

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียซูบโดมาลีไอ ในตัวอย่างเลือดผู้ป่วยซึ่งมีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดด้วยวิธี conventional PCR และ real-time PCR

วิศนสนีย์ แก้วเพ็ญ^{1*}, ชลธิดา สุภาพรม², วัฒนชัย สุแสงรัตน³, ชาญวิทย์ สีสายวัฒน์², กาญจนา เลิศมิ่งมงคลชัย²

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติต่ออวัยวะหลายส่วนของร่างกาย โดยเฉพาะการติดเชื้อในกระแสเลือดที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต การตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพจะช่วยลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้ การศึกษานี้ใช้วิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* และวิธี real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA primers เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยจำนวน 32 รายที่มีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด และเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลขอนแก่นและโรงพยาบาลในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยในจำนวนนี้เป็นเชื้อ *B. pseudomallei* จำนวน 19 ราย เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นจำนวน 13 ราย ได้แก่ *Burkholderia cepacia* 1 ราย, *Escherichia coli* 1 ราย, *Klebsiella pneumoniae* 4 ราย, 1 ราย, *Staphylococcus aureus* 3 ราย, *Streptococcus pneumoniae* 1 ราย และ group A *Streptococcus* 2 ราย ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี conventional PCR พบว่ามีค่า ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวกและค่าทำนายผลลบ เป็นร้อยละ 37 (95% CI:15-59), 92 (95% CI:78-100), 88 (95% CI: 65-100) และ 50 (95% CI:30-70) ตามลำดับ เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR พบว่ามีค่าความไวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 63 (95% CI: 41-85) และค่าความจำเพาะลดลงเป็นร้อยละ 69 (95% CI: 44-94) โดยมีค่าทำนายผลบวกร้อยละ 75 (95% CI: 54-96) และค่าทำนายผลลบร้อยละ 56 (95% CI: 32-81) เมื่อทำการทดสอบในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* และเสียชีวิตจำนวน 5 รายพบว่าวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR มีค่าความไวสูงขึ้นเป็นร้อยละ 80 (95% CI: 45-100) และ 100 (95% CI: 100-100) ตามลำดับ โดยวิธี conventional PCR สามารถตรวจพบ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดเมื่อมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 10^3 cfu / ml ซึ่งวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR สามารถตรวจพบปริมาณ DNA ของเชื้อต่ำสุด 10 pg และ 50 fg ต่อปฏิกิริยา PCR ตามลำดับ วิธี real-time PCR มีความไวในการตรวจพบ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดสูงกว่าจึงน่าจะเหมาะสำหรับการใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดเบื้องต้น ในขณะที่วิธี conventional PCR มีค่าความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกสูงกว่าจึงน่าจะใช้สำหรับเป็นวิธีตรวจยืนยันการติดเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน น่าจะสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง เป็นการลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง รวมทั้งการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากโรคmelioidosis

คำสำคัญ: ฟิซีอาร์, แบคทีเรียซูบโดมาลีไอ, การติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด

¹ กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ กลุ่มงานอายุรกรรม โรงพยาบาลขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in whole blood samples of bacterial septicemia patients using conventional PCR and real-time PCR

Wisansanee Thaewpia^{1*}, Chonthida Supaprom², Wattanachai Susaengrat³, Chanvit Leelayuwat²,
Ganjana Lertmemongkolchai²

Abstract

Burkholderia pseudomallei is a bacterium that causes a disease known as melioidosis. Infections of *B. pseudomallei* appear in several organs including acute septicemia which showed high mortality rate. The rapid and high efficient diagnostic test may reduce the mortality rate of melioidosis patients. We performed conventional PCR using LPS primers and real-time PCR using 16S rDNA primers for detection of *B. pseudomallei* in clinical blood specimens. Bacterial culture was used as a gold standard. Blood specimens from 32 suspected bacterial septicemia patients were obtained from admitted patients in Khon Kaen Hospital and other hospitals in the region. These consist of the patients with 19 *B. pseudomallei* and 13 other bacterial infections including 1 *Burkholderia cepacia*, 1 *Escherichia coli*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Enterobacter species*, 3 *Staphylococcus aureus*, 1 *Streptococcus pneumoniae* and 2 group A *Streptococcus*. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were determined. Conventional PCR showed low sensitivity of 37 % (95% CI:15-59) and high specificity of 92 % (95% CI:78-100) with 88 % (95% CI: 65-100) and 50 % (95% CI:30-70) of positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV), respectively. In contrast, a real-time PCR and using of combination test showed higher sensitivity (63 %, 95% CI: 41-85) and lower specificity (69 %, 95% CI: 44-94) with 75 % (95% CI:54-96) and 56 % (95% CI:32-81) of PPV and NPV, respectively. In 5 melioidosis patients who have died, both PCR methods showed rising of sensitivity [80 % (95 % CI: 45-100) and 100 % (95% CI: 100-100)], respectively. The lower detection limit of *B. pseudomallei* by conventional PCR was 10³ cfu/ml. The conventional PCR and real-time PCR could detect *B. pseudomallei* DNA of 10 pg and 50 fg per PCR reaction, respectively. The higher sensitivity of real-time PCR may be useful for early screening test, whereas the conventional PCR with higher specificity and PPV may be used as a confirmatory test for diagnosis of *B. pseudomallei*. Therefore, the two assays may be used in combination as rapid molecular diagnostic for melioidosis which might lead to a reduction in the mortality rate of melioidosis patients.

