

การตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นโรคไข้หวัดนกโดยใช้ชุดทดสอบ สำเร็จรูปไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว

ทริกา จันทมนิโชติ* ลัดดา ตรงวงศา สุรศักดิ์ ชื่นใจ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 e-mail : tharikac@dld.go.th

บทคัดย่อ

ศึกษาชุดทดสอบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว(Innova® Flu – A) สำหรับตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไข้หวัดนกในสัตว์ปีก เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทางไวรัสวิทยา โดยการฉีดเข้าไขไก่ฟักในตัวอย่าง ไก่ เป็ด ห่าน และนกกระทา จำนวน 287 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่าง 2 ชุด คือ cloacal swab และ tracheal swab พบว่าชุดทดสอบมีค่า sensitivity เท่ากับ 93.40 และ 82.23 เปอร์เซ็นต์ specificity เท่ากับ 36.67 และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า positive predictive value เท่ากับ 76.35 และ 76.06 เปอร์เซ็นต์ และ negative predictive value เท่ากับ 71.74 และ 52.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการประเมินค่าความน่าเชื่อถือของชุดทดสอบ (relative liability) จากตัวอย่างตรวจทั้ง 2 ชนิด พบว่าการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างจาก cloacal swab เท่ากับ 7.96 ให้ผลดีกว่า tracheal swab ซึ่งเท่ากับ 3.51 เนื่องจากชุดทดสอบสำเร็จรูปมีขั้นตอนในการตรวจวินิจฉัยที่ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาเพียง 10-15 นาที จึงเหมาะที่จะนำไปตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น เพื่อคัดกรองสัตว์ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไข้หวัดนก โดยเฉพาะในช่วงที่เกิดการระบาด เพื่อประโยชน์ในการควบคุมโรคได้รวดเร็ว อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจยืนยันผลโดยวิธีการแยกเชื้อไวรัส

คำสำคัญ : การตรวจวินิจฉัย โรคไข้หวัดนก ชุดทดสอบสำเร็จรูปไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว

บทนำ

โรคไข้หวัดนก (avian influenza, bird flu, AI) เป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีก พบในไก่ไข่ ไก่เนื้อ ไก่วง ไก่ต๊อก เป็ด น่าน นกกระทา และนกในธรรมชาติ ซึ่งทำความเสียหายแก่อุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีกอย่างมาก เกิดจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A (Influenza type A) จัดอยู่ในกลุ่ม Orthomyxoviridae ซึ่งเป็น RNA ไวรัสชนิดมีเปลือกหุ้ม โดยมีแอนติเจนที่สำคัญ ได้แก่ Hemagglutinin (H) 15 ชนิดและ Neuraminidase (N) 9 ชนิด (Dybing et al., 2000) ชนิดที่พบการติดเชื้อรุนแรงในสัตว์ปีกได้แก่ H5 และ H7 มีรายงานการการระบาดของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ครั้งแรกในปี ค.ศ.1997 ที่ฮ่องกง (Suarez et al., 1998) จนถึงปัจจุบันยังพบการระบาดอย่างต่อเนื่องในทวีปเอเชีย ยุโรป และ แอฟริกา นอกจากนี้ยังมีรายงานการป่วยและเสียชีวิตของคนที่ได้รับเชื้อไวรัสชนิดนี้ในบางประเทศ เช่น เวียดนาม ไทย กัมพูชา อินโดนีเซีย (WHO, 2005)

