



การประเมินชุดตรวจสำเร็จรูป Active Melioidosis Detect™ Rapid Test เพื่อการวินิจฉัยโรคmelioidosisอย่างรวดเร็ว

นวลจันทร์ พลเสนา^{1,2} ศศิประภา วัฒนวิเศษ³ ปรีชา หอมจำปา^{4*} ศรีวิไล วโรภาสตระกูล⁴ และธนกร ปรงวิทยา⁴

Received: November 12, 2017

Revised: December 16, 2017

Accepted: December 21, 2017

บทคัดย่อ

melioidosis เป็นโรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งพบแพร่กระจายทั่วไปในดินและน้ำนิ่ง การติดเชื้อในกระแสเลือดเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิต วิธีเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคmelioidosis แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน 3-5 วัน กว่าจะทราบผลการตรวจ จุดประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อประเมินชุดตรวจสำเร็จรูป Active Melioidosis Detect™ Rapid Test ซึ่งใช้หลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟี (immunochromatography) สำหรับตรวจหาสารแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ (capsular polysaccharide) ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อช่วยวินิจฉัยโรคmelioidosis แบบรวดเร็ว เทียบกับวิธีเพาะเชื้อ โดยตรวจจากซีรัมโดยตรงและซีรัมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K จากตัวอย่างผู้ป่วยmelioidosis จำนวน 51 ราย และจากผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่melioidosis จำนวน 49 ราย พบว่าชุดตรวจสำเร็จรูป ที่ตรวจจากซีรัมโดยตรงและซีรัมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K มีความไว 21.57% และ 68.63% ตามลำดับ ในขณะที่มีความจำเพาะ 98.18% เท่ากัน โดยมีค่าความสอดคล้องเมื่อเทียบกับผลการเพาะเชื้อที่ระดับพอใช้ ($K = 0.21$) และระดับมาก ($K = 0.68$) เมื่อตรวจตรวจจากซีรัมโดยตรงและจากซีรัมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ชุดตรวจสำเร็จรูป Active Melioidosis Detect™ Rapid Test มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ตรวจเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคmelioidosis ได้ดี ถ้านำมาใช้ตรวจในซีรัมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ทำลายโปรตีนเช่น proteinase K

คำสำคัญ: melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, แคปซูลโพลีแซคคาไรด์

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

² กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลสมเด็จพระยุพราชกระนวน จังหวัดขอนแก่น 40170

³ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40000

⁴ กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและเวชศาสตร์การบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*ผู้รับผิดชอบบทความ



Evaluation of the Active Melioidosis Detect™ Rapid Test for the rapid diagnosis of melioidosis

Nualchan Polsena^{1,2}, Sasiprapa Wattanavises³, Preecha Homchampa^{4*}, Srivilai Waropastrakul⁴ and Tanakorn Proungvitaya⁴

Abstract

Melioidosis is a severe infectious disease caused by *Burkholderia pseudomallei*. The organism is commonly found in soil and stagnant water. Septicemic form of melioidosis is a life-threatening infection. Isolation of *B. pseudomallei* from clinical specimens is the gold standard for the diagnosis of melioidosis. The drawback is that culture is time-consuming and can take 3-5 days before results can be obtained. This study aims to evaluate the Active Melioidosis Detect™ Rapid Test based on the principle of immunochromatography to detect capsular polysaccharide (CPS) produced and secreted by the *B. pseudomallei* using sera from melioidosis (N=51) and non-melioidosis patients (N=49). The Rapid Test was performed on both the direct or untreated sera and sera pretreated with proteinase K. The results showed that the sensitivity of the Rapid Test on untreated sera and sera pretreated with proteinase K enzyme was 21.57% and 68.63%, respectively, while the specificity was 98.18% for both type of sera. Compared with the culture method, the agreement level was fair (K = 0.21) for untreated sera and substantial (K = 0.68) for pretreated sera, indicating the Active Melioidosis Detect™ Rapid Test has potential for laboratory diagnosis of melioidosis when pretreated sera are used.

