

การพัฒนาวิธีและประเมิน ชุดทดสอบโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน

วัชรีย์ สายสงเคราะห์ วท.บ., วท.ม., Ph.D.

วิมล เพชรกาญจนางค์ วท.บ., วท.ม., ประ.ด.

ชลลดา มีทรัพย์ วท.บ.

ศุภลักษณ์ ยะแสง วท.บ., ศศ.บ., วท.ม.

วันวิสา โกลาหล วท.บ.

ภาณุวัฒน์ ผุดผ่อง วท.บ.

วัฒนพงศ์ วุฑธา วท.บ., วท.ม.

เดชา แปงใจ สพ.บ.

สมชาย แสงกิจพร พ.บ., ป. ชั้นสูง, ว.ว. พยาธิวิทยาคลินิก

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ โรคติดต่อที่นำโดยสัตว์หรือแมลงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่พบแนวโน้มอุบัติการณ์โรคอุบัติใหม่/อุบัติซ้ำเพิ่มขึ้น โดยสาเหตุเนื่องจากสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติและพฤติกรรมของมนุษย์ที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนา และประเมินชุด multidot-IFA เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค布鲁เซลโลสิส/เมลิออยโดสิส/เลปโตสไปโรสิส/ สดริบไทฟัส/มีวรีนไทฟัส และชุดตรวจหาสารพันธุกรรม multiplex real-time PCR จำนวน 3 ชุด คือ ชุด布鲁เซลโลสิส/ เลปโตสไปโรสิส/เมลิออยโดสิส/ทูลารีเมีย ชุด布鲁เซลโลสิส/เลปโตสไปโรสิส/คิฟิเวอร์/สดริบไทฟัส และชุดบาร์โทเนล- โลสิส/มีวรีนไทฟัส/ริกเก็ตเซียโอสิส/สดริบไทฟัส ผลการประเมินพบว่าสไลด์แอนติเจนของชุด multidot-IFA มีความ เสถียรไม่น้อยกว่า 1 ปี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20°C และค่าความไวอยู่ระหว่าง 86-100% ขณะที่ชุด multiplex real- time PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรค 9 โรคที่กล่าวข้างต้น โดยไม่พบการข้ามสายพันธุ์กับเชื้อก่อโรคนอกกลุ่มศึกษา เมื่อใช้เกณฑ์ตัดค่าจำนวนรอบของการพบสารพันธุกรรมเพิ่มปริมาณที่ 33 ± 1 รอบ และปริมาณน้อยสุดที่พบอยู่ระหว่าง 0.01 ถึง 1,000 พิโคกรัม กล่าวโดยสรุป ชุด multidot-IFA และ multiplex real-time PCR มีค่าความไวและความ จำเพาะสูงเพียงพอที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค เนื่องจากวิเคราะห์โรคได้หลายโรคพร้อมกันในการทดสอบครั้งเดียว ซึ่งนอกจากช่วยลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการรักษาแล้ว ยังช่วยในการเฝ้าระวังและป้องกันการแพร่ระบาดของ โรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำของประเทศ

คำสำคัญ: โรคติดต่อจากสัตว์สู่คน, ชุดตรวจ multidot-IFA, การตรวจ multiplex real-time PCR

บทนำ

โรคติดต่อจากสัตว์หรือแมลงพาหะสู่คนเป็นหนึ่งใน ปัญหาสาธารณสุขที่พบในปัจจุบัน โดยอุบัติการณ์การแพร่

กระจายของเชื้อก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ มีแนวโน้มการ เพิ่มขึ้นของเชื้อ ซึ่งสาเหตุนอกจากการเปลี่ยนแปลง สภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติของโลกแล้ว พฤติกรรมของ

มนุษย์และการปรับตัวของเชื้อยังเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของการเกิดโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ (โรคประจำถิ่น) เช่น ปี ค.ศ. 2004 Manosuthi และคณะรายงานโรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำ “บรูเซลโลสิส” สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Bruceella melitensis* ในผู้ป่วยที่มีอาการไข้สูง ภายหลัง 34 ปี ของรายงานการพบผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย^(1,2) และการพบเชื้ออุบัติใหม่ *Candidatus Bartonella thailandensis* จากหนูในตระกูลสัตว์ฟันแทะซึ่งจับได้ที่จังหวัดสุรินทร์⁽³⁾ หรือการเพาะแยกเชื้อ *Bartonella henselae* และ *Bar. tamiae* บนอาหารร่วนแข็งได้ครั้งแรกในประเทศไทย จากตัวอย่างผู้ป่วย angiomatosis และผู้ป่วยไข้ไม่ทราบสาเหตุในปี ค.ศ. 2008^(4,5) เช่นเดียวกับปี ค.ศ. 2012 Pachirat และคณะพบโรคควีเฟเวอร์ (Q fever) สาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Coxiella burnetii* ในผู้ป่วย endocarditis ที่มีอาการไข้⁽⁶⁾ ขณะที่โรคอุบัติซ้ำอื่นๆ เช่น เลปโตสไปโรสิส สดริบไทฟัส เมลิออยโดสิส ฯลฯ ยังพบว่าเป็นปัญหาจำเป็นที่ยังมีการรายงาน จากรายงานสถานการณ์โรคอุบัติใหม่และโรคอุบัติซ้ำในปัจจุบันพบอัตราป่วยของโรคสัตว์สู่คนน้อยกว่าความเป็นจริงเนื่องจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งถูกวินิจฉัยให้อยู่ในกลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุซึ่งสอดคล้องกับการพบอัตราป่วยของโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่พบแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปีจากรายงานในระบบเฝ้าระวังและสอบสวนโรค กรมควบคุมโรค และจากการสืบค้นข้อมูลศึกษาวิจัยซึ่งมีไม่มากในประเทศ พบการพิสูจน์ทราบผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุติดเชื้อ *Leptospira* spp. ร่วมกับ *Orientia tsutsugamushi* สาเหตุของโรคเลปโตสไปโรสิสและสดริบไทฟัสในปี ค.ศ. 2007 และ 2013^(7,8) ขณะที่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคอีกหลายสายพันธุ์ถูกจัดให้อยู่ในเชื้ออันตรายร้ายแรงระดับ 3 หรือเชื้ออาวุธชีวภาพที่ความรุนแรงของเชื้อสามารถติดต่อผ่านทางสูดดม นอกเหนือจากการบริโภคหรือสัมผัสสัตว์รังโรคยังคงเป็นปัญหาที่ต้องเฝ้าระวังเนื่องจากเชื้อสามารถแพร่กระจายได้หลายทาง เช่น การพบผู้ป่วยอายุ 79 ปี ที่มีอาชีพเลี้ยงแพะติดโรคบรูเซลโลสิสและเสียชีวิตด้วยระบบการหายใจล้มเหลวภายหลังพบภาวะไต-

วาย 3 เดือน ในปี ค.ศ. 2009 และจากการสืบค้นสาเหตุการเสียชีวิตของผู้ป่วย⁽⁹⁾ Wongphurksasoon และคณะพบผู้ป่วยบรูเซลโลสิสมีประวัติสัมผัสสัตว์รังโรค “แพะ” เพิ่มอีก 3 ใน 38 ราย โดยพบแพะ 1 ตัว ติดเชื้อ *Bruceella*⁽⁹⁾ ข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ถึงระบบการสอบสวนโรค ภายหลังพบผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคติดเชื้อที่ถูกตรวจวินิจฉัยและทราบสาเหตุเชื้อก่อโรคที่นำไปสู่รายงานการพบผู้ป่วยติดเชื้อ ซึ่งในระบบเฝ้าระวังสถานการณ์โรคสัตว์สู่คนต่ำกว่าสถานการณ์จริงสาเหตุจากความสนใจของบุคลากรทางการแพทย์ และเชื้อก่อโรคบางโรคไม่ต้องการรายงาน เช่น โรคมิวรินไทฟัส และโรคอุบัติใหม่