สัตว์ปีกที่ติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 มักจะตายด้วยสาเหตุติดเชื้อทั่วร่างกาย (septicemia) และระบบหัวใจและระบบหายใจล้มเหลว (cardio-pulmonary failure) ลักษณะภายนอกพบว่า หงอน เหนียง และบริเวณหน้าของสัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่จะมีสีคล้ำ (cyanosis) เปลือกตาบวมอักเสบ มีน้ำมูกน้ำตาไหล อาจพบจุดเลือดออกบริเวณแข้งไก่ เป็ด และในกล้ามเนื้อ บางตัวแสดงอาการทางประสาทได้แก่ ชักก่อนตาย การแยกเชื้อไวรัส (viral isolation) และการพิสูจน์เชื้อไวรัส (viral identification) ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การฉีดเข้าไขไก่ฟัก หรือโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง และการพิสูจน์เชื้อด้วยวิธี Hemagglutination - Hemagglutination inhibition test (HA-HI test) นอกจากนี้ยังมีวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไข้หวัดนกด้วยวิธี Reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT – PCR), Realtime PCR การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไข้หวัดนก ในเนื้อเยื่อสัตว์ป่วยโดยตรง เช่น วิธี immunohistochemistry (ทวิคักดี และคณะ 2547) วิธีการขั้นสูงที่กล่าวมามีข้อจำกัดคือ ใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูง และทดสอบได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้น จึงมีการนำชุดทดสอบสำเร็จรูปไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว (rapid Influenza A test kit) เพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ชุดทดสอบมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก และสามารถวินิจฉัยโรคได้ภายใน 10-15 นาที ซึ่งเป็นการวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามีการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ A แต่ไม่สามารถบอกชนิดของ subtype ได้ ชนิดของชุดทดสอบมีเกือบ 10 ชนิด ผลิตในสหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่น (Hamilton et al., 2002 ; Quach et al., 2002 ; Cazacu et al., 2003) ผลิตในประเทศไทยมี 2 ชนิด ใช้หลักการ เอนไซม์อิมมูโนเอสเสย์ หรือ อีไอเอ เช่น Directigen™ Flu A หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟี หรือ ไอซีที เช่น Binax NOW® Flu A, Quick Vue® Influenza test, Bioline® influenza A และ Innova® Flu-A เป็นต้น ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขได้มีการนำชุดทดสอบสำเร็จรูป Directigen™ Flu A และ NOW® Flu A มาใช้คัดกรองเบื้องต้น ผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อไข้หวัดนก (ศิริรัตน์ และสมนมาลย์, 2548) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ A ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปในอเมริกา เช่น Directigen™ Flu A (Waner

et al.,1991) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ Binax NOW[®] และ Directigen[™] Flu A (Landry et al., 2004) และ Weinberg and Walker (2005) ศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B โดยใช้ชุดทดสอบ BD Directigen[™] Flu A+B, Directigen EZ[™] Flu A-B และ NOW[®] Flu A และ NOW[®] Flu B ส่วนทางด้านปศุสัตว์ Morley et al. (1995) ได้นำชุดทดสอบสำเร็จรูป Directigen[™] Flu A มาตรวจวินิจฉัยไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B ในม้า และ McCabe et al. (2006) ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบสำเร็จรูป Binax NOW[®] Flu A เพื่อวินิจฉัยโรคไข้หวัดใหญ่ A ในลูกม้า สำหรับชุดทดสอบสำเร็จรูป Innova[®] Flu-A ยังไม่มีรายงานการประเมินประสิทธิภาพด้านการชันสูตรโรคไข้หวัดนก ในสัตว์ปีกในประเทศไทยมาก่อน การทดสอบครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบดังกล่าว โดยเปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าไขไก่ฟ้า ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานตามข้อกำหนด OIE เพื่อประโยชน์ในการควบคุมโรคไข้หวัดนกได้อย่างรวดเร็ว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่าง : เก็บตัวอย่าง swab จากสัตว์ปีก ได้แก่ ไก่ เป็ด ห่านและนกกระทา ที่ส่งชันสูตรและจากโครงการเฝ้าระวังไข้หวัดนก ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ระหว่างกรกฎาคม-ตุลาคม 2547 จำนวน 287 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำการเก็บ 2 ชุด คือ cloacal swab และ tracheal swab จากนั้นทำการผ่าซากและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนของหลอดลม ปอด ตับ ม้าม ไต ตับอ่อน สมอง และทางเดินอาหาร เพื่อนำส่งตรวจแยกเชื้อไวรัส

การทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ : เป็นชุดตรวจสอบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว (Innova[®] Flu – A)* ซึ่งประกอบด้วย ตลับตรวจบรรจุในซองอลูมิเนียมพร้อมหลอดหยด ขวดบรรจุน้ำยาสกัด (Extraction reagent) 2 ขวด คือ น้ำยาขวดที่ 1 (ฉลากสีแดง) และน้ำยาขวดที่ 2 (ฉลากสีเขียว) โดยใช้หลักการอิมมูโนโครมาโตกราฟีบนเมมเบรน ซึ่งมีส่วนของชุดทดสอบที่ใช้ทำปฏิกิริยาอ่านผลทำเป็นตลับตรวจ ประกอบด้วยแผ่นเมมเบรนบรรจุอยู่ภายใน บนเมมเบรนจะมีแอนติบอดีที่จับกับสารซึ่งจะแสดงสีเมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้น โดยนำไปทำให้แห้งและตรึงไว้สองแนว ๆ ละหนึ่งแอนติบอดี คือ แอนติบอดีต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A (test line) และแอนติบอดีสำหรับควบคุมปฏิกิริยา (control line) เมื่อมีการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างตรวจที่มีแอนติเจน จะแสดงให้เห็นแถบสีชมพู มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 เก็บ cloacal swab แล้วจุ่ม swab ลงในหลอดทดสอบที่มีน้ำยา phosphate buffered saline (PBS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ส่วน tracheal swab ดำเนินการเช่นเดียวกัน
- 1.2 หมุนไม้ swab ไปมาประมาณ 5-10 ครั้ง เพื่อให้น้ำยาผสมกับตัวอย่างแล้วคั้นเอาน้ำออกจากปลายไม้ โดยการหมุนปลายสำลิจัดกับข้างหลอดก่อนจะดึงไม้ swab ออก

1.3 ดูตัวอย่างในข้อ 1.2 จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่เตรียมไว้

1.4 เติมน้ำยาขวดที่ 1 (ฉลากสีแดง) จำนวน 1 หยด ลงในหลอดในข้อ 1.3 ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอด

1.5 เติมน้ำยาขวดที่ 2 (ฉลากสีเขียว) จำนวน 3 หยด ลงในหลอดในข้อ 1.4 ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอด แล้วนำไปตรวจโดยใช้ตลับตรวจทันที

2. ขั้นตอนการทดสอบ

2.1 ฉีกซองบรรจุตลับตรวจ (รูปที่ 1) แล้วนำตลับวางบนพื้นราบ

2.2 ใส่ตัวอย่างที่ผสมแล้ว(ข้อ 1.5) จำนวน 6 หยด ลงในกลางหลุมที่ตำแหน่ง S ของตลับตรวจ

2.3 รอ 10 – 15 นาที แล้วอ่านผล โดยดูแถบสีชมพูในช่องอ่านผลตรงตำแหน่ง T (แถบทดสอบ หรือ Test line) และ C (แถบควบคุม หรือ Control line)

การอ่านผล : ปรากฏ 2 แถบที่ตำแหน่ง T และ C ถือเป็น บวก (positive) โดยไม่คำนึงถึงความเข้มของแถบ

: ปรากฏแถบ เพียงตำแหน่งเดียวที่ C ถือเป็น ลบ (negative)

รูปที่ 1 แสดงตลับตรวจและการอ่านผล



การอ่านผล

- + + +

การทดสอบโดยวิธีฉีดเข้าไขไก่ฟัก

นำตัวอย่างจากการผ่าซากมาบดรวมกัน โดยเตรียมเป็น 10% organ suspension ใน PBS นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็ว 2,500 rpm นาน 5 นาที แล้วเก็บน้ำใสส่วนบนแล้วเติมยาปฏิชีวนะทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปฉีดเข้าไขไก่ฟักอายุ 9-11 วัน ตรวจสอบการมีชีวิตของตัวอ่อนทุกวัน หากตัวอ่อนตาย ดูด allantoic fluid เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสโดยวิธี HA - test หากให้ผลบวกจึงนำมาตรวจด้วยวิธี HI - test เพื่อพิสูจน์ว่าเป็นโรคไข้หวัดนกหรือนิวคาสเซิล (Easterday and Hinshaw, 1991) ต่อไป

วิธีแปลผลของชุดทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับผลการแยกเชื้อ :

true positive หมายถึง ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบ ให้ผลบวกสอดคล้องกับ วิธีฉีดเข้าไขไก่อัก

false positive หมายถึง ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบเป็นบวก แต่วิธีฉีดเข้าไขไก่อักให้ผลลบ

true negative หมายถึง ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบ ให้ผลลบสอดคล้องกับ วิธีฉีดเข้าไขไก่อัก

false negative หมายถึง ผลการตรวจด้วยชุดทดสอบเป็นลบ แต่วิธีฉีดเข้าไขไก่อักให้ผลบวก