Keywords: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, Capsular polysaccharide

¹Master degree student, Medical Technology Program, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

²Division of Medical Technology, Kranuan Crown Prince Hospital, Khon Kaen province

³Division of Medical Technology, Khon Kaen Hospital, Khon Kaen province

⁴Division of Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

*Corresponding author: (e-mail: preecha@kku.ac.th)

บทนำ

melioidosis เป็นโรคติดเชื้อรุนแรงที่เกิดจากการได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* โรคนี้จัดเป็นโรคประจำถิ่นของประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย เชื้อ *B. pseudomallei* พบมากในดินและน้ำนิ่ง โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทย^(1,2) จากการศึกษาของ Limmathurotsakul D. และคณะ⁽¹⁾ ซึ่งทำการศึกษาที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบอัตราป่วย 12.7 ต่อแสนประชากร และจากข้อมูลทางระบาดวิทยาจังหวัดขอนแก่น รายงานเฝ้าระวัง (รง.506)⁽³⁾ ของสำนักงานสาธารณสุขจังหวัดขอนแก่นมีรายงานอัตราป่วย 3.74 ต่อแสนประชากร อาการทางคลินิกของโรค melioidosis มีความหลากหลายมากและแตกต่างกัน ตั้งแต่ติดเชื้อเฉียบพลันจนถึงเรื้อรัง ตลอดจนมีการติดเชื้อแฝง ซึ่งเชื้อสามารถก่อโรคได้หลายอวัยวะโดยปอดเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบมากที่สุด⁽⁴⁾ การเกิดฝีในปอด ปอดบวม และการแพร่กระจายของเชื้อเข้าในกระแสเลือดซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญของการเสียชีวิต มักจะเกิดขึ้นในช่วงสองสามวันแรกหลังติดเชื้อ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีรายงานอัตราการตายมากกว่า 40% (35% ในเด็ก)⁽¹⁾ และเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตลำดับที่สามารถรองจากการติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV) และการติดเชื้อวัณโรค⁽¹⁾ การวินิจฉัยโรคอย่างรวดเร็วและได้รับยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมจะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยลงได้ ปัจจุบันการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างทางคลินิกถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับวินิจฉัย melioidosis แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน อาจถึง 3-5 วัน และสามารถให้ผลลบได้ถ้ามีปริมาณเชื้อน้อยมาก แม้จะมีความจำเพาะ 100% แต่มีความไวเพียง 60%⁽⁵⁾ ในขณะที่วิธีทางภูมิคุ้มกันที่ใช้ในปัจจุบันเช่น วิธี Immunofluorescence assay (IFA) ซึ่งใช้ตรวจหาแอนติเจน มีความจำเพาะ 99.8% มีความไว 48.4%⁽⁶⁾ แต่มีอุปสรรคคือ จำเป็นต้องมีกล้องฟลูออเรสเซนซ์ และบุคลากรที่มีทักษะซึ่งอาจจะไม่พร้อม

ในพื้นที่ชนบท ส่วนวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) ที่ใช้กันมากที่สุดเป็นการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *B. pseudomallei* แต่มีความไวเพียง 56%⁽⁷⁾ และมีปัญหาในเรื่องความจำเพาะเนื่องจากในพื้นที่แพร่ระบาดของโรคสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้ในโตเตอร์ที่สูงในบุคคลที่มีสุขภาพดี ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการสัมผัสเชื้อในสิ่งแวดล้อม แม้ว่าการตรวจทางภูมิคุ้มกันจะสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ โดยเฉพาะเมื่อตรวจโดยใช้ซีรัมคู่ (paired sera) การตรวจทางภูมิคุ้มกันก็จะให้ผลการวินิจฉัยที่ล่าช้า เพราะต้องรอจนกว่าผู้ป่วยจะสร้างแอนติบอดี ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจที่สามารถตรวจหาตัวเชื้อหรือองค์ประกอบจากตัวเชื้อจะสามารถทำให้ตรวจได้เร็ว นำไปสู่การวินิจฉัยโรคและเริ่มการรักษาได้ทันท่วงที ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจที่ทำให้สามารถตรวจหาแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ (capsular polysaccharide; CPS) ที่ผลิตโดยเชื้อ *B. pseudomallei* และปล่อยเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งจากการศึกษาในเบื้องต้นของ Raymond L. และคณะ⁽⁸⁾ พบว่าสามารถตรวจแคปซูลโพลีแซคคาไรด์ ได้ที่ระดับ 0.2 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยใช้ชุดตรวจ Active Melioidosis Detect™ Rapid Test และเมื่อทดสอบกับโคลนของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าให้ผลบวก 98.7% และทดสอบกับเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงกันให้ลบ 97.2% ผลการศึกษาเบื้องต้นดังกล่าว ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ ที่จะทำให้สามารถวินิจฉัยโรค melioidosis ได้เร็วขึ้น