Keywords: PCR, *Burkholderia pseudomallei*, Bacterial septicemia

¹ Medical Technology Department, Khon Kaen Hospital

² Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen

³ Medicine Department, Khon Kaen Hospital

* Corresponding author: (e-mail: wisansanee@yahoo.com, wisansanee@hotmail.com)

บทนำ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมลบ ซึ่งสามารถแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีหน้าที่จับกินและย่อยทำลายจุลชีพ เช่น แมคโครฟาจ (macrophage) และ polymorphonuclear leukocytes⁽¹⁾ พบได้ในดินและน้ำของภูมิภาคในเขตร้อนโดยพบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อที่เรียกว่า เมลิออยโดซิส (melioidosis) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในกระแสเลือดและเกิดอัตราการป่วยตายสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย⁽²⁾ โดยการติดเชื้อและการแพร่ระบาดของโรคสามารถพบได้ในอัตราสูงในบริเวณที่มีการประกอบอาชีพกสิกรรม⁽³⁾ นอกจากนี้ มีรายงานการตรวจแยกเชื้อจากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทยมีอัตราสูงถึงร้อยละ 20.4 ซึ่งสูงกว่าในภาคเหนือ (ร้อยละ 4.4) ภาคกลาง (ร้อยละ 6.1) และภาคใต้ (ร้อยละ 5.9)⁽⁴⁾

โรค melioidosis ติดต่อกันทางบาดแผลที่ผิวหนังทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร ระยะฟักตัวสามารถพบได้ตั้งแต่ 2-3 วันจนถึงนานหลายเดือน อาการของโรคมีหลายรูปแบบ เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อที่ผิวหนังและเนื้อเยื่ออ่อน การติดเชื้อในอวัยวะภายในต่างๆ และการติดเชื้อในกระแสเลือด ซึ่งผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้ภายใน 48-72 ชั่วโมงหากได้รับการรักษาไม่ทัน การตรวจวินิจฉัยโรค melioidosis ทางห้องปฏิบัติการมีทั้งวิธีการเพาะเชื้อและการตรวจทางซีโรโลยี โดยวิธีการเพาะเชื้อถือเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความน่าเชื่อถือแต่ใช้เวลาหลายวันในการตรวจแยกชนิดของเชื้อรวมทั้งการเพาะแยกเชื้ออาจได้ผลไม่ดัดนักในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพมาก่อน ส่วนการตรวจทางซีโรโลยีที่ใช้อยู่ปัจจุบันในโรงพยาบาลขอนแก่น คือ วิธี indirect hemagglutination antibody test (IHA) มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจทางซีโรโลยีชนิดอื่น เช่น Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) รวมทั้งวิธีการตรวจหาสารดีเอ็นเอของตัวเชื้อด้วย⁽⁵⁾

ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR) สำหรับตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* เพิ่มมากขึ้นโดยตรวจหาฮัยนที่สำคั

หลายชนิด เช่น การตรวจฮัยน 23S rRNA⁽⁶⁾ หรือการตรวจหาฮัยน 16S rRNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยด้วยวิธี nested PCR⁽⁷⁾ และ semi-nested PCR⁽⁸⁾ และมีการพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อฮัยน 16S rRNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากตัวอย่างผู้ป่วย รวมทั้งในตัวอย่างชนิดต่างๆ และเลือดครบของผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค melioidosis⁽⁹⁻¹¹⁾ นอกจากนี้ มีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่แยกได้จากมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมด้วยวิธี multiplex PCR⁽¹²⁾ และใช้ในการตรวจแยกชนิดของเชื้อ *B. pseudomallei*, *B. mallei* และ *B. thailandensis*⁽¹³⁾ รวมทั้งใช้วิธี multiplex PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างของผู้ป่วยด้วย⁽¹⁴⁾ ต่อมามีการพัฒนาวิธี real-time PCR ขึ้น ได้แก่การตรวจหา 16S rDNA⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ และการตรวจ type III secretion system gene (TTS) เพื่อแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ออกจาก *B. mallei* และ *B. thailandensis*⁽¹⁸⁾ รวมทั้งการตรวจแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรค melioidosis⁽¹⁹⁻²²⁾