กล่าวอีกนัยหนึ่ง ความหลากหลายสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคยังเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ยากต่อการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะการพิสูจน์ทราบโรคในผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้ ผู้ป่วยที่มีประวัติสัมผัสสัตว์รังโรค หรืออาศัยทำกิจกรรมในพื้นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น เดียวกับการคัดเลือกชนิดหรือชุดทดสอบหรือวิธีการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคซึ่งมีทั้งวิธีมาตรฐานหรือการเลือกใช้ชุดทดสอบชนิดเร็ว ซึ่งมีทั้งชนิดตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือสารพันธุกรรมที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน และจากการสืบค้น พบข้อจำกัดของชุดตรวจด้วยวิธี immunofluorescent สามารถตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคได้เพียง 1 ถึง 2 โรค เช่น Fuller Laboratories⁽¹⁰⁾ ผลิตชุดตรวจ spotted fever/มิวรินไทฟัส ชุดตรวจทูลารีเมีย หรือ “ไข้กระต่าย”/บรูเซลโลสิส ชุดตรวจ anaplasmosis/ehrlichiosis เป็นต้น และชุดตรวจสารพันธุกรรม FTD Tropical fever core⁽¹¹⁾ ที่มีจำหน่ายแม้ว่าสามารถตรวจเชื้อก่อโรคสัตว์สู่คนได้ 7 โรค ต่อ 2 ชุดการทดสอบ แต่ชุดดังกล่าวยังขาดความครอบคลุมในการตรวจเชื้อก่อโรคประจำถิ่น (สดริบไทฟัส/บรูเซลโลสิส/เมลิออยโดสิส) และเชื้ออุบัติใหม่ (ทูลารีเมีย/บาร์โทเนลโลสิส/ควีเฟเวอร์) ที่พบรายงานอุบัติการณ์ในประเทศ ขณะที่การคัดเลือกวิธีและชุดตรวจเพื่อวิเคราะห์หาสาเหตุของโรคต้องสงสัยแต่ละโรคให้ครอบคลุมในกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าวข้างต้นต้องใช้ระยะเวลาในการตรวจวินิจฉัย ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองค่า-

ใช้จ่าย ระยะเวลา และแรงงาน

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาและประเมินชุดตรวจวินิจฉัยโรคที่นำโดยสัตว์หรือแมลงพาหะสู่คนภายใน การทดสอบเดี่ยวโดยแยกเป็น ชุด multidot-IFA (multidot indirect immunofluorescent assay) เพื่อตรวจหา ระดับภูมิคุ้มกันต่อ 5 โรค (บรูเซลโลสิส/เมลิออยโดสิส/ เลปโตสไปโรสิส/สครับไทฟัส/มิวรินไทฟัส) และชุด multiplex real-time PCR (multiplex real time polymerase chain reaction) 3 ชุด เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรม 9 โรค ได้แก่ บาร์โทเนลโลสิส/บรูเซลโลสิส/เมลิออยโดสิส/คิวฟีเวอร์/ทูลารีเมีย/เลปโตสไปโรสิส/สครับไทฟัส/ริกเก็ตเซียโลสิส/มิวรินไทฟัส

วิธีการศึกษา

การพัฒนาและประเมินความถูกต้องของชุดตรวจ multidot-IFA

1. แอนติเจนสไลด์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Brucella melitensis* *Burkholderia pseudomallei* *Leptospira* spp. (24 สายพันธุ์) *Orientia tsutsugamushi* (3 สายพันธุ์) และ *Rickettsia typhi* Wilmington (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคบรูเซลโลสิส เมลิออยโดสิส เลปโตสไปโรสิส สครับไทฟัสและมิวรินไทฟัส ตามลำดับ มาเพาะเลี้ยงในตู้ชีววิทยาระดับ 2/3 ของห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยแยกเพาะเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดตามวิธีและขั้นตอนที่แตกต่างกัน เช่น เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bru. melitensis* และ *Bur. pseudomallei* บนอาหารวุ้นแข็งที่มีเลือดครบส่วนเป็นอาหารเสริม⁽¹²⁾ เพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* spp. ในอาหารเหลว EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris⁽¹³⁾) และแยกเลี้ยงเชื้อ *O. tsutsugamushi* และ *R. typhi* ในเซลล์เพาะเลี้ยง⁽¹⁴⁾ นำเชื้อที่ได้จากการแยกเพาะเลี้ยงมาปั่นล้างด้วย phosphate buffered-saline (PBS, pH 7.4) ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง แยกหยดเชื้อที่ทำให้หมดฤทธิ์/

คงสภาพด้วย 0.5% ฟอรัมาลิน 1 ไมโครลิตร (μ l) ต่อเชื้อบนสไลด์แก้ว (5 เชื้อ/หลุม) เคลือบแอนติเจนด้วยอาซิโตนเย็น 10 นาที ผึ่งให้แห้งก่อนนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

2. ตัวอย่างน้ำเหลือง

คำนวณจำนวนตัวอย่างจากค่าเป้าหมายของความไวและความจำเพาะของวิธี multidot-IFA โดยกำหนดให้มีความเป็น 90% (P) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีค่าความแม่นยำยอมให้เกิดขึ้น 0.1 ได้จำนวนตัวอย่าง 34.57 หรือเท่ากับ 35 ตัวอย่างต่อโรค

จากการศึกษา คณะผู้วิจัยได้กำหนดตัวอย่างน้ำเหลืองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างผู้บริจาคโลหิตจำนวน 70 ราย เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินคนปรกติไม่เป็นโรค และตัวอย่างผู้ป่วยโรคสัตว์สู่คนเพื่อใช้ในการประเมินชุดตรวจ multidot-IFA จำนวนรวมทั้งสิ้น 146 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างยืนยันผู้ป่วยโรคบรูเซลโลสิส/เลปโตสไปโรสิส จำนวนละ 29 ตัวอย่าง เมลิออยโดสิส 38 ตัวอย่าง และสครับไทฟัส/มิวรินไทฟัส จำนวนละ 25 ตัวอย่าง ซึ่งคัดเลือกจากตัวอย่างส่งตรวจโรคติดต่อทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิกและห้องปฏิบัติการริกเก็ตเซีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ให้ผลบวกด้วยวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ วิธี enzymed-link immunosorbent assay (ELISA) วิธี microagglutination test (MAT) วิธี indirect heme agglutination (IHA) และ indirect fluorescent assay (IFA) สำหรับการตรวจโรคบรูเซลโลสิส เลปโตสไปโรสิส เมลิออยโดสิส และสครับไทฟัส/มิวรินไทฟัส ตามลำดับ

3. multidot-IFA และเกณฑ์ตัดสินการเป็นโรค

Multidot-IFA ใช้หลักการเดียวกับ IFA กล่าวคือให้ตัวอย่างน้ำเหลืองทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อ โดยนำสไลด์แอนติเจนซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เจือจางตัวอย่างน้ำเหลืองด้วย PBS ลงครั้งละ 2 เท่า (2-fold dilution) โดยเริ่มต้นจากความเข้มข้นที่ 1:50 1:100 1:200 1:400 1:800 จนถึงความเข้มข้นที่ 1:1600 และหยดตัวอย่างน้ำเหลืองที่ถูกเจือจาง

