด.*

Kanungnit Congpuong Ph.D.*

รุ่งระวี ทัพย์มนตรี พ.ด.*

Rungrawee Thipmontee Ph.D*

*สำนักโรคติดต่อหน้าโดยแมลง

*Bureau of Vector Borne Disease

**โรงพยาบาลชุมแพ อ.ชุมแพ จ. ขอนแก่น

**Chumpae Hospital, Kon Khan Province

บทคัดย่อ

การศึกษาวินิจฉัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของชุดนํ้ายาตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก Dengue (DF/DHF) ชนิดตรวจหาทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี (SD Bioline Dengue Duo) โดยคัดเลือกผู้ป่วยที่สงสัยไข้เลือดออก Dengue (DF/DHF) ที่มารับบริการตรวจรักษาในโรงพยาบาลชุมแพ จังหวัดขอนแก่น จำนวน 173 คนในช่วงเดือน กรกฎาคม - กันยายน 2552 ผลการศึกษาพบว่าชุดนํ้ายาตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก Dengue (DF/DHF) สามารถตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรก 40 ราย และติดเชื้อครั้งที่สอง 23 ราย ในช่วงระยะ acute ของโรค มีความไวเท่ากับ ร้อยละ 70.4 และความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 89.9 ขณะที่ในระยะ convalescence ของโรคมีความไว และความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 77.3 และ 86.3 และในภาพรวมของผู้ป่วยทั้งหมด ชุดนํ้ายาให้ความไวเท่ากับ ร้อยละ 71.4 และความจำเพาะเท่ากับ ร้อยละ 88.9 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าความไวของชุดนํ้ายาตรวจวินิจฉัยโรคชนิดนี้ จะแปรปรวนตามระยะเวลาหลังจากเริ่มมีอาการป่วย ซึ่งความไวสูงสุด ต่อแอนติเจน (NS 1) จะสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ป่วยมาแล้ว 3 วัน (ร้อยละ 100) และความไวสูงสุด ต่อแอนติบอดี (IgM) จะสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วยที่ป่วยมาแล้ว 4 วัน (ร้อยละ 58) จากการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นว่าชุด SD Bioline Dengue Duo มีความไวในระดับกลาง แต่มีความจำเพาะสูงทั้งในระยะ acute และ convalescence ของโรค แต่ความไวจะสูงสุดในช่วงแรกของการป่วยประมาณ วันที่ 3 - 4 หลังเริ่มมีอาการ

Abstract

The objective of this study was to evaluate the rapid diagnostic test for Dengue and Dengue haemorrhagic fever (DF/DHF) which detecting RDT NS1 and RDT IgM/IgG (SD Bioline Dengue Duo). One hundred and seventy - three suspected DF/DHF cases from Chumpae Community Hospital, Khon Kean Province, Thailand during July - September 2009 were recruited into this study. The results showed this rapid diagnostic test detected 40 and 23 primary and secondary infective patients respectively. The sensitivity was 70.4 %

and specificity was 89.9 % in acute phase of illness while in convalescence phase, the sensitivity and specificity were 77.3 % and 86.3 % respectively. Totally, the test gave 71.4 % sensitivity and 88.9 % specificity to all patients. However, the RDT's sensitivity was deviated by the duration after onset of fever. The RDT NS1 showed the highest sensitivity in the third day (100 %) and the RDT IgM showed the highest sensitivity in the fourth day (58 %). This rapid diagnostic test showed moderate sensitivity; nevertheless, it showed high specificity in both acute and convalescence phases of illness. In addition, its sensitivity showed the highest in the early phase of illness (the 3rd - 4th day after onset of illness).

ประเด็นสำคัญ-	Keyword
แอนติเจน dengue nonstructural protein 1(NS1) การตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกอย่างรวดเร็ว	Dengue nonstructural protein 1 antigen, Rapid dengue diagnosis

บทนำ

ไข้เลือดออกเด็งกี เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากอาร์โบไวรัส ที่พบทั่วไปในประเทศเขตร้อนและทำให้เกิดอัตราป่วย และอัตราตายสูงกว่าในกลุ่มโรคอาร์โบไวรัสอื่นๆ ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคนานกว่า 40 ปี⁽¹⁾แพร่กระจายออกไปทุกภูมิภาคของประเทศ และมีแนวโน้มของอัตราป่วยสูงขึ้นทุกปี การตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกสามารถยืนยันโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สะดวกที่จะนำมาใช้ในภาคสนาม เนื่องจากต้องดำเนินการในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน และมีบุคลากรที่ได้รับการฝึกฝนมาเป็นอย่างดี แต่เมื่อมีผู้คิดค้นชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็ว Rapid Diagnostic Test (RDT) ขึ้น จึงมีประโยชน์สำหรับการดำเนินการป้องกันและควบคุมโรคอย่างยิ่ง ปัจจุบันมีชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยโรคที่ตรวจระยะเฉียบพลัน (acute phase) โดยการตรวจหาแอนติเจน ซึ่งเป็น nonstructural protein NS-1 ของ dengue virus ในซีรัมหรือพลาสมา สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ dengue virus ในระยะ 3 วันหลังมีไข้ แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นการติดเชื้อครั้งที่ 1 หรือ ครั้งที่ 2⁽²⁾ สำหรับชุดตรวจที่ตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ NS1 ในซีรัม ในปัจจุบันสามารถเตรียม NS1 antigen ได้โดยเทคนิค recombinant เมื่อนำ NS1 ที่ได้มาผลิต monoclonal antibody สามารถตรวจหา NS1 antigen ในซีรัมหรือพลาสมาได้โดยวิธี ELISA ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถตรวจพบ

NS1 antigen ได้ตั้งแต่เริ่มมีไข้ จากการทบทวนผลการศึกษาวินิจฉัยที่ผ่านมา Dussart 2006 และคณะ⁽³⁾ ซึ่งใช้ตัวอย่างจากประเทศ Guyane จำนวน 299 ราย ที่แพทย์วินิจฉัยเป็นผู้ป่วยไข้เลือดออก นำมาตรวจยืนยันโดยใช้ชุดน้ำยาตรวจตรวจหาแอนติเจน NS1 โดยใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Bio-Rad พบว่า ชุดตรวจให้ความไว ร้อยละ 88.7 และ Dussart 2008⁽⁴⁾ ได้ทำการประเมิน ชุดน้ำยาตรวจ NS 1 Bio-Rad อีกครั้ง โดยเปรียบเทียบชุดน้ำยาของบริษัท Bio-Rad กับชุดน้ำยาตรวจ NS 1 ของบริษัท Panbio ซึ่งใช้ตัวอย่างจากประเทศ Guyane จำนวน 272 ราย ที่แพทย์วินิจฉัยเป็นผู้ป่วยไข้เลือดออก ชุดน้ำยาแรกให้ความไว ร้อยละ 81.5 แต่พบว่าถ้าแปรผลชุดตรวจภายใน 15 นาที ชุดตรวจให้ความไวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 82.4 ส่วนชุดน้ำยาตรวจที่ 2 คือชุด NS 1 ของบริษัท Panbio ให้ความไวร้อยละ 60.4 ต่อมา Libraty DH และคณะ⁽⁵⁾ ได้เปรียบเทียบระดับ NS1 ในเด็กอายุ 6 - 14 ปี ที่ติดเชื้อเด็งกีทัมป 2 พบว่าในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 หลังมีไข้เด็กที่มีการดำเนินโรคเป็นแบบ DHF มีระดับ NS1 สูงกว่าเด็กที่มีการดำเนินโรคเป็น DF โดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณเด็งกีทัมป 2 viral RNA และสอดคล้องกับการผลการศึกษาของ Shu 2004⁽⁶⁾ ซึ่งพบว่าความไวของชุดตรวจ NS1 จะลดลงอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 5 หลังมีไข้ ดังนั้น serum ที่เก็บระหว่าง Day 0-4 จึงให้ที่ถูกต้องมากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Alcon 2002⁽⁷⁾ และ Shu 2004⁽⁸⁾ ที่พบ NS1 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 - 9 หลังจากวันที่ผู้ป่วยมีอาการไข้

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาดังกล่าวมีความขัดแย้งกับการศึกษาของ Blacksell 2008^(9, 10) พบว่า เมื่อเก็บ serum ช่วง วันที่ 4 - 7 หลังมีไข้ พบว่าชุดนํ้ายาตรวจให้ความไวเพียง ร้อยละ 63.2

ชุดนํ้ายาตรวจวินิจฉัยโรคอีกประเภท คือ ใช้ตรวจหาแอนติบอดี IgM หรือ IgG ของ dengue virus ในซีรัมหรือพลาสมา สามารถวินิจฉัยการติดเชื้อ dengue virus ในระยะ 5-7 วันหลังมีไข้ และตรวจหาผู้ป่วยระยะพักตัว (convalescence phase) แต่มีรายงานการศึกษาว่าการตรวจพบแอนติบอดี IgM ในผู้ป่วยระยะเฉียบพลันได้ เพราะ IgM สามารถตรวจพบได้เร็วที่สุด วันที่ 5 หลังมีไข้⁽²⁾ พบก่อน IgG ซึ่งส่วนใหญ่ เมื่อตรวจพบ IgG จะไม่ตรวจพบแอนติเจน NS1 อนึ่งการตรวจพบ IgM หรือ IgG สามารถบอกได้ว่าเป็น primary หรือ secondary infection⁽²⁾ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Shu 2002⁽⁶⁾ ซึ่งตรวจพบ IgG ที่ Day 8 หลังมีไข้ ต่อมาจากการการศึกษาของ Lam SK , 1998⁽¹¹⁾ ศึกษาความถูกต้องของชุดนํ้ายาตรวจยี่ห้อ PanBio Dengue Rapid Test (Pan Bio, Brisbane, Australia) ที่ตรวจวินิจฉัย แอนติบอดีเพียงอย่างเดียว พบว่ามีความไวถึงร้อยละ 100 ในการตรวจทั้งการติดเชื้อครั้งแรก และการติดเชื้อซ้ำ และมีความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 89 ซึ่งให้ผลเท่ากับวิธี Dengue Duo ELISA จากบริษัท เดียวกัน และให้ผลสอดคล้องกับวิธี Hemagglutination Inhibition (HAI) ต่อมาการศึกษาของ Vajpajee M, 2001⁽¹²⁾ เปรียบเทียบการตรวจ 3 วิธี คือใช้ MRL Diagnostic Dengue Fever Virus IgM Capture ELISA, PAN Bio Dendue Duo IgM & IgG Capture ELISA และ Pan Bio Rapid Immuno chromatographic test พบว่าทั้ง 3 วิธีมีความไวมากกว่า ร้อยละ 95 โดย 2 วิธีหลังให้ความไวในการตรวจการติดเชื้อครั้งแรก และครั้งที่สอง เท่ากับร้อยละ 100 และ 93.54 ตามลำดับ ในขณะที่ความจำเพาะของทั้ง 3 วิธี เท่ากับ ร้อยละ 100, 92.8 และ 85.7 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์สูงที่ยอมรับได้