การคำนวณค่าทางสถิติ

คำนวณผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว เปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าไขไก่อัก โดยคำนวณค่า sensitivity ,specificity, positive predictive value, negative predictive value และ relative liability (สมชาย, 2525 ; Fleiss, 1981 ; Galen, 1979) ดังนี้

$$\text{Sensitivity (\%)} = \frac{\text{จำนวน true positive}}{\text{จำนวน true positive} + \text{จำนวน false negative}} \times 100$$

$$\text{Specificity (\%)} = \frac{\text{จำนวน true negative}}{\text{จำนวน true negative} + \text{จำนวน false positive}} \times 100$$

$$\text{Positive predictive value (\%)} = \frac{\text{จำนวน true positive}}{\text{จำนวน true positive} + \text{จำนวน false positive}} \times 100$$

$$\text{Negative predictive value (\%)} = \frac{\text{จำนวน true negative}}{\text{จำนวน true negative} + \text{จำนวน false negative}} \times 100$$

$$\text{Relative liability} = \frac{(\text{จำนวน true positive} + 0.5) (\text{จำนวน true negative} + 0.5)}{(\text{จำนวน false positive} + 0.5) (\text{จำนวน false negative} + 0.5)}$$

ผล

ผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไข้หวัดนก โดยใช้ชุดทดสอบ Innova® Flu-A เปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าไขไก่อัก จำนวน 287 ตัวอย่าง พบว่าการตรวจโดยวิธีฉีดเข้าไขไก่อักให้ผลบวก จำนวน 197 ตัวอย่าง ให้ผลลบ จำนวน 90 ตัวอย่าง ส่วนผลการตรวจด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูปจากตัวอย่าง cloacal swab ให้ผลบวก จำนวน 241 ตัวอย่าง ให้ผลลบ จำนวน 46 ตัวอย่าง และจากตัวอย่าง tracheal swab ให้ผลบวก จำนวน 213 ตัวอย่าง และให้ผลลบ จำนวน 74 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว จากตัวอย่าง cloacal swab และ tracheal swab เปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าไขไก่อ่ฟัก

Rapid test	No. of specimens with indicated result by viral isolation		
	positive	negative	Total
Cloacal swab			
Positive	184	57	241
Negative	13	33	46
Total	197	90	287
Tracheal swab			
Positive	162	51	213
Negative	35	39	74
Total	197	90	287

เมื่อนำผลทดสอบมาคำนวณหาค่า sensitivity, specificity, positive predictive value และ negative predictive value จาก cloacal swab พบว่า มีค่าเท่ากับ 93.40, 36.67, 76.35 และ 71.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างจาก tracheal swab เท่ากับ 82.23, 43.33, 76.06 และ 52.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณค่าประสิทธิภาพของชุดทดสอบ (relative liability) พบว่ามีค่าเท่ากับ 7.96 และ 3.51 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ relative liability จากชุดทดสอบสำเร็จรูปไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ชนิดให้ผลรวดเร็ว เปรียบเทียบกับวิธีฉีดเข้าไขไก่อ่ฟัก

sample	Percent				Relative liability
	sensitivity	specificity	PPV ^a	NPV ^b	
Cloacal swab	93.40	36.67	76.35	71.74	7.96
Tracheal swab	82.23	43.33	76.06	52.70	3.51