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะประเมินชุดตรวจสำเร็จรูปที่เรียก Active Melioidosis Detect™ Rapid Test (InBios International, USA) และศึกษาวิธีการเตรียมตัวอย่างด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนนำมาตรวจเพื่อเพิ่มความไวของชุดตรวจสำเร็จรูป ซึ่งชุดตรวจสำเร็จรูปนี้อาศัยหลักการของอิมมูโนโครมาโตกราฟี ทำให้สามารถตรวจได้รวดเร็ว เพื่อประกอบการพิจารณาเลือกวิธีทดสอบสำหรับการวินิจฉัยโรค melioidosis ของโรงพยาบาลชุมชนซึ่งขาดเครื่องมือที่ทันสมัย

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาได้ 50 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลขอนแก่นระหว่างเดือนพฤษภาคม 2558 ถึงเดือนพฤษภาคม 2559 ได้แก่ซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดที่ผลเพาะเชื้อด้วยเครื่องอัตโนมัติ BacT/ALERT® 3D (BioMérieux, Lyon, France) พบเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 51 ราย และเป็นซีรัมจากเลือดที่เจาะวันเดียวกันกับที่เจาะเพาะเชื้อในเลือด ซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้ออื่นๆ จำนวน 26 ราย และซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วยที่ให้ผลเพาะเชื้อเป็นลบจำนวน 23 ราย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ โรงพยาบาลขอนแก่น เมื่อวันที่ 29 พฤษภาคม 2558 โดยมีเอกสารรับรองเลขที่ KE58044

2. วิธีดำเนินการวิจัย

ชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้แก่ Active Melioidosis Detect™ Rapid Test (InBios International, Inc., Washington, USA.)⁽⁹⁾ ซึ่งเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการของวิธี อิมมูโนโครมาโตกราฟี เพื่อใช้ตรวจหาสาร capsular polysaccharide (CPS) ซึ่งสร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* การศึกษาจะทำโดยนำชุดตรวจดังกล่าวมาตรวจหาสาร CPS ในซีรัมจากกลุ่มผู้ป่วย โดยตรวจทั้งซีรัมโดยตรงที่ไม่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ และซีรัมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K โดยปฏิบัติตามเอกสารกำกับชุดตรวจสำเร็จรูปคือเติมซีรัม 35 ไมโครลิตรลงไปที่บริเวณเติมตัวอย่างของแผ่นทดสอบ (test strip) จากนั้นนำด้านที่เติมซีรัมของแผ่นทดสอบจุ่มลงในหลอด microfuge ที่เติมบัฟเฟอร์ไว้แล้ว 3 หยด จับเวลา 15 นาที จึงอ่านผลการทดสอบ และนำผลที่ได้มาประเมินเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ

3. การเตรียมซีรัมที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

เติมน้ำยา proteinase K ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในซีรัมปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอด microfuge และนำไปอุ่นที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปต้มที่

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยก supernatant ไปใช้ทดสอบ

4. การเตรียม capsular polysaccharide

นำ 1 โคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงบน blood agar ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง มาเติมลงใน lysis buffer (ซึ่งมากับชุดตรวจสำเร็จรูป) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อเชื้อแตกสลายดีแล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูกรอง 0.2 ไมโครเมตรที่ปราศจากเชื้อ สารละลายที่กรองแล้วซึ่งมีสาร CPS จะใช้เป็นตัวควบคุมบวกของการตรวจ

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินความสอดคล้องกัน (agreement) ระหว่างวิธีการตรวจวิเคราะห์ 2 วิธี คือวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟี และวิธีเพาะเชื้อในเลือดโดยใช้สถิติ Cohen's kappa (K)⁽¹⁰⁾ โดยถ้า K มีค่าตั้งแต่ 0.00-0.20 ถือว่ามีความสอดคล้องกันเล็กน้อย (slight) ถ้า K มีค่าตั้งแต่ 0.21-0.40 ถือว่ามีความสอดคล้องกันพอใช้ (fair) ถ้า K มีค่าตั้งแต่ 0.41-0.60 ถือว่ามีความสอดคล้องกันปานกลาง (moderate) ถ้า K มีค่าตั้งแต่ 0.61-0.80 ถือว่ามีความสอดคล้องกันมาก (substantial) ถ้า K มีค่ามากกว่า 0.80 แต่ไม่ถึง 1 ถือว่ามีความสอดคล้องกันเกือบสมบูรณ์แบบ (almost perfect) และถ้า K มีค่าเท่ากับ 1 ถือว่ามีความสอดคล้องกันอย่างสมบูรณ์ แบบ ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป STATA version 10 โดยกำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลการศึกษา

เมื่อนำชุดตรวจสำเร็จรูปมาใช้ตรวจหาสาร CPS จากซีรัมที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K พบว่าซีรัมจากผู้ป่วยที่ผลเพาะเชื้อในเลือดตรวจพบ *B. pseudomallei* จำนวน 51 ราย ให้ผลบวกเพียง 11 ราย ความไวของการทดสอบ 21.57% และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า K = 0.21 โดยค่า 95% CI เท่ากับ 0.096-0.329 ซึ่งถือว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันพอใช้ (ตารางที่ 1)

ผลตรวจจากซีรัมที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K จากกลุ่มผู้ป่วยที่ผลเพาะเชื้อในเลือดพบเชื้ออื่นๆ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* 4 ราย *Acinetobacter baumannii* 4 ราย *Klebsiella pneumoniae* 6 ราย *Escherichia coli* 6 ราย *Enterobacter cloacae* 2 ราย *Staphylococcus aureus* 2 ราย *Streptococcus pneumoniae* 2 ราย และผู้ป่วยที่ผลเพาะเชื้อเป็นลบ จำนวน 23 ราย รวมทั้งซีรัมตัวอย่างเพื่อการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอกสำหรับโรค Leptospirosis และโรค Scrub typhus ชนิดละ 3 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกด้วยวิธี Immunofluorescence Assay (IFA) พบว่า ให้ผลลบทั้งหมด ยกเว้นซีรัมตัวอย่างสำหรับโรค Scrub typhus 1 ตัวอย่างให้ผลบวกอย่างอ่อน (weakly positive) (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจด้วยชุดสำเร็จรูปในซีรัมจากกลุ่มตัวอย่างเดิมทั้ง 3 กลุ่ม หลังผ่านจากย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K พบว่ากลุ่มที่ผลเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากเดิมบวก 11 ราย เพิ่มขึ้นเป็น 35 ราย ความไวของการทดสอบ 68.63% จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีค่า $K = 0.68$ โดยมีค่า 95% CI เท่ากับ 0.546-0.817 ซึ่งถือว่าทั้ง 2 วิธี มีความสอดคล้องกันมาก ส่วนซีรัมจากกลุ่มตัวอย่างอีก 2 กลุ่มให้ผลลบเช่นเดิม ทั้งนี้ตัวอย่างจากโรค Scrub typhus 1 ตัวอย่างที่เคยให้ผลบวกอย่างอ่อนยังให้ผลบวกอย่างอ่อนเช่นเดิม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหา CPS ด้วยวิธีอิมมูโนโครมาโตกราฟีในซีรัมที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K เทียบกับวิธีเพาะเชื้อในเลือด

ชุดตรวจสำเร็จรูป	วิธีเพาะเชื้อในเลือด		
	ผลบวก	ผลลบ	รวม
ผลบวก	11	0	11
ผลลบ	40	49	89
รวม	51	49	100

ความไว (%) = $\frac{\text{จำนวนบวกจริง}}{\text{จำนวนบวกจริง} + \text{จำนวนลบปลอม}} \times 100 = \frac{11}{11 + 40} \times 100 = 21.57\%$ Kappa (K) = 0.21

ตารางที่ 2 ความจำเพาะของการตรวจหา CPS ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูปในซีรัมผู้ป่วยติดเชื้ออื่นๆ

กลุ่มตัวอย่าง (n)	ให้ผลลบ (ความจำเพาะร้อยละ)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	4 (100)
<i>Acinetobacter baumannii</i> (4)	4 (100)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (6)	6 (100)
<i>Escherichia coli</i> (6)	6 (100)
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	2 (100)
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	2 (100)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (2)	2 (100)
Leptospirosis ^a (3)	3 (100)
Scrub typhus ^a (3)	2 (66.67)
Hemoculture no growth (23)	23 (100)
รวม (55)	54 (98.18)

^a ซีรัมจากการทดสอบความชำนาญทางห้องปฏิบัติการโดยองค์การภายนอก (EQA)