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ชุดนํ้ายาตรวจใช้เลือดออก จึงควรตรวจได้ทั้งแอนติเจน และแอนติบอดี เนื่องจากชุดนํ้ายาตรวจ ควรจะตรวจหาผู้ป่วยได้ทั้งระยะ

เฉียบพลัน และระยะพักตัว และจากการทบทวนวรรณกรรมดังกล่าวข้างต้น ส่วนใหญ่นักวิจัยพบว่า ชุดนํ้ายาตรวจที่ตรวจหาแอนติเจน NS1 ตรวจพบได้ในระดับสูง 1-5 วัน หลังมีไข้⁽²⁻⁸⁾ และจะลดลงหลังวันที่ 5⁽⁶⁻⁸⁾ และตรวจไม่พบหลังวันที่ 9⁽⁷⁻⁸⁾ แต่ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรก หรือครั้งที่สอง⁽²⁾ ดังนั้นผู้ป่วยจึงควรตรวจด้วยชุดนํ้ายาตรวจที่ตรวจหาแอนติบอดี (IgM, IgG) ควบคู่ไปด้วย เพราะนอกจากจะตรวจหาผู้ป่วยระยะพักตัว จะสามารถแยกได้ว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรก หรือครั้งที่สอง และแอนติบอดี IgG จะตรวจพบได้ วันที่ 7 หลังมีไข้^(2, 6, 8)

ปัจจุบันในท้องตลาด มีชุดนํ้ายาตรวจที่ตรวจได้ทั้งแอนติเจน (NS1) และแอนติบอดี (IgM, IgG) อยู่เพียงยี่ห้อเดียวคือ SD Bioline Dengue Duo อย่างไรก็ตาม มีผลการศึกษาว่าชุดนํ้ายาตรวจนี้ ถูกนำไปศึกษาในประเทศมาเลเซีย โดย Mui Wang และคณะ⁽¹³⁾ ปี 2010 จากการศึกษา พบว่าการตรวจผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน ให้ความไวร้อยละ 88.65 ให้ความจำเพาะ ร้อยละ 98.75 เมื่อผนวกผลการตรวจพบแอนติเจน NS1 และ แอนติบอดี IgM เข้าด้วยกัน ในทำนองเดียวกัน การศึกษาของ Osalio และคณะ ปี 2010⁽¹⁴⁾ ได้ศึกษาในประเทศโคลัมเบีย พบว่า SD Bioline Dengue Duo ให้ความไวร้อยละ 78.4 (95 % CI 72.4-83.7) เมื่อผนวกผลการตรวจพบแอนติเจน NS1 และแอนติบอดี IgM เข้าด้วยกัน แต่เมื่อผนวกผลการตรวจพบ แอนติเจน NS1 แอนติบอดี IgM และแอนติบอดี IgG เข้าด้วยกัน SD Bioline Dengue Duo ให้ความไวร้อยละ 78.4 (95 % CI 72.4-83.7)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่ได้มีการศึกษาชุดนํ้ายาตรวจที่ตรวจได้ทั้งแอนติเจน (NS1) และแอนติบอดี (IgM, IgG) ในประเทศไทย ดังนั้นโครงการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงต้องการประเมินคุณภาพผลิตภัณฑ์ชุดนํ้ายาตรวจอย่างรวดเร็ว วินิจฉัยโรคไข้เด็งกี และใช้เลือดออกเด็งกี SD Bioline Dengue Duo เป็นชุดตรวจที่ตรวจได้ทั้งแอนติเจน และแอนติบอดี โดยการหาค่าความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบ โดยใช้ผลการตรวจโดยวิธี Real time PCR และวิธี Dengue captured IgM&IgG เป็นวิธี Gold Standard

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. สถานที่ศึกษา ดำเนินการใน 2 ส่วน คือ ส่วนของ ห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมแพ อ.ชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และห้องปฏิบัติการศูนย์อ้างอิงทางห้องปฏิบัติการ โรคติดต่อมาโดยแมลง สำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง ระยะเวลาที่ศึกษา คือ 3 เดือน ตั้งแต่เดือนเดือน กรกฎาคม - กันยายน 2552 โดยศึกษาในผู้ป่วยชายหรือหญิงที่มารับบริการที่โรงพยาบาลชุมแพ อายุมากกว่า 1 ปี มีอาการสงสัยว่าจะเป็นโรคไข้เลือดออก และไข้เลือดออกเต็มที่ตามการวินิจฉัยของแพทย์ คัดเลือกแบบเจาะจงโดยกำหนด จำนวน 173 ราย โดยในเบื้องต้นแพทย์/พยาบาล ทำการตรวจวินิจฉัยแยกผู้ป่วยที่มีอาการไข้เต็มที่หรือไข้เลือดออกเต็มที่ หรือผู้ป่วยที่อาการสงสัยว่าจะเป็นโรคไข้เลือดออก ตามนิยามโรคไข้เลือดออก ไข้เต็มที่หรือไข้เลือดออกของกรมควบคุมโรค