a : positive predictive value

b : negative predictive value

วิจารณ์

จากตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการแยกเชื้อไวรัส โดยวิธีฉีดเข้าไขไก่อ่ฟัก จำนวน 197 ตัวอย่าง พบว่าผลการตรวจด้วยชุดทดสอบจากตัวอย่าง cloacal swab ให้ผล true positive จำนวน 184 ตัวอย่าง และ tracheal swab ให้ผล true positive จำนวน 162 ตัวอย่าง บ่งชี้ว่า ตัวอย่างจาก cloacal swab ให้ผลสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อไวรัสมากกว่า tracheal swab ทั้งนี้เนื่องจาก การเก็บตัวอย่าง tracheal swab มีความยุ่งยากกว่าและต้องอาศัยความชำนาญ จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตรวจพบเชื่อน้อยกว่า ส่วนตัวอย่างที่ให้ผลการแยกเชื้อไวรัสเป็นลบ ซึ่งมีจำนวน 90 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างจาก cloacal swab ให้ผล true negative จำนวน 33 ตัวอย่าง และ tracheal swab ให้ผล true negative จำนวน 39 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่า การตรวจวินิจฉัยโดยใช้ชุดทดสอบในครั้งนี้ ให้ผลลบสอดคล้องกับผลการแยกเชื้อไวรัสค่อนข้างต่ำ สาเหตุส่วนหนึ่งอาจมีความคลาดเคลื่อนจากชุดทดสอบเอง เนื่องจากเป็นชุดทดสอบที่ใช้สำหรับตรวจเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ทุกชนิด ดังนั้นผลการวินิจฉัยจากชุดทดสอบ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่า สัตว์ติดเชื้อไข้หวัดนกหรือไม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสุ่มตัวอย่างจากฟาร์ม เพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายแก่ปศุสัตว์ จึงควรตรวจยืนยันผลด้วยวิธีมาตรฐานทางไวรัสวิทยา

เมื่อนำผลการตรวจมาประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบ (ตารางที่ 2) พบว่าตัวอย่าง cloacal swab และ tracheal swab มีค่า sensitivity เท่ากับ 93.40 เปอร์เซ็นต์ และ 82.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนค่า specificity จากตัวอย่าง cloacal swab และ tracheal swab เท่ากับ 36.67 เปอร์เซ็นต์ และ 43.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้ ผลการประเมินดังกล่าว มีค่า sensitivity สูง แต่ specificity ต่ำกว่าการรายงานในเอกสารคู่มือการใช้งานของชุดทดสอบนี้ ที่รายงานว่ามี sensitivity 75-80 เปอร์เซ็นต์ และ specificity 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของ swab ปริมาณและระยะเวลาของการติดเชื้อ อีกทั้งการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบตัวอย่างในช่วงที่มีการระบาดของโรค กลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ จึงเป็นกลุ่มที่มีโอกาสเป็นโรคสูง ดังนั้นเมื่อนำผลการทดสอบมาประเมิน จึงพบว่ามีค่า sensitivity สูง และ specificity ต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า ชุดทดสอบนี้จะให้ผลแม่นยำมากขึ้น เมื่อทดสอบกับตัวอย่างจาก allantoic fluid และให้ผล false negative สูงในไก่ที่ไม่แสดงอาการป่วย (วาสนา 2547) เช่นเดียวกับการรายงานของ McCabe (2006) พบว่า เมื่อใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Binax NOW[®] Flu A ทดสอบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ A ในลูกม้า พบว่าในระยะ 1-2 วันแรกที่ลูกม้าได้รับเชื้อการตรวจด้วยชุดทดสอบจะให้ผลลบ และอาจพบ false positive จากการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสชนิดอื่นด้วย อีกทั้งชุดทดสอบ Innova[®] Flu-A ใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A จึงให้ผลบวกต่อแอนติเจนของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A ได้ทุกชนิด ไม่เฉพาะแต่ H5N1 เท่านั้น ดังนั้นในการสำรวจและเฝ้าระวังโรคไข้หวัดนก จึงควรเลือกเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปีกที่มีอาการป่วยและสงสัยว่าติดเชื้อ น่าจะมีโอกาสตรวจพบ true positive ได้มากกว่า