ความจำเพาะ (%) = จำนวนลบจริง/(จำนวนลบจริง + จำนวนบวกปลอม) × 100 = 54/(54 + 1) × 100 = 98.18%

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหา CPS หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K

ชุดตรวจสำเร็จรูป	วิธีเพาะเชื้อในเลือด		
	ผลบวก	ผลลบ	รวม
ผลบวก	35	0	35
ผลลบ	16	49	65
รวม	51	49	100

ความไว (%) = จำนวนบวกจริง/(จำนวนบวกจริง + จำนวนลบปลอม) × 100 = 35/(35 + 16) × 100 = 68.63% Kappa (K) = 0.68

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosis โดยวิธี IHA ที่ใช้กันแพร่หลายในโรงพยาบาลชุมชนนั้น มีข้อจำกัดเพราะในพื้นที่ระบาดประชากรส่วนใหญ่มีภูมิคุ้มกันอยู่แล้วในระดับที่มากน้อยแตกต่างกันไป ทำให้ขาดความจำเพาะในการวินิจฉัย ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาชุดตรวจที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยเฉพาะชุดตรวจที่สามารถตรวจได้เร็ว ให้ผลการวินิจฉัยที่แม่นยำ ดังนั้นการพัฒนาชุดตรวจ จึงมุ่งไปที่การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อโดยตรง ด้วยหลักการที่ง่าย ให้ผลเร็ว แผลผลง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพง สามารถใช้ได้ ในโรงพยาบาลชุมชน ชุดตรวจสำเร็จรูป Active Melioidosis DetectTM Rapid Test ที่แสดงในรายงานวิจัยของ Raymond L. และคณะ⁽⁸⁾ มีศักยภาพที่ดีมาก แต่ยังขาดผลการประเมินชุดตรวจในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดของโรคว่ามีประสิทธิภาพเพียงใด ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ว่า หากใช้ชุดตรวจตามเอกสารกำกับชุดทดสอบซึ่งไม่ได้ระบุว่าจะต้องใช้ซีรัมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เมื่อใช้ตรวจกับซีรัมโดยตรงจะให้ความไวเพียง 21.57% ความจำเพาะ 98.18% และมีความสอดคล้องกับผลการเพาะเชื้อระดับพอใช้ ($K = 0.21$) เท่านั้น ซึ่งความไวที่พบไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Robertson G และคณะ ปี 2015⁽¹¹⁾ ที่ตรวจจากซีรัมโดยตรง ความไวเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษาของ Robertson G และคณะ อยู่ที่ 40% ซึ่งสูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นผลเนื่องจากการออกแบบการวิจัยที่ต่างกันโดยเขาศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการเจาะเลือดแบ่งเป็นสามช่วงคือ ก่อน วันเดียวกัน และหลัง ผลเพาะเชื้อในเลือดพบเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนซีรัมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เจาะจากผู้ป่วยในวันเดียวกันกับที่เจาะเพาะเชื้อ ซึ่งการที่ตรวจไม่พบ CPS แอนติเจนอาจเกิดจากปริมาณแอนติบอดีจำเพาะที่มีอยู่ของแต่ละคนที่สามารถไปจับเป็นคอมเพล็กซ์กับ CPS ที่ถูกหลั่งออกมาจนหมด ซึ่ง CPS ในรูปที่เป็นคอมเพล็กซ์จะไม่สามารถตรวจพบได้จากซีรัมโดยตรง ด้วยหลักการของชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suttisunhakul V และคณะในปี 2015⁽¹²⁾ ที่ได้ทำการศึกษาประเมินชุดตรวจวิธี Latex agglutination

assay วิเคราะห์แอนติบอดีต่อ O-polysaccharide (OPS) และ capsular polysaccharide (CPS) ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างผู้ป่วยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผู้บริจาคโลหิตในเขตพื้นที่ระบาดและนอกเขตพื้นที่ระบาด พบว่า OPS-latex และ CPS-latex มีความไว 84.4% และ 69.5% ตามลำดับ มีความจำเพาะ 56.9% และ 63.8% ตามลำดับ ในพื้นที่ระบาดส่วนนอกเขตพื้นที่ระบาดพบว่ามี ความจำเพาะสูงคือ 97.8% เท่ากัน และในปี 2016 Suttisunhakul V และคณะ⁽¹³⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจ ELISA เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ *B. pseudomallei* พบว่า CPS-ELISA มีความจำเพาะ 85.6% เพราะให้ผลบวกได้กับ เลือดผู้บริจาคโลหิตสุขภาพดี