แล้วตามลำดับลงบนสไลด์แต่ละหลุมที่ปริมาตร 15 μ l บ่มสไลด์ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที ล้างสไลด์ด้วย PBS นาน 5 นาที 3 ครั้ง หยด polyclonal rabbit anti-human-IgM หรือ polyclonal rabbit anti-human-IgG ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสซิน (Dako, Denmark) ซึ่งถูกเจือจางด้วย PBS-evans blue ในอัตราส่วน 1:40 ลงบนสไลด์ที่ผึ่งแห้ง บ่มและล้างสไลด์ตามขั้นตอนข้างต้น หยด glycerol (Merck, Germany) บนสไลด์ที่ผึ่งแห้งปิดทับด้วยแผ่นกระจก (cover slip) อ่านผลการเรืองแสงของการทำปฏิกิริยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ทุกสไลด์ต้องมีตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (internal quality control; IQC) กำกับทุกครั้ง โดยตัวควบคุมบวก (positive serum control) เป็นตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อโรคที่ถูกผสมและเจือจางให้เข้ากันด้วย PBS ที่ 1:200 และตัวควบคุมลบ (negative serum control) เป็นตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อโรคซึ่งถูกเจือจางเป็น 1:50 อ่านและบันทึกผลความสว่างการเรืองแสงสีเขียวของฟลูออเรสซินบนตัวเชื้อ จากระดับความสว่างมากไปน้อย โดยแบ่งเป็น 4 ระดับ ตั้งแต่ (4+) ถึง (1+) และไม่พบการเรืองแสงสีเขียวเป็น (-)

เกณฑ์ตัดสินคนปรกติไม่เป็นโรคถูกกำหนดจากตัวอย่างน้ำเหลืองผู้บริจาคโลหิต จำนวน 70 ราย ที่ไม่พบผลการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างน้ำเหลืองที่ถูกเจือจางระดับสุดท้ายกับแอนติเจนของเชื้อก่อโรค

4. การประเมินความถูกต้องจากการทดสอบซ้ำ
ความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก-ลบและความเสถียรของชุดตรวจ

ทำการประเมินผลทดสอบซ้ำ ชุดแอนติเจนสไลด์ multidot กับตัวอย่างควบคุมบวก 5 โรค ทั้งภายในวัน (within-run) และระหว่างวัน (between-run) จำนวน 10 ครั้ง พร้อมทั้งประเมินค่าความไว ความจำเพาะจากกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคสัตว์สู่คน 146 ตัวอย่าง ดังกล่าวข้างต้น และทดสอบความเสถียรของแอนติเจนสไลด์ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ -20°C กับตัวอย่างควบคุมบวกและลบเป็นระยะ

เวลา 12 เดือน

การพัฒนาและประเมินวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วย multiplex real-time PCR

1. สารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย; สารพันธุกรรมที่ใช้ถูกสกัดจากเชื้อแบคทีเรียซึ่งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการระดับ 2-3 ของสถาบันฯ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียกลุ่มศึกษา จำนวน 8 จีโนส และกลุ่มอื่น จำนวน 19 จีโนสดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียถูกสกัดตามคู่มือของชุดสกัด QIAamp (QIAGEN, Germany) วัดปริมาณสารพันธุกรรมที่สกัดได้ในช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และปรับให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่นำมาใช้ในการศึกษาที่ 1,000 พิโคกรัม (pg) พร้อมทั้งเจือจางด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ทุก ๆ 10 เท่า เพื่อใช้ตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมน้อยสุดที่ชุดตรวจสามารถวัดได้

2. พัฒนาริธี real-time PCR; คัดเลือกตัวแทนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสัตว์สู่คนเพื่อนำมาสกัดเป็นสารพันธุกรรมใช้ควบคุมในการพัฒนาชุดตรวจ multiplex real-time PCR ได้แก่ *Bar. henselae*/*Bru. melitensis*/*Bur. pseudomallei*/*Cox. burnetii*/*Francisella tularensis tularensis*/*Lep. interrogans* (Autumnalis)/*O. tsutsugamushi* (Gilliam)/*Rickettsia sibirica*/*R. typhi* Wilmington สาเหตุโรคบาร์โทเนลโลสิส/บรูเซลโลสิส/เมลิออยโดสิส/คิฟเวอร์/ทูลารีเมีย/เลปโตสไปโรสิส/สกริปไทฟัส/ริกเก็ตเซียโอสิส/มิวรีนไทฟัส ตามลำดับ พร้อมทั้งออกแบบสารพันธุกรรมต้นแบบ “ไพรเมอร์” และ “ตัวติดตาม” จากยีนคัดเลือกที่จำเพาะต่อเชื้อก่อโรคจำนวน 7 สายพันธุ์ จาก 7 จีโนส โดยใช้โปรแกรม Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus.cgi) และคัดเลือกไพรเมอร์และตัวติดตาม เชื้อก่อโรคบาร์โทเนลโลสิสและริกเก็ตเซียโอสิสจากการสืบค้นข้อมูล^(3,15) (ตารางที่ 2) เปรียบเทียบความจำเพาะของไพรเมอร์และตัวติดตามซึ่งติดสารเรืองแสงที่มีช่วงความยาวคลื่นแตกต่างกันกับฐานข้อมูลของ GenBank ผ่านทางระบบคอมพิวเตอร์เพื่อดูร้อยละความเหมือน

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียกลุ่มศึกษาและกลุ่มอื่น

กลุ่มแบคทีเรีย	สายพันธุ์เชื้อ
กลุ่มศึกษา (8 จินัส)	<p><i>Bartonella henselae</i>- <i>Brucella</i> spp.3 สายพันธุ์ (<i>Bru. abortus</i>, <i>Bru. melitensis</i>*, <i>Bru. suis</i>), <i>Burkholderia</i> spp. 6 สายพันธุ์ (<i>Bur. cenocepacia</i>, <i>Bur. cepacia</i>, <i>Bur. pickettii</i>, <i>Bur. pseudomallei</i>*, <i>Bur. thailandensis</i>, <i>Bur. ubonensis</i>, <i>Bur. vietnamiensis</i>)</p> <p>- <i>Coxiella burnetii</i></p> <p>- <i>Francisella</i> spp. 2 สายพันธุ์ (<i>F. tularensis novicida</i>, <i>F. tularensis tularensis</i>)</p> <p>- <i>Leptospira</i> spp. 24 สายพันธุ์* (<i>Australis</i>, <i>Autumnalis</i>, <i>Ballum</i>, <i>Bataviae</i>, <i>Canicola</i>, <i>Cellidoni</i>, <i>Cynopteri</i>, <i>Djasiman</i>, <i>Grippotyphosa</i>, <i>Hebdomadis</i>, <i>Icterohaemorrhagiae</i>, <i>Javanica</i>, <i>Louisiana</i>, <i>Manhoa</i>, <i>Mini</i>, <i>Panama</i>, <i>Pomona</i>, <i>Pyrogenes</i>, <i>Ranarum</i>, <i>Sarmin</i>, <i>Sejroe</i>, <i>Shermani</i>, <i>Tarasoni</i>, <i>Semarang</i> (สายพันธุ์ไม่ก่อโรค))</p> <p>- <i>Orientia tsutsugamushi</i> 10 สายพันธุ์ (<i>Gilliam</i>*, <i>Karp</i>*, <i>Kato</i>*, <i>Kawasaki</i>, <i>Kuroki</i>, <i>TA678</i>, <i>TA686</i>, <i>TA716</i>, <i>TA763</i>, <i>TH1817</i>)</p> <p>- <i>Rickettsia</i> spp. 6 สายพันธุ์ (<i>R. bellii</i> <i>R. felis</i> <i>R. helvetica</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. typhi</i> <i>Wilmington</i>* <i>Thai Tick typhus</i>)</p>
กลุ่มอื่น (19 จินัส)	<p><i>Acinetobacter baumannii</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bordetella pertussis</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Corynebacterium diphtheriae</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Haemophilus influenzae</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Legionella pneumophila</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Moraxella catarrhalis</i>, <i>Pleisiomonas shigelloides</i>, <i>Proteus</i> spp. 2 สายพันธุ์ (<i>Pro. mirabilis</i>, <i>Pro. Vulnificus</i>), <i>Pseudomonas</i> spp. 2 สายพันธุ์ (<i>Pse. aeruginosa</i>, <i>Pse. stutzeri</i>), <i>Salmonella</i> spp. 2 สายพันธุ์ (<i>Sal. Paratyphi</i>, <i>Sal. Typhi</i>), <i>Shigella dysenteriae</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Vibrio vulnificus</i></p>