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้วิธี conventional PCR และ real-time PCR โดยปรับปรุงจากการศึกษาของ Rattanathongkom และคณะ⁽⁹⁾ และ Tomaso และคณะ⁽¹⁵⁾ ตามลำดับ ตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างเลือดครบเพื่อให้สามารถใช้เป็นวิธีวินิจฉัยโรคเบื้องต้นสำหรับการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดของผู้ป่วยได้

วัสดุและวิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการที่ได้ผ่านการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะกรรมการจริยธรรมโรงพยาบาลขอนแก่น โดยศึกษาตัวอย่างจากผู้ป่วยรับใหม่ไม่เกิน 3 วันที่มีอาการไข้ และสงสัยภาวะการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacterial septicemia) โดยเป็นผู้ใหญ่อายุมากกว่า 14 ปี จำนวน 32 ราย ซึ่งได้รับการรักษาที่โรงพยาบาลขอนแก่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2550 และผู้ป่วยในโรงพยาบาลที่อยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างบางส่วนในการศึกษาของ Suputtamonkol และคณะ⁽²³⁾ โดยมีผลการเพาะแยกเชื้อจากเลือดเป็น *B. pseudomallei* จำนวน 19 ราย และเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จำนวน 13 ราย ได้แก่ *Burkholderia cepacia* 1 ราย, *Escherichia coli* 1 ราย, *Klebsiella pneumoniae* 4 ราย, *Enterobacter species* 1 ราย, *Staphylococcus aureus* 3 ราย, *Streptococcus pneumoniae* 1 ราย และ group A *Streptococcus* 2 ราย

2. ตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดของกลุ่มตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร โดยแบ่งเลือด 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด hemoculture เพื่อส่งเพาะแยกเชื้อ (การเจาะเลือดสำหรับขวดที่ 2 และ 3 ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ โดยเว้นช่วงระยะเวลาห่างกัน 15 นาที) และอีก 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสาร heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง สกัดดีเอ็นเอของเชื้อจาก buffy coat โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Qiagen Blood Mini DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany)

3. Oligonucleotide primers

LPS primers⁽⁹⁾ ได้แก่ LPS 1 (5'-CTCTCAGATTGCTGACAAACCC-3') และ LPS 2 (5'-CGGATGAACTCGAAATCCACCG-3'), 16S rDNA primers⁽¹⁵⁾ ได้แก่ Burk 16S-S (5'-TTCTGGCTAATACCCGGAGT-3'), Burk 16S-R (5'-GCCCAACTCTCATCGGGC-3') และ Burk 16S-TM (FAM-CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT-TAMRA)

4. วิธีการวิเคราะห์

4.1 เพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยด้วยเครื่องอัตโนมัติ และตรวจแยกชนิดของเชื้อโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

4.2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำยา อุณหภูมิและเวลาของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ LPS primers และ 16S rDNA primers ดังนี้

4.2.1 Conventional PCR (เครื่อง PTC 200 Thermal Cycler) ใช้ LPS primers เพิ่มปริมาณส่วนของสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ที่ปรับปรุงจากการศึกษาของ Rattanathongkom

และคณะ ซึ่งได้พัฒนาวิธี PCR และออกแบบ primers จาก specific DNA probe (pKKU-S23L) ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei*⁽⁸⁾ ตรวจดู PCR products ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 3.5 mM MgCl₂, 500 nM LPS1 primer, 500 nM LPS2 primer, 200 μM dNTPs, Taq DNA polymerase 1 unit และ DNA 1 μl โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR ตามลำดับ ดังนี้ 95 °C 5 นาที, 95 °C 15 วินาที, 57 °C 1 นาที, 72 °C 30 วินาทีจำนวน 1 รอบ และ 95 °C 10 วินาที, 95 °C 15 วินาที, 57 °C 1 นาที, 72 °C 30 วินาทีจำนวน 45 รอบ

4.2.2 Real-time PCR ใช้เครื่อง Rotorgene 3000 (Corbett Life Science, Australia) ใช้ 16S rDNA primers เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA และใช้ Taqman probe ในการตรวจ PCR products ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งปรับปรุงจากการศึกษาของ Tomaso และคณะ⁽⁹⁾ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์อ้างอิง K96243 เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการทำ standard curve ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 1000 pg ต่อ 1 ปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 500 nM Burk 16S-S primer, 500 nM Burk 16S-R primer, 500 nM Burk 16S-TM probe, 200 μM dNTPs, Taq DNA polymerase 1 unit และ DNA 1 μl โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR ตามลำดับ ดังนี้ 95 °C 5 นาที, 58 °C 30 วินาที, 72 °C 30 วินาทีจำนวน 1 รอบ และ 95 °C 30 วินาที, 58 °C 30 วินาที, 72 °C 30 วินาทีจำนวน 45 รอบ