2. ชุดน้ำยาตรวจวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็ว

ก. ชนิดของชุดน้ำยา เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท SD Bioline Dengue Duo เพื่อวิเคราะห์หาแอนติเจน NS1, แอนติบอดี IgM และ แอนติบอดี IgG การเก็บตัวอย่างที่ตรวจ โดยห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมแพ ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ รวมประมาณ 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันการแข็งตัวของเลือด นำเลือดไปปั่นแยกพลาสมา เพื่อนำไปทดสอบกับชุดน้ำยา โดยมีขั้นตอน คือ

1. นำซองบรรจุชุดน้ำยา ออกมาวางที่อุณหภูมิห้อง (กรณีเก็บในตู้เย็น ต้องนำมาวางให้เท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนใช้)

2. ฉีกซอง ชุดน้ำยา และวางบนโต๊ะที่

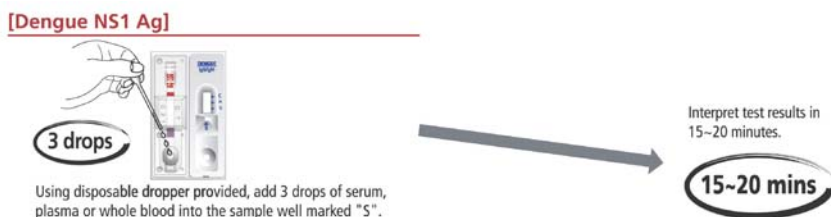
ราบเรียบ และสะอาด และให้ตรวจสอบกลับชุดน้ำยา ซึ่งประกอบด้วยแถบทดสอบ 2 ส่วน ที่ตรึงอยู่บนแท่นพลาสติก ส่วนที่ 1 ใช้ตรวจหาแอนติเจน NS1 (Dengue NS1 antigen) ส่วนที่ 2 ใช้ตรวจหาแอนติบอดี (Dengue IgG/IgM)

3. ใช้ dropper ที่มาพร้อมกับชุด kit ตูดพลาสมาจากหลอด แล้ว หยดลงในหลุมวงกลมบนตลับ ส่วนที่ 1 (ตรวจหา NS1 antigen) ที่เขียนว่า S ลงไป 3 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาทีจึงอ่านผล ดังรูปที่ 1

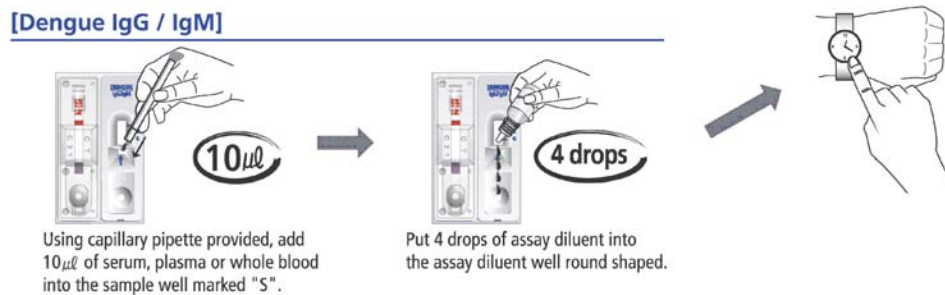
4. ต่อมาใช้ Capillary Pipette ที่มาพร้อมกับชุด Kit ตูดพลาสมาจากหลอด ถึงขีดระดับที่กำหนด ประมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วหยดในหลุมวงกลมบนตลับส่วนที่ 2 (ตรวจหาแอนติบอดี) ที่เขียนว่า S หยดน้ำยาบัฟเฟอร์ลงในหลุมกลมด้านล่างสุดของตลับที่ 2 ทิ้งไว้ 15-20 นาที ดังรูปที่ 2

5. อ่านผลว่าเป็นผลบวก หรือลบ ในกรณีชุดน้ำยาตรวจหาแอนติเจน NS1 ถ้าให้ผลบวกจะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C หรือตำแหน่ง control และตำแหน่ง T ในช่องแสดงผล แต่ถ้าให้ผลลบจะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C ตำแหน่งเดียว และจะไม่แปรผลเมื่อไม่เกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C (รูปภาพที่ 3) ในทำนองเดียวกัน ชุดน้ำยาตรวจหาแอนติบอดี ถ้าให้ผลบวก IgM จะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C และตำแหน่ง M ในช่องแสดงผล ถ้าให้ผลบวก IgG จะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C และตำแหน่ง G ในช่องแสดงผล และถ้าให้ผลบวกทั้ง IgM และ IgG จะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C ตำแหน่ง M และตำแหน่ง G ในช่องแสดงผล แต่ถ้าให้ผลลบจะเกิดแถบสีน้ำตาลที่ตำแหน่ง C ตำแหน่งเดียว (รูปภาพที่ 4)