หมายเหตุ *: แบคทีเรียที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อเตรียมเป็นแอนติเจนสไลด์ในชุดตรวจ multidot-IFA

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ (primer) และตัวติดตาม (probe) ที่ใช้สำหรับ multiplex real-time PCR

ลำดับเบสของไพรเมอร์เชื้อก่อโรค/ตัวติดตาม (5'-3')	ยื่นเป้าหมาย	ขนาด (bp)	อ้างอิง
<p>บาร์โทเนลโลสิส:</p> <p>F: GAGTAAGTGGTAGCGGAGCG R: GCCGACTCACCCCTGCTCAG 6FAM-GAGAGCTCCTGGAGGTATCGGAAG-TAMRA</p>	23S rRNA	172	(3)
<p>บรูเซลโลสิส:</p> <p>F: CATTTTCCGTATCGGCACT R: TATAGGCCAATAGGCAACG Cy5-TCGAATGGCTCGGTTGCCAATATCA-BHQ3</p>	31 kDa Omp	216	การศึกษารั้งนี้
<p>เมล็อยโดสิส:</p> <p>F: GAAAATGTCCGCGACTTGAT R: TTCATGTCTGCCAGGTTCTG ROX-TCTTCCGAGGAATTGGCGGAAATCA-BHQ2</p>	DNA primase	224	การศึกษารั้งนี้

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ (primer) และตัวติดตาม (probe) ที่ใช้สำหรับ multiplex real-time PCR (ต่อ)

ลำดับเบสของไพรเมอร์เชื้อก่อโรค/ตัวติดตาม (5'-3')	ยีนเป้าหมาย	ขนาด (bp)	อ้างอิง
คิวพีเวอร์: F: GCCACCTCACAACAAAACCT R: CTCTTGACCTCTCCCGTTG FAM-CCTCACTGATACGACCTCTTCCGCC-TAMRA	<i>com1</i>	101	การศึกษารังนี้
ทูลารีเมีย: F: GGGCAAATCTAGCAGGTCAA R: CTTTGCCACCAAAGAACCAT FAM-AACAGGTGCTTGGGATGTGGGTGGT-TAMRA	<i>fopA</i>	198	การศึกษารังนี้
เลปโตสไปโรสิส: F: GGACGGTTTAGTCGATGGAA R: GCATAATCGCCGACATTCTT ROX-TCCTCCGAGGAATTGGCGGAAATCA-BHQ2	<i>lipL32</i>	227	การศึกษารังนี้
สครับไทฟัส: F: CGAGAAGGGCTATCTTGTGTG R: TCTAGCTTTACGRGCTGCTT ROX-AATTACTGAATCAGCGCTTGACGTG-BHQ2	<i>gyrB</i>	222	การศึกษารังนี้
ริกเก็ตเชียโอสิส: F: GAMAAATGAATTATATACGCCGCAA R: ATTATKCCAAATATTCGTCTGTAC Hex-CTCAAGATAAGTATGAGTTAAATGTAAA-BHQ1	hypothetical protein	109	(15)
มิวรินไทฟัส: F: GCGGTGCATTACTTGGTTCT R: GGATTGCGCCATTCTATGTT Cy5-GCGCATTACTTGGGGCAGTTCTTGG-BHQ3	17 kD	199	การศึกษารังนี้

ของลำดับสารพันธุกรรมกับยีนของเชื้อกลุ่มศึกษาที่ทราบสายพันธุ์จากฐานข้อมูล

คุณสมบัติความใช้ได้ของไพรเมอร์และตัวติดตามที่ออกแบบถูกนำมาแยกทดสอบกับสารพันธุกรรมควบคุมเชื้อก่อโรคทั้ง 9 โรค ด้วยวิธี monoplex real-time PCR โดยกำหนดเกณฑ์ตัดค่าจำนวนรอบของการพบสารพันธุกรรมเพิ่มปริมาณ (threshold cycle cut-off; Ct cut-off) ที่ 33 ± 1 รอบ ก่อนปรับสภาพที่เหมาะสมในการพัฒนาชุดตรวจ multiplex real-time PCR

3. ประเมินความถูกต้องจากการทดสอบความไว ความจำเพาะและความเสถียรของชุดตรวจ

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี multiplex real-time PCR ค่าความไวของชุด multiplex real-time PCR 9 โรคของทั้ง 3 ชุด ถูกนำมาประเมินหาปริมาณสารพันธุกรรมน้อยสุดที่ชุดตรวจพบสารพันธุกรรมถูกเพิ่มจำนวน (limit of detection; LOD) โดยเริ่มต้นทดสอบกับสารพันธุกรรมที่ความเข้มข้น 1,000 pg และเจือจางลงทุก 10 เท่า จนไม่พบสารพันธุกรรมเพิ่มปริมาณ พร้อมทั้งตรวจหาความจำเพาะของไพรเมอร์และตัวติดตามที่ออกแบบกับสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มศึกษา จำนวน 8 จีโนส และกลุ่มอื่นๆ จำนวน 19 จีโนส ที่มีความเข้มข้น 1,000 pg ต่อเชื้อ (ตารางที่ 1) โดยมีตัวอย่างสารพันธุกรรม

ควบคุมบวกเพื่อทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจและตัวอย่างควบคุมลบซึ่งเป็นน้ำกลั่นบริสุทธิ์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมในชุดน้ำยาเป็นตัวอย่างควบคุมภายในกำกับทุกครั้งที่แต่ละการทดสอบ

ผลการศึกษา

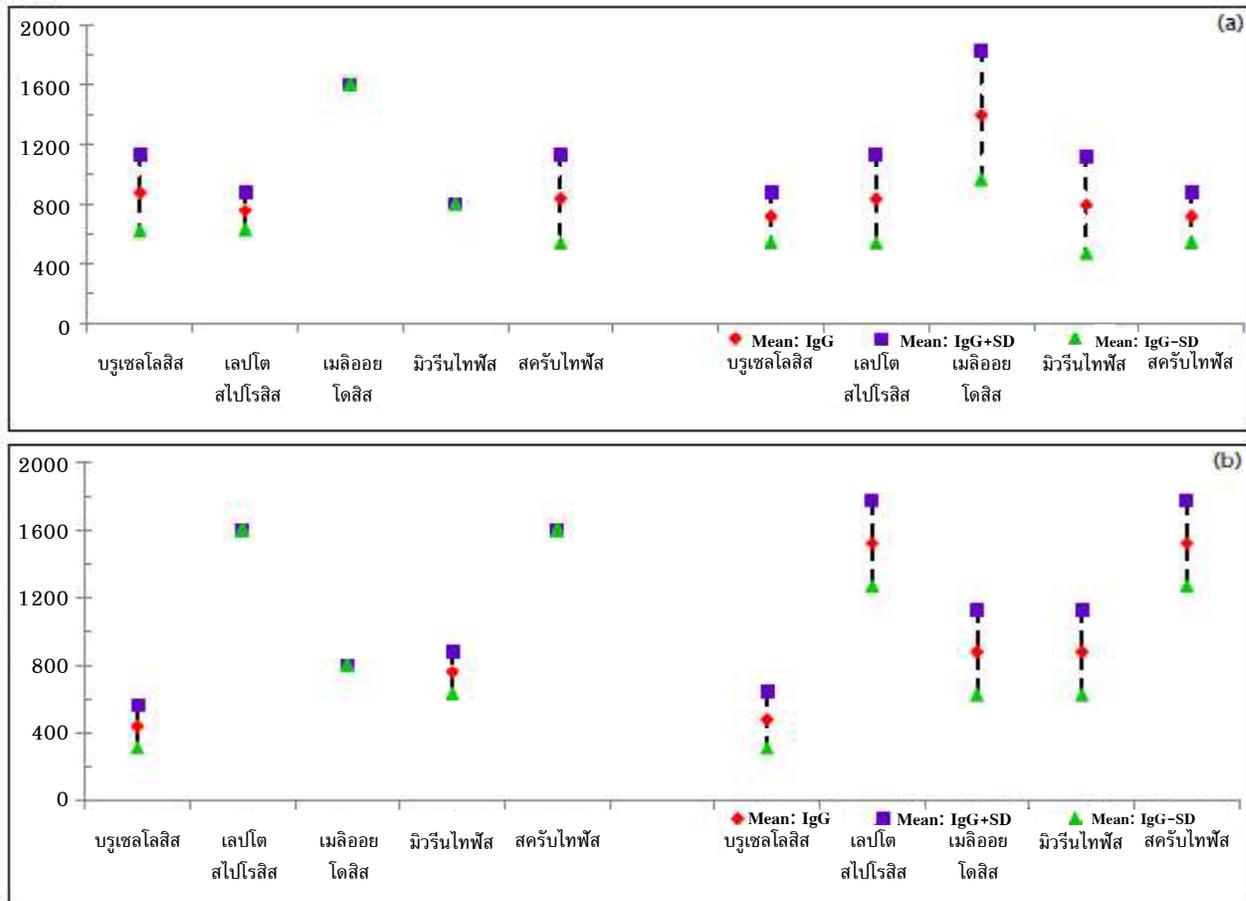
ผลทดสอบซ้ำและประเมินความถูกต้องของชุดตรวจ multidot-IFA