4.3 ทดสอบหา detection limit และตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างเลือดด้วยวิธี conventional PCR และ real-time PCR

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

หาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV), ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value, NPV) และ Likelihood ratio (LR) ของวิธี conventional PCR และ real-time PCR โดยเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษา

ผลการศึกษา

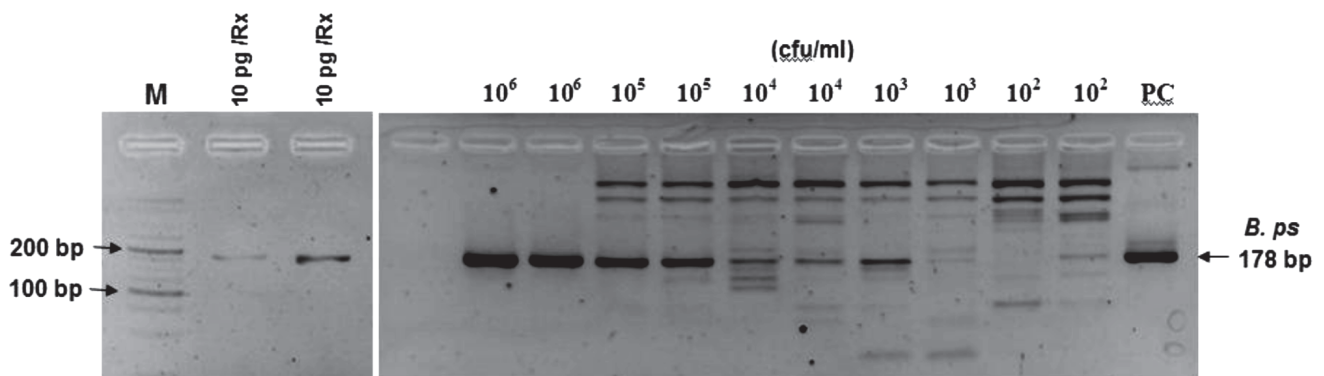
การประเมินคุณภาพของวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่ามีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 37 (95%CI: 15-59) และร้อยละ 63 (95%CI: 41-85) ค่าความจำเพาะเท่ากับร้อยละ 92 (95%CI: 78-100) และร้อยละ 69 (95%CI: 44-94) ค่าทำนายผลบวกเท่ากับร้อยละ 88 (95%CI: 65-100) และร้อยละ 75 (95%CI: 54-96) ค่าทำนายผลลบเท่ากับร้อยละ 50 (95%CI: 30-70) และร้อยละ 56 (95%CI: 32-81) ตามลำดับ โดยมีค่า Positive Likelihood ratio (LR+) เท่ากับ 4.79 (95% CI: 0.67-34.45) และ 2.05 (95% CI: 0.85-4.97) ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงวิธี conventional PCR และ real-time PCR มีโอกาสตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรค melioidosis 4.79 และ 2.05 เท่าของผู้ที่ไม่เป็นโรค ตามลำดับ การวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดโดยใช้ทั้งสอง

วิธีร่วมกัน พบว่ามีค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และ LR+ เช่นเดียวกับการใช้วิธี real-time PCR

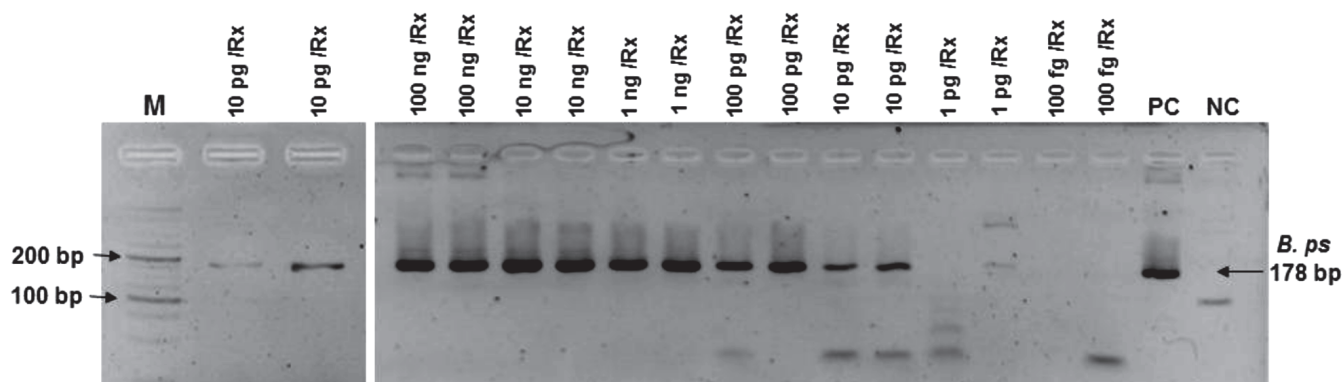
เมื่อประเมินคุณภาพของวิธี conventional PCR และวิธี real time-PCR ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* และเสียชีวิตพบว่ามีค่า ความไวเท่ากับร้อยละ 80 (95% CI: 45-100) และร้อยละ 100 (95% CI: 100-100) ตามลำดับ