รูปที่ 1 รูปขั้นตอนการตรวจหาแอนติเจน NS1 (Dengue NS1 antigen) ของชุดน้ำยา

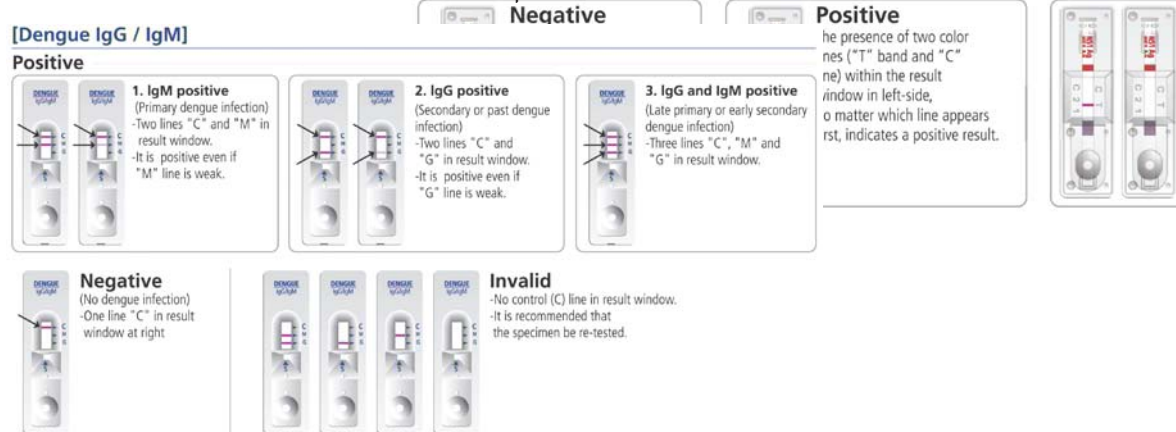


รูปที่ 2 รูปขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดี IgM และ IgG ของชุดนํ้ายา



รูปที่ 3 รูปแสดงการแปลผลตรวจหาแอนติเจน NS1 (Dengue NS1 antigen) ของชุดนํ้ายา

รูปที่ 4 รูปแสดงการแปลผลการตรวจหาแอนติบอดี IgM และ IgG ของชุดนํ้ายา



ข. การตรวจยืนยันผลโดยวิธี Gold Standard
พลาสมาส่วนที่เหลือ จะนำไปตรวจโดยวิธี Real time Polymerase Chain Reaction (Real time PCR) เป็น Gold Standard สำหรับการตรวจหาแอนติเจน NS1 และวิธี Dengue captured IgM&IgG เป็น Gold Standard สำหรับการตรวจหาแอนติบอดี IgM & IgG สำหรับ Real time PCR ตรวจที่ภาควิชาภูมิคุ้มกันเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วน Dengue captured IgM&IgG ตรวจที่แผนกอาร์โบไวรัส สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3. การวิเคราะห์และแปลผล เป็นแบบเชิงพรรณนา โดยการวิเคราะห์หาค่าความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบ โดยเปรียบเทียบผลการตรวจโดยใช้ชุดนํ้ายา

(SD Bioline Dengue Duo) กับ ผลการตรวจโดยวิธี Real time PCR และวิธี Dengue captured IgM&IgG ซึ่งเป็นวิธี Gold Standard

ผลการศึกษา

จำนวนผู้ป่วยทั้งหมดที่มาใช้บริการเท่ากับ 173 ราย แบ่งเป็น กลุ่มอายุ 1-5 ปีจำนวน 30 คน กลุ่มอายุ 6-10 ปีจำนวน 63 คน และกลุ่มอายุ 11-15 ปีจำนวน 80 คน มีอัตราส่วนเพศชายต่อหญิง เท่ากับ

1: 0.77, 1: 17 และ 1: 0.95 ตามลำดับ ในส่วนความถี่ของจำนวน test ที่ให้ผลบวก และ ลบ โดยวิธี SD Bioline Dengue Duo, IgG& IgM Capture ELISA และ PCR ดังที่แสดงในตารางที่ 1 จากการหาค่า Validation ของวิธี SD Bioline Dengue Duo พบว่าการตรวจหาแอนติเจน NS 1 (ตามตารางที่ 2) เมื่อเทียบกับวิธี PCR เป็นวิธี Gold Standard ให้ค่าความไว และความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 36.7 และ 86.36 ตาม ลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ความถี่ของจำนวน test ที่ให้ผลบวก และ ลบ โดยวิธี SD Bioline Dengue Duo, IgG& IgM Capture ELISA และ PCR

SD Bioline Dengue Duo			IgG& IgM Capture ELISA		PCR
NS1	IgM	IgG	IgM	IgG	NS1
Pos: Neg	Pos: Neg	Pos: Neg	Pos: Neg	Pos: Neg	Pos: Neg
40: 133	25: 148	23: 150	63: 110	70 : 103	34: 139

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD NS1 Antigen ในช่วง acute phaseเมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard PCR

SD NS1 Antigen		PCR			ค่าความไว (sensitivity) = 36.7 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 86.36 % PPV= 55 % NPV= 75 % Kappa = 0.390
		+	-		
	+	11	9	20	
	-	19	57	76	
		30	66	96	