ผลการทดสอบซ้ำ จำนวน 10 ครั้ง กับตัวอย่างควบคุมบวก 5 โรค ที่มีระดับภูมิคุ้มกัน IgM หรือ IgG ที่ไตเตอร์ $\geq 1:400$ – $1:1600$ พบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการอ่านระดับภูมิคุ้มกัน IgM ต่อโรคเมลิออยโดสิส/เลปโตสไปโรสิส/มีวรีนไทฟัสของการทดสอบ within-run มีช่วงแคบกว่า between-run และพบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่อโรค-บรูเซลโลสิส/สครับไทฟัสของ within-run กว้างกว่า be-

tween-run ดังแสดงในภาพที่ 1

จากผลตรวจตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยโรคโลหิต จำนวน 70 ราย กับแอนติเจนเชื้อก่อโรคด้วยชุด multidot-IFA พบระดับภูมิคุ้มกันสุดท้ายที่ถูกเจือจางและยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเชื้อที่ไตเตอร์ 1:200 แต่ไม่พบผลการทำปฏิกิริยาที่ระดับไตเตอร์ตั้งแต่ 1:400 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้น จึงกำหนดเกณฑ์ตัดสินคนปรกติไม่เป็นโรคที่ระดับภูมิคุ้มกัน IgM และ IgG ที่ไตเตอร์ $\leq 1:200$ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ เกณฑ์ตัดสินตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วยติดเชื้อที่ไตเตอร์ IgM หรือ IgG $\geq 1:400$ และจากผลประเมินพบค่าความไวของเชื้อต่อโรคบรูเซลโลสิส/เมลิออยโดสิส/เลปโตสไปโรสิส/สครับไทฟัส/มีวรีนไทฟัส ร้อยละ 93.10/86.84/89.66/100.00/92.00 ตามลำดับ ค่าความถูกต้องร้อยละ 80.14/92.47/86.99/94.52/93.15 ตามลำดับ และพบค่าทำนายผลบวกน้อยกว่า

ภาพที่ 1 การทดสอบซ้ำ 10 ครั้ง ภายในวัน (within-run) และระหว่างวัน (between-run) กับตัวอย่างควบคุมบวก ผล IgM (a) และผล IgG (b)



ร้อยละ 85 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าทำนายผลลบที่มากกว่าร้อยละ 93 (ตารางที่ 3) เช่นเดียวกับผลประเมินความเสถียรของแอนติเจนสไลด์ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C พบแอนติเจนของเชื้อก่อโรคสัตว์สู่คนทั้ง 5 โรค ที่เคลือบบนสไลด์มีความคงทนต่อการทำปฏิกิริยากับตัวควบคุมบวก-ลบ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 12 เดือน

ผล real-time PCR

ภายหลังออกแบบไพรเมอร์และตัวติดตาม (ตารางที่ 2) ลำดับสารพันธุกรรมถูกตรวจสอบเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนของเชื้อที่ทราบสายพันธุ์กับฐานข้อมูลของ GenBank ผ่านทางระบบคอมพิวเตอร์ ซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่า ลำดับสารพันธุกรรมของไพรเมอร์และตัวติดตามมีความเหมือนกับยีนที่จำเพาะต่อเชื้อศึกษา 100% โดยผลยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และตัวติดตามจากการแยกทดสอบกับสารพันธุกรรมควบคุมเชื้อก่อโรคทั้ง 8 จีนัส (9 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bar. henselae*/*Bru. melitensis*/*Bur. pseudomallei*/*Cox. burnetii*/*F. tularensis tularensis*/*Lep. interrogans* Autumnalis/*O. tsutsugamushi* Gilliam/*R. typhi* Wilmington/*R. sibirica*) พบสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี monoplex real-time PCR ที่อุณหภูมิ 95°C สำหรับขั้นตอนการแยกสายเกลียวคู่ของสารพันธุกรรม-เชื้อเพื่อให้เป็นสายเดี่ยว (initial activation และ denaturation) และที่อุณหภูมิ 60°C ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนสายของสารพันธุกรรมที่ถูกแยก (annealing หรือ extension) โดยใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์และตัว-

ติดตามที่ 0.1 ไมโครโมลาร์ (μM) ตามเกณฑ์ตัดค่าจำนวนรอบของการพบสารพันธุกรรมเพิ่มปริมาณที่ Ct cut-off 33 ± 1 รอบ ขณะที่ผลตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรคสัตว์สู่คนจำนวน 4 เชื้อในการทดสอบเพียงครั้งเดียวด้วยวิธี multiplex real-time PCR พบว่าความเข้มข้นของชุดไพรเมอร์และตัวติดตามต่อโรคที่ได้จากการปรับสภาวะมีค่าที่ 0.4 μM

ผลประเมินความถูกต้องของชุดตรวจ multiplex real-time PCR

ตารางที่ 4 แสดงผลประเมินปริมาณสารพันธุกรรมน้อยสุดของชุด multiplex real-time PCR ที่ไพรเมอร์และตัวติดตามทั้ง 3 ชุด (ชุดบูรเซลโลสิส/เลปโตสไปโรสิส/เมลิออยโดสิส/ทูลารีเมีย ชุดบูรเซลโลสิส/เลปโตสไปโรสิส/คิฟิเวอร์/สคริปไทฟัส และชุดบาร์โทเนลโลสิส/มิวรินไทฟัส/ริกเก็ตเซียโลสิส/สคริปไทฟัส) สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมสาเหตุเชื้อก่อโรคจากสัตว์สู่คนได้ 4 เชื้อ พร้อมกันในการทดสอบเพียงครั้งเดียวโดยสารพันธุกรรมที่พบอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0.01 pg ถึง $1,000$ pg ที่จำนวนรอบของการพบสารพันธุกรรมเพิ่มปริมาณที่ Ct น้อยกว่า 33 ± 1 รอบ อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยตรวจพบสารพันธุกรรมเชื้อ *Lep. interrogans* Australis/Thai tick typhus กับชุดไพรเมอร์และตัวติดตามสคริปไทฟัส และพบสารพันธุกรรมเชื้อ *Bur. cenocepacia*/*Bur. ubonensis* กับชุดไพรเมอร์และตัวติดตามบูรเซลโลสิส โดยจำนวนรอบที่พบสารพันธุกรรมดังกล่าวเพิ่มปริมาณที่ Ct มากกว่า 35 รอบ ซึ่งเกินเกณฑ์กำหนด