สำหรับค่า positive predictive value นั้น เป็นค่าทำนายผลบวกของการตรวจคัดกรองด้วยชุดทดสอบ ซึ่งจริงๆ แล้ว มีทั้ง true positive และ false positive อยู่รวมกัน ดังนั้น ในการที่อยากจะทราบว่าในบรรดาสัตว์ปีกที่ชุดทดสอบระบุว่าโรคนั้น น่าจะมีสัตว์ป่วยจริง (true positive) อยู่กี่เปอร์เซ็นต์ ในทำนองเดียวกัน ค่า negative predictive value จึงเป็นค่าทำนายผลลบจากการตรวจด้วยชุดทดสอบ ซึ่งมีทั้ง true negative และ false negative อยู่รวมกัน เพื่อทราบว่าในบรรดาสัตว์ปีกที่ชุดทดสอบระบุว่าไม่ป่วยนั้น มี true negative กี่เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาค้างนี้ พบว่าตัวอย่างจาก cloacal swab มีค่า positive predictive value และ negative predictive value สูงกว่า tracheal swab กล่าวคือ ตัวอย่างจาก cloacal swab มีค่า positive predictive value และ negative predictive value เท่ากับ 76.35 เปอร์เซ็นต์ และ 71.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน tracheal swab เท่ากับ 76.06 เปอร์เซ็นต์ และ 52.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ บ่งชี้ว่าถ้านำชุดทดสอบนี้ ไปตรวจคัดกรองฝูงสัตว์ป่วยและปกติที่อยู่รวมกัน การตรวจตัวอย่างจาก cloacal swab จะให้ผลสอดคล้องกับการแยกเชื้อไวรัสมากกว่า tracheal swab ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการสุ่มตัวอย่างทำในช่วงที่เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนก ประกอบกับเป็นช่วงเปลี่ยนฤดูกาล ทำให้สัตว์ปีกที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยส่วนใหญ่มีอาการทางระบบหายใจคือ มีน้ำมูก ไอ จาม และหลอดลมอักเสบ การเก็บ tracheal swab จึงมี mucus มาก ซึ่งอาจไปบดบังแอนติเจน หรืออาจทำให้การซึมผ่านเมมเบรนของตัวอย่างสกัดมีปัญห ทำให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อนได้ มีผลให้ตรวจพบ false negative สูง เป็นผลให้ค่า negative predictive value ต่ำ อย่างไรก็ตามค่า predictive value จากการทดสอบในครั้งนี้นี้ยังต่ำกว่าการประเมินชุดทดสอบชนิดอื่น ดังรายงานของ Todd et al. (1995) และ Waner et al. (1991) ที่รายงานค่า positive predictive value และ negative predictive value ของ Directigen™ Flu A พบว่ามีค่า 85 – 94 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Quach et al. (2002) ที่ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป Quick Vue® ชนิด Flu A+B ตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A พบว่า ค่า positive predictive value ต่ำ (49.40 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ negative predictive value สูง (94.90 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากสามารถให้ผลบวกได้ทั้งไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B

นอกจากนี้ค่า positive predictive value และ negative predictive value ยังให้ผลสอดคล้องกับค่าประสิทธิภาพของชุดทดสอบ (relative liability) หรือค่าความเป็นไปได้สัมพัทธ์ ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างค่าที่เป็นไปตามความจริงกับค่าที่ผิดพลาด พบว่าผลการใช้ตัวอย่างจาก cloacal swab มีประสิทธิภาพสูงกว่า (7.96) tracheal swab (3.51) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป ขึ้นอยู่กับข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น ชนิดของชุดทดสอบ การเลือกชนิดของตัวอย่างที่เหมาะสม คุณภาพของตัวอย่าง ปริมาณเชื้อที่มีในตัวอย่าง เช่น ในระยะแรกที่สัตว์เริ่มปรากฏอาการป่วยภายใน 3-5 วัน จะมีเชื้อออกมาเป็นจำนวนมาก การเก็บตัวอย่างในระยะนี้มีโอกาสให้ผล true positive สูง (ศิริรัตน์และสุมนมาลย์, 2548) นอกจากนี้ ความคลาดเคลื่อนยังอาจเกิดจากผู้ทดสอบเอง เนื่องจากเป็นช่วงที่เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนก ตัวอย่างที่ส่งมาตรวจมีปริมาณมาก จึงต้องอาศัยผู้ทดสอบตัวอย่าง

หลายคนซึ่งมีประสบการณ์และความชำนาญแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามผลการทดสอบที่ได้ จากการใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปจึงถือเป็นการคัดกรองเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถบ่งชี้แน่ชัดได้ว่า สัตว์เป็นโรคหรือไม่ ควรมีการตรวจยืนยันผลอีกครั้ง ด้วยวิธีมาตรฐานทางไวรัสวิทยา