ค่าความไวและค่าความจำเพาะของวิธี SD IgM จำเพาะของวิธี SD NS1 Antigen ผสมกับ SD IgM เมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard IgM Capture ELISA เมื่อเทียบกับวิธี PCR และ IgM Capture ELISA เท่ากับ ในช่วง acute phase เท่ากับ ร้อยละ 39.7 และ 100 ร้อยละ 70.4 และ 89.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และค่าความไวและค่าความ

ตารางที่ 3 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD IgM ในช่วง acute phaseเมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard IgM Capture ELISA

SD IgM		Gold Standard IgM Capture ELISA			ค่าความไว (sensitivity) = 39.7 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 100 % PPV= 100 % NPV= 46.5 % Kappa = 0.183
		+	-		
	+	25	0	25	
	-	38	33	71	
		63	33	96	

ตารางที่ 4 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD NS1 Antigen ผสมกับ SD IgM ในช่วง acute phase เมื่อเทียบกับวิธี PCR และ IgM Capture ELISA

SD NS1 and IgM		PCR กับ IgM Captured ELISA			ค่าความไว (sensitivity) = 70.4 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 89.9 % PPV= 73.1 % NPV= 88.6 % Kappa = 0.594
		+	-		
	+	19	7	26	
	-	8	62	70	
		27	69	96	

PPV = Positive Predictive Values, NPV = Negative Predictive Values

ในช่วงระยะ Convalescent phase (มีไข้มาแล้วมากกว่า 5 วัน) การหาค่า Validation ของวิธี SD Biotline Dengue Duo พบว่าการตรวจหา antigen NS1 กับวิธี PCR, (ตารางที่ 5) ให้ค่าความไว และความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 75 และ 89 ตามลำดับ การตรวจหา IgM และ IgG เมื่อเทียบ IgM และ IgG capture ELISA เป็นวิธี Gold Standard (actually infected specimen) มีค่าความไว และความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 71.4 และ 88.9 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 5 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD NS1 Antigen ในช่วง convalescence phase เมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard PCR

SD NS1		PCR			ค่าความไว (sensitivity) = 75 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 89 % PPV= 27.3 % NPV= 98.5 % Kappa = 0.605
		+	-		
	+	3	8	11	
	-	1	65	66	
		4	73	77	

PPV = Positive Predictive Values, NPV = Negative Predictive Values

ตารางที่ 6 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD RDT Duo ในระยะ convalescence เมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard IgM และ IgG Capture ELISA

ก. SD RDT แสดงผล IgG

ข. SD RDT แสดงผล IgM หรือ IgG

ก.

SD IgG		IgG capture ELISA			ค่าความไว (sensitivity) = 63.6 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 98.04 % PPV= 93.3 % NPV= 86.2 % Kappa = 0.372
		+	-		
	+	14	1	15	
	-	8	50	58	
		22	51	73	

PPV = Positive Predictive Values, NPV = Negative Predictive Values

ข.

SD IgM + IgG specimen	IgM และ IgG capture ELISA		ค่าความไว (sensitivity) = 77.3 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 86.3 % PPV = 70.8 % NPV = 89.8 % Kappa = 0.516
	+	-	
+	17	7	24
-	5	44	49
	22	51	73

PPV = Positive Predictive Values, NPV = Negative Predictive Values

ตารางที่ 7 แสดงค่าความไว และค่าความจำเพาะ ของวิธี SD RDT Duo (รวมผล NS1+ IgM + IgG ทั้งในช่วง Acute และ Convalescent phase เมื่อเทียบกับวิธี Gold Standard PCR, IgM และ IgG Capture ELISA

SD IgM + IgG specimen	PCR NS1 + IgM และ IgG capture ELISA		ค่าความไว (sensitivity) = 77.3 % ค่าความจำเพาะ (specificity) = 86.3 % PPV = 70.8 % NPV = 89.8 % Kappa = 0.646
	+	-	
+	40	13	53
-	16	104	120
	56	117	173

PPV = Positive Predictive Values, NPV = Negative Predictive Values

ในกรณีพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของ SD RDT Duo ทั้งผล NS1 และ IgM จะ แสดงค่าแปรปรวน วันที่เริ่มป่วยของผู้ป่วย โดยกำหนดค่า 1, 2, 3, 4, 5 ตามวันที่เริ่มป่วยของผู้ป่วย (รูปที่ 5) แต่ค่าความจำเพาะ และ > 5 คือ ป่วยมา 1, 2, 3, 4, 5 และมากกว่า 5 วัน ให้ผลค่อนข้างคงที่

ตามลำดับ ก่อนมาพบแพทย์ กับผลค่าความไว ของ

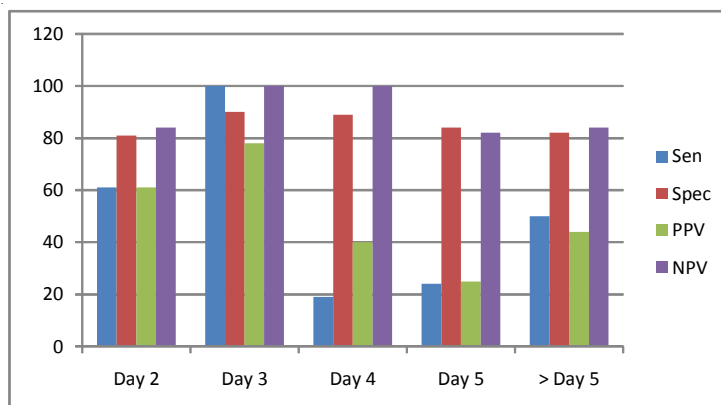
รูปที่ 5 แสดงค่า ความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก และค่าพยากรณ์ผลลบ ตามวันที่ผู้ป่วยเริ่มป่วยก่อนมารับบริการ