Detection limit ของวิธี conventional PCR

จากการเจือจางเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์อ้างอิง K96243 ให้มีจำนวนเชื้อตั้งแต่ 10^2 - 10^6 cfu/ml และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) พบว่าวิธี conventional PCR สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 10^3 cfu/ml (รูปที่ 1) และเมื่อเจือจางดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์อ้างอิง K96243 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 100 fg-100 ng ต่อ 1 ปฏิกริยา และทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าวิธี conventional PCR สามารถตรวจพบปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 pg ต่อ 1 ปฏิกริยา (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 Detection limit ของวิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers ในการตรวจหาดีเอ็นเอ ของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อเจือจางเชื้อเป็น 10^2 - 10^6 cfu/ml M = 500 bp DNA markers PC = Positive control

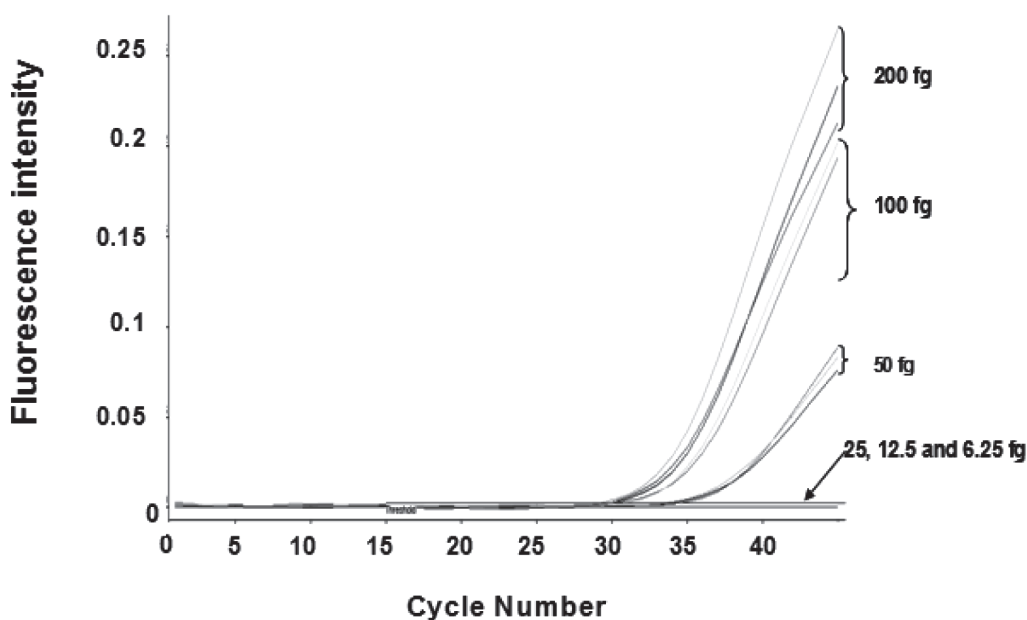


รูปที่ 2 Detection limit ของวิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers ในการตรวจหาดีเอ็นเอ ของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อเจือจางดีเอ็นเอ 100 fg -100 ng ต่อ 1 ปฏิกริยา PCR M = 500 bp DNA markers, PC = Positive control, NC = Negative control

Detection limit ของวิธี real-time PCR

จากการเจือจางดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์อ้างอิง K96243 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6.25-200 fg

ต่อ 1 ปฏิกริยา พบว่าวิธี real-time PCR สามารถตรวจพบปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 fg ต่อ 1 ปฏิกริยา (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 Detection limit ของ วิธี real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA primers ในการตรวจหา ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei*

จากการตรวจวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR โดยทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยรับใหม่ไม่เกิน 3 วัน ที่มีอาการไข้และสงสัยการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดจำนวน 32 ราย โดยเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์กับวิธีการเพาะแยกเชื้อจากเลือด ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี

PCR ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดจำนวน 19 ราย และติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นในกระแสเลือดจำนวน 13 ราย พบว่าวิธี conventional PCR ให้ผลบวกปลอม จำนวน 1 ราย และให้ผลลบปลอมจำนวน 12 ราย และวิธี real-time PCR ให้ผลบวกปลอมจำนวน 4 ราย และให้ผลลบปลอมจำนวน 7 ราย (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers และวิธี real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA primers ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดและให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวกจำนวน 19 ราย