การศึกษาพบความจำเพาะ 98.18% เนื่องจากให้ผลบวกตรงกับผู้ป่วย Scrub typhus ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Blacksell SD และคณะ ปี 2010⁽¹¹⁾ ที่ศึกษาพบว่าแอนติบอดีชนิด IgG ต่อ *Orientia tsutsugamushi* ให้ผลบวกตรงกับผู้ป่วยโรคmelioidosis และการศึกษาของ Silpasakorn S และคณะ ปี 2012⁽¹⁴⁾ พบว่า แอนติบอดีชนิด IgM ให้ผลบวกตรงกับผู้ป่วยmelioidosis ได้เช่นกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกในการตรวจจากซีรัมโดยตรง 11 ราย พบว่ามีการเพาะเชื้อในเลือดที่เชื้อเจริญใน 24 ชั่วโมง 6 ราย 48 ชั่วโมง 4 ราย และ 72 ชั่วโมง 1 ราย ซึ่งบ่งชี้ว่าน่าจะมีเชื้อในกระแสเลือดมาก จึงสร้าง CPS ได้มากพอให้ตรวจพบได้ ทั้งนี้พบว่ามี 3 รายที่มีผลการตรวจ IHA พบได้แต่แตกต่างกันคือ 80, 2560 และ 5120 แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจพบนั้น อาจจะไม่มีความสัมพันธ์โดยตรง ไม่สามารถนำมาทำนายผลการตรวจหา CPS แอนติเจนได้

ผลการตรวจหา CPS แอนติเจนในซีรัมให้ผลเป็นลบขณะที่ผลเพาะเชื้อในเลือดพบเชื้อ *B. pseudomallei* แม้จะเจาะเลือดในวันเดียวกันอาจเป็นเพราะการเพาะเชื้อนั้นมีข้อที่ได้เปรียบโดยเป็นวิธีการบ่มเชื้อที่มีจำนวนน้อย ให้เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณที่มากพอที่จะตรวจพบได้ ส่วนชุดตรวจสำเร็จรูปโรคmelioidosis แบบรวดเร็ว นั้นเป็นการตรวจหาปริมาณ CPS ที่ถูกหลั่งออกมา ณ เวลาที่ทำการ

ตรวจซึ่งอาจจะยังมีปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chantratita N และคณะในปี 2015⁽¹⁶⁾ ซึ่งได้ทำการศึกษาประเมินการตรวจวินิจฉัยโรคmelioidosisด้วย 16S rRNA Real-time PCR Assay โดยศึกษาในตัวอย่างที่วินิจฉัยว่าติดเชื้อในกระแสเลือดโดยวิธีเพาะเชื้อ พบว่าเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR มีความไวเพียง 25% ซึ่งเมื่อนำไปนับจำนวนเชื้อ (colony forming units/mL) ในเลือดพบว่า PCR ให้ผลบวกเมื่อมีเชื้อมากกว่า 2.4 CFU/mL

จากเหตุผลที่ตรวจไม่พบ CPS แอนติเจนได้จากซีรัมโดยตรง การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเอนไซม์ proteinase K มาใช้ในการแยกแอนติบอดีออกจาก CPS แอนติเจนก่อนการทดสอบเพื่อลดการรบกวนของแอนติบอดีพบว่ามีผลเพิ่มความไวเพิ่มขึ้นเป็น 68.63% ทำให้ผลการตรวจมีความสอดคล้องกับวิธีเพาะเชื้อในระดับมาก ($K = 0.68$) ซึ่งเพิ่มโอกาสในการตรวจวินิจฉัยได้ดีขึ้น เพราะประชากรในเขตขอนแก่นนั้นอยู่ในพื้นที่ระบาดของเชื้อ และพบเชื้อได้ทั่วไปในดินและน้ำ ประกอบกับประชากรมีวิถีชีวิตที่มีโอกาสสัมผัสเชื้อได้ง่าย จึงเป็นสาเหตุให้มีการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีอยู่แล้วในระดับหนึ่ง เมื่อได้รับเชื้ออีกครั้งจึงสามารถสร้างแอนติบอดีปริมาณมาก ทำให้รบกวนการตรวจหา CPS ซึ่งข้อมูลการตรวจ IHA ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกหลังใช้เอนไซม์ย่อยแอนติบอดีในคอมเพล็กซ์เพื่อให้เหลือเฉพาะ CPS อิสระ มีไเตอร์หลากหลายคือ 80, 320, 640, 1,280, 5,120 และ 20,480 แสดงให้เห็นว่าปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจพบนั้น มีในสัดส่วนที่ไม่มีความสัมพันธ์กับโอกาสที่จะตรวจเจอ CPS ในผู้ป่วย นอกจากนี้การตรวจที่ยังให้ผลลบถึงแม้ว่าจะทำการย่อยคอมเพล็กซ์ในซีรัมด้วยเอนไซม์แล้วก็ตาม อาจเป็นเพราะมี CPS แอนติเจนน้อยมากหรืออาจเนื่องจากติดเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง CPS ทำให้ไม่สร้าง CPS หรือสร้าง CPS ที่มีโครงสร้างต่างไปจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะที่ใช้ในชุดตรวจซึ่งจำเพาะกับ CPS ปกติ ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าชุดตรวจสำเร็จรูปนี้ เมื่อนำมาตรวจในซีรัมที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ทำลายโปรตีน เช่น proteinase K มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ช่วยวินิจฉัยโรค