ก. แสดงผลของ SD RDT Duo NS1

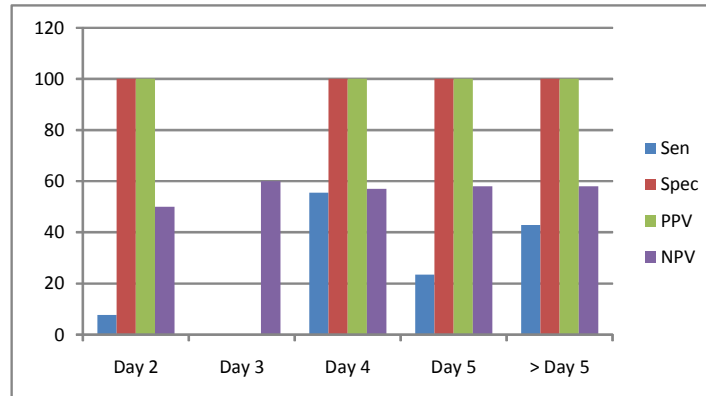
ข. แสดงผลของ SD RDT Duo IgM

ค. แสดงผลของ SD RDT Duo NS1+ IgM

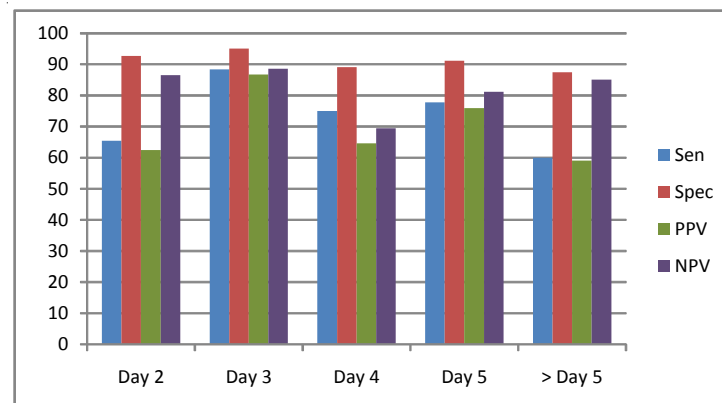
ก.



ข.



ค.



1. Sen = sensitivity Spec = Specificity PPV = Positive predictive value NPV = Negative predictive value

2. ค่า 1, 2, 3, 4, 5 และ > 5 คือ บ่อยมา 1, 2, 3, 4, 5 และมากกว่า 5 วัน ตามลำดับ

วิจารณ์

ผลการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า SD Bioline Dengue Duo สามารถตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อครั้งแรก 40 ราย (NS1 positive) และ ติดเชื้อครั้งที่สอง 23 ราย (IgG positive) (ตารางที่ 1) ในการประเมิน Diagnostic value ของชุดนํ้ายา SD RDT พบว่าในช่วงระยะเฉียบพลันในการตรวจหาแอนติเจน NS 1 ให้ค่าความไวร้อยละ 36.7 (ตารางที่ 2) ส่วนผลการตรวจ

ผู้ป่วยในระยะพักตัว แต่ค่าความไวสูงขึ้นเป็น 70.4 เมื่อผนวกผล RDT แอนติเจน NS 1 และ RDT แอนติบอดี IgM เข้าด้วยกัน (ตารางที่ 4) ส่วนผลการตรวจผู้ป่วยในระยะพักตัว ชุดนํ้ายานี้ แสดงความไวเพิ่มเป็นร้อยละ 75 (ตารางที่ 5) แต่อย่างไรก็ตาม ในระยะพักตัวนี้ มีผู้ป่วยไข้เลือดเพียง 4 ราย ดังนั้นจึงนำค่าความไวนี้มาเป็นตัวแทนของค่าคุณภาพของนํ้ายานี้ไม่ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อดูภาพรวมของความไว ต่อผู้ป่วยทั้งหมด 173 คน ชุดนํ้ายานี้ให้ค่าความไวและความจำเพาะ เท่ากับร้อยละ 77.3 และ 86.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) ซึ่ง ค่าความไวที่ได้นี้ต่ำกว่าจากการศึกษา ของ Mui Wang⁽¹³⁾ ซึ่งศึกษาชุดนํ้ายาชนิดเดียวกันนี้ ได้ความไวร้อยละ 88.65 แต่ให้ค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Osalio และคณะ ปี 2010⁽¹⁴⁾ ที่ศึกษาความไวของชุดนํ้ายาชนิดอื่น เช่นเดียวกัน ได้ความไวร้อยละ