No.	Sample ID	Clinical outcome	Conventional PCR ^a	Cycle threshold values of real-time PCR ^a	Combination test
1	BP02	Survived	+	38.09 / 36.08	+
2	BP03	Survived	+	35.32 / 35.06	+
3	BP08	Survived	-	- / -	-
4	BP09	Survived	-	37.77 / 37.37	+
5	BP12	Survived	+	36.31 / 36.42	+
6	BP15	Survived	-	39.2 / 39.54	+
7	BP17	Survived	-	40.41 / 37.94	+
8	BP18	Survived	-	- / -	-
9	BP20	Survived	-	42.98 / 42.84	+
10	BP22	Survived	-	- / -	-
11	BP24	Survived	-	- / -	-
12	BP25	Survived	-	- / -	-
13	BP26	Survived	-	- / -	-
14	BP27	Survived	-	- / -	-
15	BP04	Died	+	30.77 / 31.16	+
16	BP7	Died	+	26.6 / 26.58	+
17	BP14	Died	+	34.39 / 33.75	+
18	BP19	Died	+	36.56 / 36.34	+
19	BP21	Died	-	38.26 / 37.59	+
Sensitivity (%)			37 (7 / 19)	63 (12 / 19)	63 (12 / 19)
Sensitivity of fatal cases (%)			80 (4 / 5)	100 (5 / 5)	100 (5 / 5)

^a Performed in duplicate

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers และวิธี real-time PCR ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมาจากสัตว์ในกระแสดเลือดจำนวน 13 ราย

NO.	Sample ID	Clinical outcome	Culture	Conventional PCR ^a	Cycle threshold values of real-time PCR ^a	Combination test
6	CI12	Died	<i>S. aureus</i>	- / -	- / -	-
12	CI13	Survived	<i>S. aureus</i>	- / -	- / -	-
7	CI14	Survived	<i>S. aureus</i>	- / -	41.09 / 41.51	+
9	CI16	Survived	Group A <i>Strep</i>	- / -	- / -	-
10	CI17	Died	Group A <i>Strep</i>	- / -	- / -	-
8	CI15	Died	<i>S. pneumoniae</i>	- / -	- / -	-
13	CI01	Died	<i>B. cepacia</i>	- / -	- / -	-
2	CI06	Survived	<i>Enterobacter</i> sp.	- / -	38.16 / 39.37	+
1	CI03	Survived	<i>E.coli</i>	- / -	- / -	-
11	CI07	Survived	<i>K. pneumoniae</i>	+ / +	29.80 / 29.46	+
3	CI08	Died	<i>K. pneumoniae</i>	- / -	39.28 / 42.14	+
4	CI09	Survived	<i>K. pneumoniae</i>	- / -	- / -	-
5	CI10	Survived	<i>K. pneumoniae</i>	- / -	- / -	-
Specificity (%)				92 (12 / 13)	69 (9 / 13)	69 (9 / 13)

^a Performed in duplicate

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ใช้วิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers⁽⁹⁾ ซึ่งมีการออกแบบ primers จากส่วนของ specific DNA probe (pKKU-S23L) ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* และวิธี real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA primers⁽¹⁵⁾ ที่มีความจำเพาะต่อส่วนของยีน 16S rDNA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นยีนที่มีลำดับดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะสูงในแบคทีเรีย species เดียวกัน และพบในสารพันธุกรรมของเชื้อ *B. pseudomallei* โครโมโซมที่ 1 จำนวน 3 copies และโครโมโซมที่ 2 จำนวน 1 copy โดยทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยรับใหม่ไม่เกิน 3 วันที่มีอาการไข้ และสงสัยการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดจำนวน 32 ราย โดยปรับปรุงและทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ทั้งสองวิธีจากวิธีของ Rattanathongkom และคณะ⁽⁹⁾ และ Tomaso และคณะ⁽¹⁵⁾ ซึ่งการศึกษาค้นพบว่าวิธี conventional PCR สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 10^3 cfu/ml และตรวจพบปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 pg ต่อ 1 ปฏิกิริยา ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Rattanathongkom และคณะ ที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 1 cfu/ml และมีปริมาณ DNA ต่ำสุด 0.5 fg ต่อ 1 ปฏิกิริยา⁽⁹⁾ ทั้งนี้ อาจเกิดจากการสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณที่ต่างกัน โดยการศึกษาของ Rattanathongkom และคณะ ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก และนำ pellets ที่เหลือไปต้มเดือดเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอโดยตรงสำหรับทำ PCR ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปซึ่งเหมาะสำหรับนำไปใช้ในงานประจำของโรงพยาบาล โดยจากการศึกษาของ Krulova และคณะ พบว่าชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปนี้มีประสิทธิภาพที่ดีในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เมื่อมีจำนวนเชื้อต่ำสุด 10^3 cfu/ml⁽²⁴⁾ แม้ว่าการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปนี้จะทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าแต่เนื่องจากการสกัดหลายขั้นตอน ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าที่มีอยู่จริงได้

จากการประเมินคุณภาพวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดโดยเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาค้นพบว่าวิธี conventional PCR มีค่าความไวต่ำและความจำเพาะสูง (ร้อยละ 37 และร้อยละ 92 ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Sermswan และคณะซึ่งใช้วิธีและ primers ชนิดเดียวกันตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในตัวอย่างเลือด ซึ่งมีค่าความไวและความจำเพาะสูงถึงร้อยละ 95.2 และร้อยละ 91.7 ตามลำดับ⁽⁵⁾ ทั้งนี้ อาจเกิดจากความแตกต่างในการเตรียมและสกัดดีเอ็นเอของเชื้อซึ่งอาจมีผลต่อปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ดังกล่าวข้างต้น หรือการใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์ PCR ที่แตกต่างกัน และอาจเกิดจากการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่มีอาการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งหากมีจำนวนเชื้อในกระแสเลือดน้อยอยู่แล้วและอาจน้อยกว่าค่า detection limit ของวิธีทดสอบก็อาจทำให้เกิดผลลบปลอมได้ ดังที่มีรายงานพบว่าในผู้ป่วยร้อยละ 53 ที่ติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดจะมีจำนวนเชื้อมากกว่า 10 cfu/ml⁽²⁵⁾ และจากการศึกษาของ Wuthiekanun และคณะพบว่าจำนวนเชื้อ *B. pseudomallei* ที่อยู่ในกระแสเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีค่ามัธยฐาน (median) ของจำนวนเชื้อเป็น 1.1 cfu/ml⁽²⁶⁾ ซึ่งมีค่าต่ำกว่า detection limit ที่ทดสอบได้จากการศึกษาค้นครั้งนี้ นอกจากนี้การเพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระแสเลือดของโรงพยาบาลขอนแก่นซึ่งใช้แนวทางปฏิบัติของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คือ เจาะเลือดอย่างน้อย 2-3 ตัวอย่าง ห่างกัน 15 นาทีใส่ในขวด hemoculture ซึ่งในทางปฏิบัติส่วนใหญ่เจาะเลือดเพียง 1-2 ตัวอย่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับดุลยพินิจของแพทย์ อาจทำให้ได้ผลการตรวจพบเชื้อที่ต่ำลงด้วย

การศึกษาค้นครั้งนี้วิธี conventional PCR มีผลลบปลอม 1 ราย จากตัวอย่างที่มีผลการเพาะเชื้อเป็น *K. pneumoniae* ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ในปฏิกิริยาการทดสอบหรือจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอาจมีลำดับดีเอ็นเอบางส่วนคล้ายคลึงกับเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้สามารถจับกับ primers ที่ใช้ได้ ส่งผลให้ค่าความจำเพาะแตกต่าง

จากการศึกษาของ Sermswan และคณะ (ร้อยละ 91.7) ซึ่งมีผลบวกปลอม 2 ราย คือ จากเชื้อ *Acinetobacter anitratus* และ *Candida* sp. ⁽⁵⁾

จากการประเมินคุณภาพวิธี real-time PCR โดยใช้ 16S rDNA primers สำหรับตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งปริมาณพบว่ามีค่าความไวและความจำเพาะปานกลาง (ร้อยละ 63 และร้อยละ 69 ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า ในการศึกษาของ Tomaso และคณะซึ่งมีค่าความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 ⁽¹⁵⁾ แต่หากเปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR โดยใช้ LPS primers ที่ได้ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมแล้ว พบว่าวิธี real-time PCR มีค่าความไวสูงกว่า แต่ความจำเพาะต่ำกว่า รวมทั้งมีวิธีในการตรวจติดตาม products ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาโดยอาศัยสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น โดยไม่ต้องตรวจสอบด้วยการทำ gel electrophoresis ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี real-time PCR น่าจะเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวิธีตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดเบื้องต้น ในขณะที่ conventional PCR ซึ่งมีความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกสูงกว่า น่าจะมีประโยชน์ สำหรับการใช้ตรวจวิเคราะห์ประกอบกันเพื่อตรวจยืนยันการติดเชื้อเนื่องจากหากตรวจได้ผลบวกแล้วผู้ป่วยจะมีโอกาสเป็นโรค melioidosis สูง

นอกจากนี้จากการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าทั้งวิธี conventional PCR และวิธี real-time PCR มีค่าความไวสูงขึ้น และเนื่องจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในกระแสเลือดสามารถทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ภายในเวลา 48-72 ชั่วโมง ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ด้วย PCR ทั้งสองวิธีนี้น่าจะมีประโยชน์ในการช่วยพยากรณ์การติดเชื้อเพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ถูกต้องและรวดเร็ว โดยในการศึกษาครั้งต่อไป อาจต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและพัฒนาต่อไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของวิธี PCR ให้สามารถนำมาใช้ได้จริงสำหรับงานประจำในระดับโรงพยาบาล เพื่อลดโอกาสการติดเชื้อในกระแสเลือดที่รุนแรงหรือภาวะช็อกและเสียชีวิตได้ เนื่องจากการเพาะแยกเชื้อทางห้องปฏิบัติการต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์อย่างน้อย 3-5 วัน อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR จะต้องพิจารณาถึงความคุ้มค่าในการเลือกวิธีและหลักการตรวจวิเคราะห์