สรุป

จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า ตัวอย่างจาก cloacal swab มีประสิทธิภาพดีกว่า tracheal swab ซึ่งในการคัดกรองเบื้องต้นโรคไข้หวัดนกนี้ ผลที่ได้ไม่สามารถยืนยันแน่นอนได้ว่าตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเป็นโรคไข้หวัดนก และตัวอย่างที่ให้ผลลบ ก็ไม่สามารถยืนยันแน่นอนได้ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง อย่างไรก็ตามชุดทดสอบนี้ เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ภาคสนาม ในช่วงมีการระบาดเพื่อควบคุมโรคได้รวดเร็ว เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้สารเคมีหรืออุปกรณ์การทดสอบที่อาศัยผู้เชี่ยวชาญและให้ผลรวดเร็วภายใน 10-15 นาที นอกจากนี้ยังเหมาะสำหรับหน่วยงานที่มีข้อจำกัดเรื่องเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตรวจภาคสนามนั้น ควร swab รวมกันหลายๆตัวอย่างในฟาร์มเดียวกัน จะทำให้มีโอกาสได้ผลชันสูตรที่ถูกต้องมากกว่าการแปลผลรายตัว ในส่วนของห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา การชันสูตรตัวอย่างด้วยชุดทดสอบก่อนผ่าซากจะเป็นการช่วยคัดกรองเบื้องต้น เพื่อประกอบการชันสูตรโรคและการส่งตัวอย่างเพื่อชันสูตรในห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้อง รวมถึงการคัดแยกและทำลายซากอย่างถูกวิธี ในส่วนของผู้เกี่ยวข้องที่จะนำชุดทดสอบนี้ไปใช้ จะต้องมีการศึกษาวิธีใช้อย่างละเอียด รวมทั้งมีการเก็บและเตรียมตัวอย่างที่ถูกวิธี เพื่อให้ผลการทดสอบถูกต้องที่สุด ทั้งนี้จะต้องตรวจยืนยันผลการแยกเชื้อไวรัส ที่เป็นวิธีมาตรฐานในการชันสูตรโรคไข้หวัดนกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.สพ.ชัยศิริ มหันตชัยสกุล น.สพ.ชิต ศิริวรรณ ผศ.น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนาภินัน และสพ.ญ. ดร.สุดารัตน์ ดำรงค์วัฒนาภินัน ที่กรุณาให้คำแนะนำวิธีคำนวณค่าทางสถิติ รวมทั้ง สพ.ญ.จิรา คงครอง สพ.ญ.สนทนา มิมะพันธุ์ และเจ้าหน้าที่กลุ่มพยาธิวิทยา ที่ช่วยเก็บตัวอย่างตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- ทวีศักดิ์ ส่งเสริม นาดิ แซ่เฮง และ รุ่งโรจน์ แจ่มอัน. 2547. ไข้หวัดใหญ่สัตว์ปีก (Avian influenza) : พยาธิวิทยาและการวินิจฉัยโรค. สัตวแพทยสาร 55 (1) : 1 – 8.
- วาสนา ภิญญชนม์. 2547. การวินิจฉัยและชันสูตรโรคไข้หวัดนก. จดหมายข่าวสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. ปีที่ 3 (ฉบับพิเศษ) : 1-4.
- ศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล และ สุนนมาลย์ อุทยมกุล. 2548. การตรวจคัดกรองเบื้องต้นด้วยชุดทดสอบการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิดเอ สำหรับการดูแลรักษาและวินิจฉัยผู้ที่สงสัยว่าติดเชื้อไข้หวัดนก. แพทยสมาคมสาร 34 (2) : 119 – 131.
- สมชาย สุพันธุ์วณิช. 2525. การประเมินเครื่องมือและเครื่องทดสอบ. หลักสูตรอาชีวศึกษา. โรงพิมพ์สามมิตร ท่าพระ กรุงเทพฯ. หน้า 231-256.
- Cazacu, A.C., Greer, J., Taherrivand, M. and Demmler, G. 2003. Comparison of lateral-flow immunoassay and enzyme immunoassay with viral culture for rapid detection of influenza virus in nasal wash specimens from children. J. Clin. Microbiol. (41) 5 : 2132 – 2134.
- Dybing, J.K., Schultz, C., S., Swayne, D.E., Suarez, D.L. and Perdue, M.L. 2000. Distinct pathogenesis of Hong Kong origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. J. Virol. 74 (3) : 1443 – 1450.
- Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S. 1991. Influenza. In : Disease of Poultry. 9th ed. by B.W. Calnek, H. J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder. Wolfe Publishing Ltd., London, England. p. 532 -551.
- Fleiss, J.L. 1981. Statistical method for rates and proportions. 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., New York, USA. p. 291 – 225.
- Galen, R.S. 1979. The predictive value of laboratory testing. Orthop. Clin. N. Am. 10:287 - 297.
- Hamilton, M.S., Abel, M.D., Ballam, Y.J., Otto, M.K., Nickell, A.F., Pence, L.M., Appleman, J.R., Shimasaki, C.D. and Achyathan, K.E. 2002. Clinical Evaluation of the Zstat[®] Flu-II test : a chemiluminescent rapid diagnostic test for influenza virus. J. Clin. Microbiol. 40(7):2331 – 2334.
- Landry, M.L., Cohen, S. and Ferguson, D. 2004. Comparison of Binax NOW[®] and Directigen[™] of influenza A and B. J. Clin. Virol. 31:113 – 115.

