การสอบเทียบการตรวจโรคนิวคาสเซิลระหว่างห้องปฏิบัติการจำนวน 7 แห่ง

Comparative Test of Newcastle Disease Diagnosis in 7 Diagnostic Laboratories

รัชนีกร จันทร์ดำ อารี ทรัพย์เจริญ รื่นฤดี บุณยะโหตระ

Rachaneekorn Chandum Aree Subcharoen Ruenrudee Punyahotra

Abstract

Comparative test of Newcastle disease diagnosis was undertaken to evaluate the accuracy of laboratories diagnosis by standard technique of virus isolation. The total of 26 samples were submitted to 7 regional laboratories. All samples were confirmed by laboratory testing at National Institute of Animal Heath (NIAH) before sending to these laboratories. The results revealed that the diagnostic results from 3 laboratories were agreed with NIAH results, while the others were various level of agreement. From the study , it was concluded that diagnostic procedure and other factors influencing the diagnostic results should be considered in some laboratories.

Key word : Comparative test , Newcastle disease , diagnostic laboratories

บทคัดย่อ

ทำการสอบเทียบงานทดสอบโรคนิวคาสเซิลระหว่างห้องปฏิบัติการตามภูมิภาคต่างๆ จำนวน 7 แห่ง โดยส่งตัวอย่างทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างทั้งที่เป็นบวกและลบผ่านการทดสอบโดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ผลการสอบเทียบพบว่ามีห้องปฏิบัติการ 3 แห่งที่ให้ผลถูกต้องทุกตัวอย่าง ส่วนห้องปฏิบัติการที่เหลือให้ผลความสอดคล้องในระดับต่างกัน ผลดังกล่าวสรุปได้ว่าห้องปฏิบัติการ

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

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

ทดสอบโรคนิวคาสเซิลจำเป็นต้องทบทวนวิธีการและปรับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดสอบเพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน

คำสำคัญ : การสอบเทียบ โรคนิวคาสเซิล ห้องปฏิบัติการ

คำนำ

โรคนิวคาสเซิลเป็นโรคสำคัญที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในแต่ละปีเป็นจำนวนมาก สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อนิวคาสเซิลซึ่งเป็นไวรัสใน family Paramyxoviridae ความรุนแรงรวมทั้งอาการของโรคพบในหลายระบบขึ้นอยู่กับชนิด (strain) ของเชื้อและชนิด (species) ของสัตว์ปีก (Castro and Heuschele , 1992) การเกิดโรคในแต่ละครั้งทำให้สัตว์ตายเป็นจำนวนมากและเนื่องจากตลาดต่างประเทศยังไม่มั่นใจในสภาวะของโรคนิวคาสเซิลในประเทศ ภาวะดังกล่าวทำให้ประเทศไทยต้องปรับกลยุทธ์ในการดำเนินการขยายตัวทางเศรษฐกิจโดยเพิ่มศักยภาพในการควบคุมและเฝ้าระวังโรคนิวคาสเซิล รวมทั้งเพิ่มขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการให้มีการชันสูตรโรคนิวคาสเซิลให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน รวมถึงการประกันคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยกมาตรฐานคุณภาพของการผลิตปศุสัตว์เพื่อการส่งออก การสอบเทียบมาตรฐานการชันสูตรโรคเป็นวิธีหนึ่งที่บ่งชี้ระบบการตรวจโรคว่าเป็นไปในแนวทางเดียวกันหรือไม่ ทั้งนี้เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้กับต่างประเทศว่าประเทศไทยมีการวินิจฉัยโรคที่ได้มาตรฐาน มีการตรวจสอบคุณภาพห้องปฏิบัติการอย่างจริงจังและต่อเนื่อง เป็นผลให้เกิดการยอมรับระบบการควบคุมและเฝ้าระวังโรคส่งผลต่อตลาดต่างประเทศ มีการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ไปยังตลาดต่างประเทศมากขึ้น เพิ่มรายได้เข้าสู่ประเทศและเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ในที่สุด

รายงานนี้ได้ศึกษาถึงผลการสอบเทียบการตรวจโรคนิวคาสเซิลจากห้องปฏิบัติการทั่วประเทศของภาครัฐจำนวน 7 แห่ง และการตั้งสมมติฐานถึงสาเหตุที่ทำให้คลาดเคลื่อนตลอดจนการทดลองเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างไวรัส

ตัวอย่างที่เป็นบวก : ใช้เชื้อนิวคาสเซิลสเตรน Ishii ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์และพิสูจน์เชื้อจาก National Institute of Animal Health ประเทศญี่ปุ่น การส่งตัวอย่างที่เป็นบวกแต่ละครั้งเตรียมโดยเจือจาง stock virus ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} ด้วย phosphate buffered saline (PBS) เป็นตัวทำละลาย

ตัวอย่างที่เป็นบวก มีทั้งหมด 15 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เป็นลบ : จำนวนทั้งหมด 11 ตัวอย่าง โดยใช้ Allantoic fluid จากไข่ไก่ฟักซึ่งไม่ได้ฉีดเชื้อไวรัส

ตัวอย่างที่เป็นบวกและลบได้รับการตรวจยืนยันจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติก่อนส่งไปยังห้องปฏิบัติการต่างๆ

วิธีการส่งตัวอย่าง การส่งตัวอย่างทำโดยแช่เย็นตัวอย่างซึ่งเก็บไว้ในอุณหภูมิ –80°C ใน

น้ำแข็งแห้งปริมาณ 2 กิโลกรัมเท่ากันทุกห้องปฏิบัติการ ซึ่งให้ความเย็นตลอดระยะเวลาเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการ

การส่งตัวอย่างใช้วิธีฝากส่งไปกับรถโดยสารปรับอากาศหรือรถไฟซึ่งมีระยะเวลาเดินทางดังนี้