ตารางที่ 3 ค่าแสดงผลประเมินความถูกต้องของชุดตรวจ multidot-IFA

ผล IgM/IgG (multidot-IFA)	โรคสัตว์สู่คน/โรคอื่น ๆ (ผลตรวจยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ)									
	บูรเซลโลสิส	โรคอื่น ๆ	เมลิออยโดสิส	โรคอื่น ๆ	เลปโตสไปโรสิส	โรคอื่น ๆ	สคริปไทฟัส	โรคอื่น ๆ	มิวรินไทฟัส	โรคอื่น ๆ
ผลบวก	27	44	33	6	26	16	25	8	23	8
ผลลบ	2	73	5	102	3	101	0	113	2	113
ความไว	93.10% (27/29)	86.84% (33/38)	89.66% (26/29)	100.00% (25/25)	92.00% (23/25)					
ความจำเพาะ	62.39% (73/117)	94.44% (102/108)	86.32% (101/117)	93.39% (113/121)	93.39% (113/121)					
ความถูกต้อง	80.14% (117/146)	92.47% (135/146)	86.99% (127/146)	94.52% (138/146)	93.15% (136/146)					
ค่าทำนายผลบวก	38.03% (27/71)	84.62% (33/39)	66.90% (26/42)	75.76% (25/33)	74.19% (23/31)					
ค่าทำนายผลลบ	97.33% (73/75)	95.33% (102/107)	97.12% (101/104)	93.39% (113/121)	98.26% (113/115)					

จำนวนรอบ Ct cut-off ที่ 33±1

ขณะที่ชุดน้ำยา multiplex real-time PCR และชุดสารพันธุกรรมควบคุมบวกที่ใช้พัฒนาชุดตรวจ multiplex real-time PCR ทั้ง 3 ชุด ซึ่งถูกแบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C มีความคงทนอย่างน้อย 6 เดือน เมื่อทำการทดสอบ 2 ซ้ำต่อชุด ดังแสดงผลประเมินความเสถียรในตารางที่ 5

วิจารณ์

โรคสัตว์สู่คนที่มีความรุนแรงหรือสัตว์เป็นพาหะแหล่งรังโรคเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขซึ่งก่อให้เกิดโรคอุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำ โดยสาเหตุจากความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดระหว่างคนและสัตว์ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติของโลกซึ่งส่งผลกระทบต่อ การดำเนินชีวิตของแมลงพาหะ เนื่องจากพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่งผล

ให้แมลงพาหะมีกิจกรรมการเคลื่อนไหวกัดคนหรือสัตว์เพิ่มขึ้น^(16,17) ดังนั้น การพัฒนาและประเมินชุดตรวจโรค-สัตว์สู่คนที่ชนิดตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคหรือชนิดตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรคจึงมีประโยชน์ในการช่วยแพทย์วินิจฉัยโรคสัตว์สู่คนได้พร้อมกันอย่างน้อย 4 หรือ 5 โรคในการทดสอบเพียงครั้งเดียว ซึ่งนอกจากจะช่วยในการประหยัดปริมาณของตัวอย่างส่งตรวจที่มีปริมาณจำกัดแล้ว ยังช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายของการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการซึ่งต้องเลือกใช้ชุดตรวจเพื่อพิสูจน์ทราบโรคต้องสงสัยที่มีมากกว่า 1 โรคโดยชุด multidot-IFA ซึ่งถูกประยุกต์มาจากวิธีมาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค布鲁เซลโลสิส/เมล็อยโดสิส/เลปโตสไปโรสิส/สครับ-ไทฟัส/มีวรินไทฟัส พบว่ามีค่าความไวและความถูกต้องมากกว่าร้อยละ 80.0 ซึ่งเป็นผลประเมินที่เหมาะสมสูง

ตารางที่ 4 ผลประเมินปริมาณสารพันธุกรรมน้อยสุดที่ตรวจวัดได้และความจำเพาะของไพรเมอร์/ตัวติดตามที่ออกแบบ

ไพรเมอร์/ ตัวติดตาม	LOD (pg)	ความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมเชื้อ	≤Ct cut-off
บาร์โทเนลโลสิส	0.01	<i>Bar. henselae</i>	31.80
บรูเซลโลสิส	0.1-10	<i>Bru. abortus</i> , <i>Bru. melitensis</i> , <i>Bru. suis</i>	31.63, 32.51, 32.76
เมล็อยโดสิส	1-10	<i>Bur. pseudomallei</i> , <i>Bur. thailandensis</i>	30.19, 30.86
ค็อกซ์แซลลา	1	<i>Cox. burnetii</i>	33.32
ทูลารีเมีย	1-100	<i>F. tularensis</i> subsp.; <i>novicida</i> , <i>tularensis</i>	31.26, 30.12
เลปโตสไปโรสิส	0.1-1,000	<i>Leptospira</i> serovar; Australis, Autumnalis, Ballum Bataviae, Canicola, Cellidoni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Louisiana, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Shermani, Tarasoni, Semarang	32.34-32.93
สครับไทฟัส	1-100	<i>O. tsutsugamushi</i> strain; Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki, TA678, TA686, TA716, TH1817	32.34-32.93
มีวรินไทฟัส	1	<i>R. typhi</i> Wilmington	29.49
ริกเก็ตเซียโลสิส	100-1,000	<i>R. bellii</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. sibirica</i> , Thai Tick typhus	30.68-34.19

ตารางที่ 5 ผลประเมินความเสถียรของชุดตรวจ multiplex real-time PCR

ชุดตรวจ	โรคสัตว์สู่คน (ไพรเมอร์/ตัวติดตาม)	ค่าเฉลี่ย Ct 2 ซ้ำ ของชุด multiplex real-time PCR ณ วันที่เตรียมถึงเดือนที่ 6							
		0	1	2	3	4	5	6	
#1	บรูเซลโลสิส	17.18	17.79	18.58	18.54	20.78	18.20	17.90	
	เลปโตสไปโรสิส	20.11	19.92	22.36	21.32	23.50	17.36	20.77	
	เมลิโออยโดสิส	26.93	23.55	24.97	25.89	25.44	24.12	24.75	
	ทูลารีเมีย	22.54	26.29	26.48	24.40	27.14	24.95	26.27	
#2	บรูเซลโลสิส	17.26	17.86	18.25	18.77	18.55	18.60	18.48	
	เลปโตสไปโรสิส	19.83	19.57	23.00	19.48	21.74	20.64	21.09	
	คิฟิเวอร์	32.71	31.28	30.56	30.21	29.23	31.49	32.76	
	สคริปไทฟิส	23.46	22.92	24.24	23.93	22.21	24.18	25.26	
#3	บาริโทเนลโลสิส	17.57	18.99	17.67	18.73	17.47	17.63	18.21	
	มิวรินไทฟิส	21.99	22.74	22.96	22.39	23.60	23.24	23.11	
	ริกเก็ตซิโอสิส	30.18	33.07	32.64	32.83	ND	32.55	35.03	
	สคริปไทฟิส	23.03	22.81	24.11	23.08	22.92	24.27	24.51	