- McCabe, V.J., Sindler, T. and Daly, J.M. 2006. Evaluation of the Binax NOW[®] Flu A test kit for the rapid detection of equine influenza virus. *Vet. Rec.* 158:164 – 165.
- Morley, P.S., Bogdan, J.R., Townsend, H.G. and Haines, D.M. 1995. Evaluation of Directigen[™] Flu A assay for detection of influenza A antigen in nasal secretions of horse. *Equine Vet. J.* 27:131 – 134.
- OIE. 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) Vol. 5th Paris, France. p.258 – 269.
- Quach, C., Newby, D., Daoust, G., Rubin, E. and McDonald, J. 2002. Quick Vue[®] influenza test for rapid detection of influenza A and B viruses in a pediatric population. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(4) 925 – 926.
- Suarez, D.L., Perdue, M.L., Cox, N., Rowe, T., Bender, C., Huang, J. and Swayne, D.E. 1998. Comparison of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J. Virol.* 72 : 6678 – 6688.
- Todd, S.J., Minnich, L. and Waner, J.L. 1995. Comparison of rapid immunofluorescence procedure with Test Pack RSV[®] and Directigen[™] Flu A for diagnosis of respiratory syncytial virus and influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.* 33(6) : 1650-1651.
- Waner, J.L., Todd, S.J., Shalaby, H., Murphy, P. and Wall, L.V. 1991. Comparison of Directigen[™]Flu A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.* 29(3):479 – 482.
- Weinberg, A. and Walker, M.L. 2005. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(3) : 367-370.
- World Health Organization (WHO). 2005. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.* 353 : 1374 – 1385.

Presumptive Diagnosis of H5N1 Avian Influenza by Rapid Influenza A Test Kit

Tharika Chantamaneechote* Ladda Trongwongsa Surasak Chuenjai

National Institute of Animal Health, Kaset Klang, Chatuchak, Bangkok 10900

*corresponding author: 0-2579-8908-14, e-mail : tharikac@dld.go.th

Abstract

Rapid Influenza A test kit (Innova[®] Flu-A) for detection of influenza antigen was studied in comparison with standard viral isolation method by egg inoculation. A total of 287 samples each of cloacal swabs and tracheal swabs were collected from the same animal including chickens, ducks, geese and quails. It was found that the test kit showed 93.40% and 82.23% sensitivity and 36.67% and 43.33% specificity, respectively. While positive predictive values were 76.35% and 76.06%, and negative predictive values were 71.74% and 52.70% samples, respectively. The cloacal swabs were better samples than tracheal swabs as indicated by relative liability value, 7.96 and 3.51 respectively. The test kit is simple and required only 10 to 15 minutes for completion, therefore it is a useful tool for screening of the avian influenza suspected animals in order to perform eradication and control of the disease rapidly. However, it should be confirmed by viral isolation.

Key word : diagnosis, avian influenza, rapid Influenza A test kit