PCR ที่เหมาะสม และต้องมีการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์สำหรับเครื่อง PCR แต่ละชนิดที่ใช้งาน ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาวิธี PCR เพื่อช่วยวินิจฉัยการติดเชื้อ *B. pseudomallei* เบื้องต้นในงานประจำวันของโรงพยาบาลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัย โรงพยาบาลขอนแก่น และสถาบันสุขภาพแห่งชาติ (National Institutes of Health, USA) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ รศ.ดร. สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่เอื้อเฟื้อดีเอ็นเอของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 ที่ใช้ในการศึกษา ขอขอบคุณบุคลากรกลุ่มงานอายุรกรรมและกลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดผู้ป่วยและขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความร่วมมือและให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและน้ำยาสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR

เอกสารอ้างอิง

1. Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun 1996; 64: 782-90.
2. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis 1989; 159: 890-9.
3. Leelarasamee A, Bovornkitti S. Melioidosis: review and update. Rev Infect Dis 1989; 11 : 413-25.
4. Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Engam N, Jitsurong S, Kunthawa B, Noimay P, et al. Epidemiology of *Burkholderia pseudomallei* in Thailand. Am Trop Med Hyg 1999; 60: 458-61.

5. Sermswan RW, Wongratanacheewin S, Anuntagool N, Sirisinha S. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 63: 146-9.
6. Lew AE, Desmarchelier PM. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1326-32.
7. Dharakul T, Songsivilai S, Viriyachitra S, Luangwedchakarn V, Tassaneetritap B, Chaowagul W. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 609-14.
8. Merritt A, Inglis TJ, Chidlow G, Harnett G. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48: 239-44.
9. Rattanathongkom A, Sermswan RW, Wongratanacheewin S. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples using polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1997; 11: 25-31.
10. Haase A, Brennan M, Barrett S, Wood Y, Huffam S, O'Brien D, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of melioidosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1039-41.
11. Kunakorn M, Raksakait K, Sethaudom C, Sermswan RW, Dharakul T. Comparison of three PCR primer sets for diagnosis of septicemic melioidosis. *Acta Trop* 2000; 74: 247-51.
12. Wongratanacheewin S, Komutrin K, Sermswan RW. Use of multiplex PCR patterns as genetic markers for *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Trop* 2000; 74: 193-9.
13. Lee MA, Wang D, Yap EH. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 43: 413-7.
14. Liu Y, Loh JP, Aw LT, Yap EP, Lee MA, Ooi EE. Rapid molecular typing of *Burkholderia pseudomallei*, isolated in an outbreak of melioidosis in Singapore in 2004, based on variable-number tandem repeats. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 687-92.
15. Tomaso H, Scholz HC, Al Dahouk S, Pitt TL, Treu TM, Neubauer H. Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei* *Burkholderia pseudomallei* complex. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 247-53.
16. Tomaso H, Pitt TL, Landt O, Al Dahouk S, Scholz HC, Reisinger EC, et al. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 9-20.
17. Chantratita N, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Thanwisai A, Chantratita 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.
18. Thibault FM, Valade E, Vidal DR. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5871-4.
19. Meumann EM, Novak RT, Gal D, Kaestli ME, Mayo M, Hanson JP, et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3028-30.
20. Novak RT, Glass MB, Gee JE, Gal D, Mayo MJ, Currie BJ, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 85-90.

21. Supaprom C, Wang D, Leelayuwat C, Thaewpia W, Sasaengrat W, Koh V, et al. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. J Clin Microbiol 2007; 45: 2894-901.
22. Chantratita N, Meumann E, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Wannapasni S, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol 2008; 46: 568-73.
23. Suputtamongkol Y, Chaowagul W, Chetchotisakd P, Lertpatanasuwun N, Intaranongpai S, Ruchutrakool T, et al. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. Clin Infect Dis 1999; 29: 408-13.
24. Krulova B, Nemcova E, Zaloudikova B, Nemec P, Freiburger T. Comparison of commercial DNA extraction kits for the detection of bacterial genomic DNA from whole-blood samples using a broad-range PCR. Crit Car 2009; 13: S5.
25. Walsh AL, Smith MD, Wuthiekanun V, Suputtamongkol Y, Chaowagul W, Dance DA, et al. Prognostic significance of quantitative bacteremia in septicemic melioidosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1498-500.
26. Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Wongsuvan G, Chierakul W, Teerawattanasook N, Teparrukkul P, et al. Quantitation of *B. Pseudomallei* in clinical samples. Am J Trop Med Hyg 2007; 77: 812-3.