หมายเหตุ ND; not detect

เพียงพอที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคเพื่อช่วยให้แพทย์ทำการรักษาในเบื้องต้น แม้ว่าค่าความจำเพาะต่อการตรวจโรคบรูเซลโลสิสจะน้อยกว่าร้อยละ 63.0 เมื่อเปรียบเทียบกับโรคอื่น (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ ผลตรวจและชนิดของระดับภูมิคุ้มกันจากชุดตรวจ multidot-IFA ยังสามารถช่วยในการควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรค กล่าวคือ ระดับภูมิคุ้มกัน IgM จะถูกพบในระยะแรกของการติดเชื้อ ขณะที่ IgG จะคงอยู่ในร่างกายได้ยาวนานกว่า 1 ปี^(18,19) รวมทั้งยังช่วยในการพิสูจน์ทราบการติดเชื้อร่วมของโรคสัตว์สู่คนในผู้ป่วยที่มีประวัติสัมผัสโรค หรือผู้ป่วยกลุ่มอาการไขไม่ทราบสาเหตุ เช่น การพบรายงานผู้ป่วยติดเชื้อร่วมระหว่างโรคเลปโตสไปโรสิสกับเมลิโออยโดสิส^(20, 21) หรือการติดเชื้อร่วมมากกว่า 2 เชื้อจากรายงานการสืบค้นข้อมูล⁽²²⁾

สำหรับชุดตรวจ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 3 ชุดข้างต้น พบว่าไพรเมอร์และตัวติดตามที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีนของเชื้อแต่ละชนิดมีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนกับเชื้อที่ทราบสายพันธุ์จากฐานข้อมูลของ GenBank ที่ 100% และจากผลยืนยันการตรวจสอบ

ความจำเพาะของไพรเมอร์และตัวติดตามกับสารพันธุกรรมที่สกัดจากเชื้ออ้างอิงที่มีในห้องปฏิบัติการ ทั้งที่เป็นเชื้อในกลุ่มศึกษาและเชื้อนอกกลุ่มศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 1 คณะผู้วิจัยไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคอื่น ๆ ถูกสังเคราะห์เพิ่มจำนวนเมื่อใช้ไพรเมอร์และตัวติดตามทั้ง 9 ชุด ที่จำนวนรอบ Ct น้อยกว่า 33 รอบ แต่พบสารพันธุกรรมของเชื้อ *Bar. henselae*/*Brucella* spp. (3)/*Burkholderia* spp. (2)/*Cox. burnetii*/*F. tularensis* (2)/*Leptospira* spp. (24)/*O. tsutsugamushi* (9)/*R. typhi* Wilmington/*Rickettsia* spp. (5) ถูกสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ ดังแสดงจำนวนรอบ Ct ต่อชนิดของสารพันธุกรรมในตารางที่ 4 และจากผลการทดสอบพบปริมาณสารพันธุกรรมน้อยสุด (LOD) ที่ตรวจได้อยู่ในช่วง 0.01 pg ถึง 1,000 pg ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fujita และคณะ ที่ตรวจพบปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ *Francisella* spp. จำนวน 25 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 pg ถูกสังเคราะห์ที่ Ct 28-30 รอบ และจากผลวิจัยพบปริมาณน้อยสุดของสารพันธุกรรมที่ 20 และ 2 เฟมโตกรัม (fg) ในรอบ Ct ที่ 36

และ 38 รอบ ตามลำดับ⁽²³⁾ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ ปริมาณสารพันธุกรรมแปรผกผันกับจำนวนรอบของการสังเคราะห์ โดยสารพันธุกรรมจะเปลี่ยนแปลงทุก 10 เท่า เมื่อจำนวนรอบการสังเคราะห์สารพันธุกรรมเปลี่ยน 2-3 รอบ (10-fold/2-3 Ct)⁽²³⁻²⁵⁾ ขณะที่การกำหนดเกณฑ์ตัดค่าจำนวน รอบของการพบสารพันธุกรรมถูกสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ (Ct cut-off) นอกจากช่วยในการป้องกันผลบวกปลอมหรือผลลบปลอมแล้ว ยังมีความสำคัญต่อการแปลผลการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างผู้ป่วยติดเชื้อหรือไม่ติดเชื้อที่ต้องใช้ประกอบควบคู่กับการวินิจฉัยอาการทางคลินิกของแพทย์ผู้ทำการรักษา

กล่าวโดยเพิ่มเติม ชุดตรวจ multidot-IFA และ multiplex real-time PCR ที่พัฒนาและประเมินเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการเป็นชุดที่ใช้ตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันและสารพันธุกรรมเชื้อก่อโรค โดยชุด multidot-IFA ควรใช้ตรวจตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วย 2 ระยะ คือ เริ่มมีไข้ (acute phase) และหลังมีไข้ 14-21 วัน (convalescent phase) เพื่อดูระดับการเพิ่มขึ้น 4 เท่า ของภูมิคุ้มกันชนิด IgM/IgG ที่ร่างกายผู้ป่วยสร้างขึ้นเพื่อต้านทานโรค⁽²⁶⁾ แต่ด้วยข้อจำกัดของชุด multidot-IFA ที่อาจเกิดจากการแปลผลวิเคราะห์เมื่อพบตัวอย่างน้ำเหลืองทำปฏิกิริยากับเชื้อมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งระดับภูมิคุ้มกันผู้ป่วยอาจถูกแปลผลติดเชื้อร่วมหรือทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเชื้อ หรือกรณีตรวจวิเคราะห์แล้วไม่พบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อซึ่งอาจถูกแปลผลเป็นลบ การแปลผลตรวจกรณีสงสัยติดเชื้อร่วมสามารถดูผลต่างของระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อที่เพิ่มขึ้น 4 เท่าและยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานของเชื้อก่อโรคต้องสงสัยนั้น ๆ สำหรับกรณีไม่พบระดับภูมิคุ้มกัน ผู้วิเคราะห์ควรขอตัวอย่างผู้ป่วยครั้งที่ 2 เพื่อยืนยันระดับภูมิคุ้มกัน ซึ่งชุดตรวจนี้ช่วยในการสืบค้นสาเหตุเชื้อก่อโรคเบื้องต้นที่ช่วยลดระยะเวลาการสืบค้นโรคติดเชื้อ 5 โรค ภายในระยะเวลาน้อยกว่า 5 ชั่วโมงต่อตัวอย่างส่งตรวจ ขณะที่ชุด multiplex real-time PCR แม้ว่าจะมีราคาต้นทุนค่อนข้างสูง แต่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดก่อนผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะได้ทั้งโรคอุบัติ-

ใหม่ 4 โรค ได้แก่ บาร์โทเนลโลสิส ทูลารีเมีย คิวฟีเวอร์ หรือริกเก็ตเซียโอสิสที่พบรายงานในประเทศ เช่น ปี ค.ศ. 2008 Leelaporn และคณะรายงานผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ ซึ่งร่างกายมีภูมิต้านทานต่อโรคตำมีอาการไข้สูง 39°C ภายหลังรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ *Francisella novicida* ที่พิสูจน์ทราบจากการเพาะแยกเชื้อ และตรวจหาสารพันธุกรรม⁽²⁷⁾ ดังนั้น การเลือกใช้ชุด multiplex real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรคอุบัติใหม่หรืออุบัติซ้ำจะช่วยในการวินิจฉัยและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการจะพิจารณาเลือกใช้ชุดตรวจชนิดใดนั้นขึ้นกับระยะเวลาการเก็บตัวอย่างและชนิดตัวอย่างส่งตรวจ ประวัติและอาการผู้ป่วยต่อโรคต้องสงสัย เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการ

กล่าวโดยสรุป ชุดตรวจ multidot-IFA และ multiplex real-time PCR ที่ถูกพัฒนาและประเมินจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีความจำเพาะและความไวที่สูง ซึ่งเหมาะสมเพียงพอต่อการที่ห้องปฏิบัติการจะเลือกนำมาใช้เพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันหรือสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคได้มากกว่า 1 โรค ในการทดสอบเพียงครั้งเดียว นอกจากนี้ ชุดตรวจทั้ง 2 ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อหาระดับภูมิคุ้มกันร่วมหรือการติดเชื้อร่วมของผู้ป่วยกลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ ผู้ป่วยที่ทำกิจกรรมหรือพักอาศัยอยู่ในพื้นที่ของโรคประจำถิ่นที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือผู้ป่วยที่มีประวัติสัมผัสแหล่งรังโรค หรือใช้ในการศึกษาเพื่อควบคุมป้องกันและสืบค้นสัตว์รังโรคที่เป็นพาหะและอาจก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอุบัติใหม่ของประเทศ รวมทั้งยังสามารถนำไปพัฒนาเพื่อต่อยอดการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนโรคอื่น ๆ ได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Prof. Didier Raoult Unite des Rickettsies Universite de la Mediterranee Faculte de Medecine France และ ศ. พญ. ยุพิน ศุพุทธมงคล ภาค-

วิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มอบเชื้อ *Cox. burnertii* ซึ่งถูกทำให้หมดฤทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายทรัพยากรกลาง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ช่วยสนับสนุนและดำเนินการจัดเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดสอบความจำเพาะงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Manosuthi W, Thummakul T, Vibhagool A, Vorachit M, Malathum K. Brucellosis: A re-emerging disease in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2004;35:109-12.
- Visudhiphan S, Na-nakhon S. Brucellosis first case report in Thailand. J Med Assoc Thai 1970;53:289-93.
- Saisongkorh W, Wootta W, Sawanpanyalert P, Raoult D, Rolain JM. *Candidatus Bartonella thailandensis*: a new genotype of *Bartonella* identified from rodents. Vet Microbiol 2009;139:197-201.
- Paitoonpong L, Chitsomkasem A, Chantrakooptungool S, Kanjanahareutai S, Tribuddharat C, Srifuengfung S. *Bartonella henselae*: first reported isolate in a human in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2008;39:123-9.
- Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, et al. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. J Clin Microbiol 2008;46:772-5.
- Pachirat O, Fournier PE, Pussadhamma B, Taksina- chanekij S, Lulitanond V, Baggett HC, et al. The first reported cases of Q fever endocarditis in Thailand. Infect Dis Reports 2012;4:e7.
- Phimda K, Hoontrakul S, Suttinont C, Chareonwat S, Losuwanaluk K, Chueasuwanchai S, et al. Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3259-63.
- Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limma-thurotsakul D, Amornchai P, Smythe LD, et al. Short report: molecular confirmation of co-infection by pathogenic *Leptospira* spp. and *Orientia tsutsugamushi* in patients with acute febrile illness in Thailand. Am J Trop Med Hyg 2013;89:797-9.
- Wongphruksasoong V, Santayakorn S, Sitthi W, Chuxnum T, Pipatjaturong N, Kunthu A, et al. An outbreak of *Brucella melitensis* among goat farmers in Thailand, December 2009. OSIR 2012;5:14-21.
- Fuller Laboratories. Brucella [Internet]. [cited 2016 Oct 20]. Available from: www.fullerlabs.com/products/clinical/international/ic-brucella.
- Fast Track Diagnostics. FTD Tropical fever core [Internet]. [cited 2016 Oct 20]. Available from: www.fast-trackdiagnostics.com/media/373638/ftdmk2en20162-product-catalogue-web-version.pdf
- Haque QM. Evaluation of available diagnostic tests for melioidosis. JTU Med Sci 2010;5:89-97.
- Miraglia F, de Moraes ZM, Melville PA, Dias RA, Arruda S. EMJH medium with 5-fluorouracil and nalidixic acid associated with serial dilution technique used to recover *Leptospira* spp. from experimentally contaminated bovine serum. Braz J Microbiol 2009;40:189-93.
- สุมาลี บุญมา, วัชรีย์ สายสงเคราะห์, ไชยยันต์ เกสรดอกบัว, มงคล เจริญจิตติกุล, กรีสลีย์ พรรคทองสุข, กาญจนา อิ่มศิลป์. การศึกษาความชุกของแอนติบอดีต่อโรคมิวรินทัส (Murine typhus) ในสุนัขและแมวในเขตกรุงเทพมหานคร. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ 2540;9:85-90.
- Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, Tall A, Diatta G, Bassene H, et al. *Rickettsia felis*-associated unruptive fever, Senegal. Emerg Infect Dis 2010;16:1140-2.
- Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attacks and emergence of severe rickettsioses. POoS Negl Trop Dis 2008;2:e338.
- Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. Vet Res 2009;40:DOI:10.1051/vetres/2009017.

18. Chen HW, Zhang Z, Huber E, Mutumanje E, Chao CC, Ching WM. Kinetics and magnitude of antibody responses against the conserved 47-kilodalton antigen and the variable 56-kilodalton antigen in scrub typhus patients. *Clin Vaccine Immunol* 2011;186:1021-7.
19. Demma LI, McQuiston JH, Nicholson WL, Murphy SM, Marumoto P, Maireng J, et al. Scrub typhus, Republic of Palau. *Emerg Infect Dis* 2006;12:290-5.
20. Hin HS, Ramalingam R, Chunn KY, Ahmad N, Rahman JA, Mohamed MS. Case report: fatal co-infection-melioidosis and leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87:737-40.
21. Sopian M, Khairi MT, How SH, Rajalingam R, Sahhir K, Norazah A, et al. Outbreak of melioidosis and leptospirosis co-infection following a rescue operation. *Med J Malaysia* 2012;67:293-7.
22. Parker TM, Murray CK, Richards AL, Samir A, Ismai T, Dadeel MA, et al. Concurrent infections in acute febrile illness patients in Egypt. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77:390-2.
23. Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Francisella tularensis*. *Jpn J Infect Dis* 2006;59:46-51.
24. Saisongkorh W, El Karkouri K, Patrice JY, Bernard A, Rolain JM, Raoult D. Tryptose phosphate broth improves *Rickettsia felis* replication in mammalian cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:111-4.
25. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR [Internet]. Ohio: John Wiley&Sons, Inc.; 2008 [cited 2015 Nov 9]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470089941.et1003s00/full>
26. Chenchittikul M, Saisongkorh W. Comparative study of the Weil Felix (*Proteus vulgaris* OX19) test and indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of murine typhus. *Bull Dept Med* 1999;41:404-14.
27. Leelaporn A, Yongyod S, Limsrivanichakorn S, Yungyuen T, Kiratisin P. Emergence of *Francisella novicida* bacteremia, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1935-7.

Abstract: Development and Validate Method for Zoonoses Test Kits

Watcharee Saisongkorh, B.Sc., M.Sc., Ph.D. (Maladies Infectieuses); Wimol Petkanchanapong, B.Sc., M.Sc., Ph.D. (Medical Technology); Chonlada Mee-sub, B.Sc.; Suppaluk Yasaeng, B.Sc., M.Sc.; Wanwisa Kolahon, B.Sc.; Phanuwat Phudpong, B.Sc.; Wattanapong Wootta, B.Sc., M.Sc.; Decha Pangjai, D.V.M.; Somchai Sangkitporn, M.D., Dipl. Board in Clinical Pathology
Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand
Journal of Health Science 2017;26:621-33.

Since zoonoses or vector-borne diseases cause public health problems as emerging-reemerging diseases. Therefore, we developed and evaluated multidot-IFA for detecting antibody against brucellosis/melioidosis/leptospirosis/scrub typhus/murine typhus and three test kits of multiplex real-time PCR for detecting brucellosis/leptospirosis/melioidosis/tularemia, brucellosis/leptospirosis/Q fever/scrub typhus, or bartonellosis/murine typhus/rickettsioses/scrub typhus within one reaction. By evaluation, we found the stability of multidot-IFA slide could be sustained at -20°C for at least 12 months with the sensitivity was ranging from 86-100%. Whereas multiplex real-time PCR could detect pathogenic bacteria without cross reaction at Ct cut-off 33±1 which limit of detection was varied from 0.01 pg to 1,000 pf. Herein, we concluded that multidot-IFA and multiplex real-time PCR were highly sensitive and specific for the diagnosis of multiple bacterial infection within one reaction. Thus these test kits could be less time consuming and cost effective for the surveillance and control of emerging zoonoses.

Key words: zoonoses, multidot-IFA, multiplex real-time PCR