melioidosis ได้ดี โดยเฉพาะเมื่อนำมาใช้เสริมการวินิจฉัยร่วมกับการตรวจอย่างอื่น เช่นการเพาะเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา คณะเทคนิคการแพทย์ และทุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างและใช้ข้อมูลเพื่อการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, *et al.* Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82: 1113-7.
2. Currie BJ, Ward L, Cheng AC. The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year Darwin prospective study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4: e900.
3. Geographic Information System for surveillance in epidemiology of infectious disease (SR 506). Department of disease control. Khon Kaen public health organization; 2014
4. Currie BJ. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. *Eur Respir J.* 2003; 22: 542-50.
5. Limathurotsakul D, Jansen K, Arayawichanon A, Simpson JA, White LJ, Lee SJ, *et al.* Defining the true sensitivity of culture for the diagnosis of melioidosis using Bayesian latent class models. *PLoS One.* 2010; 5: e12485.

6. Tandhavanant S, Wongsuvan G, Wuthiekanun V, Teerawattanasok N, Day NP, Limathurotsakul D, *et al.* Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 89: 165-8.
7. Cheng AC, O'Brien M, Freeman K, Lum G, Currie BJ. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in Northern Australia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74: 330-4.
8. Houghton RL, Reed DE, Hubbard MA, Dillon MJ, Chen H, Currie BJ, *et al.* Development of a prototype lateral flow immunoassay (LFI) for the rapid diagnosis of melioidosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2727.
9. Leaflet Immunochromatography assay for detection of Capsular polysaccharide: Active Melioidosis *DetectTM* Rapid Test: AMD. 2013.
10. Watson PF, Petrie A. Method agreement analysis: A review of correct methodology. *Theriogenology.* 2010; 73: 1167-79.
11. Robertson G, Sorenson A, Govan B, Kethesasan N, Houghton R, Chen H, *et al.* Rapid diagnostics for melioidosis: a comparative study of a novel lateral flow antigen detection assay. *J Med Microbiol.* 2015; 64: 845-8.
12. Suttisunhakul V, Chantratita N, Wikraiphat C, Wuthiekanun V, Douglas Z, Day NP, *et al.* Evaluation of polysaccharide-based latex agglutination assays for the rapid detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 93: 542-6.
13. Suttisunhakul V, Wuthiekanun V, Brett PJ, Khusmith S, Day NP, Burtnick MN, *et al.* Development of rapid enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 1259-68.
14. Blacksell SD, Jenjaroen K, Phetsouvanh R, Wuthiekanun V, Day NP, Newton PN, *et al.* Accuracy of AccessBio immunoglobulin M and total antibody rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute scrub typhus infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 263-6.
15. Silpasakorn S, Srisamut N, Ekpo P, Zhang Z, Chao CC, Ching WM, *et al.* Development of new, broadly reactive, rapid IgG and IgM lateral flow assays for diagnosis of scrub typhus. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 148-52.
16. Chantratita N, Wuthiekanun V, Limathurotsakul D, Thanwisai A, Chantatita W, Day NP, *et al.* Prospective clinical evaluation of the accuracy of 16S rRNA real-time PCR assay for the diagnosis of melioidosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 814-7.