78.4 ส่วนในระยะพักตัว หรือ coalescent period ชุดนี้น้ำยาให้ค่าไวต่อการตรวจหา IgG ร้อยละ 63.6 (ตารางที่ 6 ก) แต่เมื่อผนวก IgM เข้าไป ได้ค่าไวเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 77.3 (ตารางที่ 6 ข) แสดงให้เห็นผู้ป่วยที่มาหาแพทย์ หลังไขว้นที่ 5 ควรจะต้องดูทั้ง IgG และ IgM ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อนันต์ นิสาลักษณ์ 2549⁽²⁾ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Shu 2002⁽⁶⁾ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จำนวนหลังจากเริ่มมีอาการไข้มีความสำคัญมาก ซึ่งชุดน้ำยาตรวจ SD Bioline Dengue Duo นี้ให้ค่าไวสูงสุด (ร้อยละ 100) ในการตรวจหาแอนติเจน NS1 ในวันที่ 3 หลังจากผู้ป่วยมีอาการไข้ (รูปที่ 5 ก) ซึ่งจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Libraty DH และคณะ⁽⁵⁾ และผลการศึกษาของ Shu 2004⁽⁶⁾ ซึ่งบ่งบอกให้เห็นว่า serum ควรเก็บระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังมีไข้ และจากการศึกษาในครั้งนี้ การผนวกผลการตรวจ IgM เข้าไปกับผลการตรวจแอนติเจน NS 1 ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 หลังมีไข้มีประโยชน์เพียงเล็กน้อย

ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงความไวของชุดน้ำยาตรวจต่ำกว่าร้อยละ 80 ซึ่งสาเหตุใหญ่ น่าจะมาจากหลายปัจจัย คือ การขนส่งตัวอย่างเลือดจากโรงพยาบาลชุมแพ จ.ขอนแก่น มาตรวจยืนยันที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาออร์โธไวรัส กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งการขนส่งตัวอย่างไม่สามารถควบคุมในอุณหภูมิให้คงที่ได้ จะเห็นได้ว่าคุณลักษณะของแอนติเจนต่อตัวไวรัสได้สูญเสีย ดูได้จากค่าผลลบแปลกล้อมที่มีจำนวนมากถึง 19 และ 38 ราย ในตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ แต่ไม่ค่อยมีผลต่อ IgG มากนัก และในท้ายที่สุด การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยาตรวจไขเลือดออก น่าจะตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี เพราะผู้ป่วยได้ทั้งระยะเฉียบพลันและระยะพักตัว ซึ่งจะเห็นได้ว่า ร้อยละ 45 ของผู้ป่วย (77 ราย จาก 173 ราย) มาพบแพทย์ หลังจากวันที่ 5 หลังมีไข้ และนอกจากจะตรวจหาผู้ป่วยระยะผู้ป่วยแล้วจะสามารถแยกได้ว่าเป็นการติดเชื้อครั้งแรก หรือครั้งที่สอง และแอนติบอดี IgG จะตรวจพบได้ วันที่ 7 หลังมีไข้^(2, 6, 8)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะแพทย์ของโรงพยาบาลชุมแพ จ.ขอนแก่น อาจารย์ยง ภู่วรรณ และคณะเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ศณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์งานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักโรคติดต่อฯ โดยแมลง รายงานประจำปี 2550 กรมควบคุมโรค หน้า 87-94
2. อนันต์ นิสาลักษณ์ บทที่ 7 การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ในไขเลือดออกเด็งกี ไวรัสวิทยา พยธิ กำเนิดจากกลไกภูมิคุ้มกัน การวินิจฉัย วัคซีน การป้องกัน และการควบคุม สมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย) ปี 2549 หน้า 173-174
3. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, et al. Evaluation of an Enzyme Immunoassay for detection of Dengue Virus NS1 Antigen in Human Serum. Clin Vaccine Immunol, 2006; 13 (11): 1185-1189.
4. Dussart P, Pertit L, Labeau B, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue Virus infection using NS1 antigen detection in Human Serum. PLOS neglected Tropical Diseases 2008; 2 (8): 1-9.
5. Libraty DH, Endy TP, Houn H, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. J Infect Dis 2002; 185: 1213-1221.
6. Shu PY, Chen LK, Chang SF, et al. Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G Enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test . J Clin Microbiol 2002; 40:

- 1840-1844.
7. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, and Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type I nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 376-381.
 8. Shu PY, Chen LK, Chang SF, et al. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 10: 642-650.
 9. Blacksell SD, Mammen MP Jr, Thongpaseuth S, et al. Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural I antigen detection and immunoglobulin M antibody Enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute infections in Laos. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 43-49
 10. Blacksell SD, Newton PN, Bell D, et al. The comparative accuracy of 8 commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection. *CID* 2006; 41: 1127-1134.
 11. Lam SK and Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produce during dengue infection. *Clinical and Diagnostic Virology*; 1998, 10, 75-81
 12. Vajpayee M, Singh UB, Seth P and Broor S. Comparative evaluation of various commercial assays for diagnosis of dengue fever, Southeast Asian *J Trop Med Public Health* 2001;32(3): 472-475.
 13. Mui Wang S and Devi Sekaran S. Early Diagnosis of Dengue Infection Using a Commercial Dengue Duo Rapid Test Kit for the Detection of NS1, IgM, and IgG. *Am J Trop Med Hyg* 2010, 83(3), 2010, pp. 690-695
 14. Osolio L, Ramires M, Bonelo A, Villar LA and Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol Journal* 2010, 7: 361-382