ห้องปฏิบัติการที่ 1	16-17 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 2	16-17 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 3	14 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 4	14 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 5	14 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 6	2 ชั่วโมง
ห้องปฏิบัติการที่ 7	0 ชั่วโมง

การส่งตัวอย่างแบ่งเป็น 4 ครั้ง แต่ละครั้งใช้วิธีการและระยะเวลาในการเดินทางจนถึงห้องปฏิบัติการเท่ากัน

การดำเนินการส่งตัวอย่างตรวจ : ก่อนทำการสอบเทียบ ได้จัดการอบรมมาตรฐานการทดสอบโรคนิวคาสเซิล โดยเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการจากห้องปฏิบัติการทั้ง 7 แห่ง เข้ารับการอบรมเพื่อปรับวิธีการทดสอบโรคนิวคาสเซิลให้เป็นมาตรฐานเดียวกันคือ การแยกเชื้อโดยวิธีการฉีดไข่และวิธีการทางซีรั่มวิทยา โดยวิธี HA-HI (Haemagglutination – Haemagglutination inhibition) นอกจากนี้ได้ดำเนินการตรวจสอบวัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ต้องใช้ในกระบวนการทดสอบโรคให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน

การดำเนินการในห้องปฏิบัติการ : การแยกเชื้อไวรัสทำโดยการฉีดไข่ไก่ฟักส่วนวิธีการตรวจทางซีรั่มวิทยา ใช้วิธี HA-HI ตามวิธีของ Swayne et al, 1998

การคำนวณ kappa value : เป็นการประเมินผลการทดสอบวิธีหนึ่ง โดยคำนวณว่าผลการทดสอบให้ผลสอดคล้องกันอย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่คลาดเคลื่อน (Thrusfield, 1995) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

kappa =

$$\frac{(a+d)/(a+b+c+d) - \dfrac{(a+b)(a+c)}{(a+b+c+d)^2} + \dfrac{(b+d)(c+d)}{(a+b+c+d)^2}}{1 - \dfrac{(a+b)(a+c)}{(a+b+c+d)^2} + \dfrac{(b+d)(c+d)}{(a+b+c+d)^2}}$$

a : ค่าตอบที่เป็นบวกตรงกัน

b : ค่าตอบที่ต่างกัน (ตัวอย่างผลบวก แต่รายงานเป็นผลลบ)

c : ค่าตอบที่ต่างกัน (ตัวอย่างผลลบ แต่รายงานเป็นผลบวก)

d : ค่าตอบที่เป็นลบตรงกัน

kappa เป็นค่าสถิติตัวหนึ่งที่ให้ผลการทดสอบคล้ายกับค่าสถิติ correlation coefficient (Gardner, 1998) โดย kappa value จะเปรียบเทียบความเป็นไปได้ที่ผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการสองแห่ง จะมีโอกาสได้ผลที่สอดคล้องกัน (ผลบวกตรงกันหรือผลลบตรงกัน) จะได้ผลแบบบังเอิญ กล่าวคือ ได้ผลลบหรือผลบวกตรงกันหรือไม่ตรงกันก็ได้แล้วแต่โอกาส

ผล

ผลการสอบเทียบพบว่าจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 26 ตัวอย่าง แบ่งเป็นจำนวนตัวอย่าง ที่เป็น positive 15 ตัวอย่าง และเป็น negative 11 ตัวอย่าง ห้องปฏิบัติการ 3 แห่ง ให้ผลถูกต้อง 100% ได้แก่ ห้องปฏิบัติการหมายเลข 3, 6 และ 7 ห้องปฏิบัติการหมายเลข 1, 2, 4 และ 5 ให้ผลการทดสอบคลาดเคลื่อน 3.85%(1/26), 26.92%(6/26),

35.00%(7/20) และ 10.00%(2/20) ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 เมื่อนำผลการทดสอบทั้งหมดมาคำนวณค่า kappa ซึ่งเป็นค่าทางสถิติที่บ่งชี้ถึงระดับความถูกต้องในการทดสอบ พบว่าห้องปฏิบัติการหมายเลข 3, 6 และ 7 ให้ผลการทดสอบถูกต้องสมบูรณ์ ส่วนห้องปฏิบัติการหมายเลข 1, 2, 4 และ 5 สามารถคำนวณค่า kappa ได้ 0.92, 0.56, 0.3 และ 0.8 ตามลำดับ

วิจารณ์

ปัจจัยที่มีผลต่อผลการแยกเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลมีได้หลายปัจจัย เช่น แหล่งที่มาของไก่ไข่ฟัก องค์ประกอบในห้องปฏิบัติการ ความชำนาญของผู้ปฏิบัติ ความคงทนของเชื้อนิวคาสเซิลก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการสอบเทียบได้ โดยเหตุที่เชื้อไวรัสมีความคงทนต่อสิ่งแวดล้อมได้จำกัด นอกจากนี้เชื้อนิวคาสเซิลสเตรนต่างกัน ก็มีความคงทนแตกต่างกัน (Calnex et al, 1997) เชื้อนิวคาสเซิลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จัดเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงต่ำ (lentogenic strain) ยิ่งเมื่อเจือจางจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-4}และ 10^{-5}ไวรัสอาจสูญเสียความสามารถในการติดเชื้อ(infectivity) ลดลง นอกจากนี้การขนส่งก็อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสอบเทียบ ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ถึงผลของการขนส่งตัวอย่างมีต่อการมีชีวิตของเชื้อไวรัส จึงทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ตัวอย่างไวรัสที่มีระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-2}-10^{-5} ซึ่งเตรียมจาก stock virus ชุดเดียวกับที่ทำการสอบเทียบ ใส่ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งแห้งปริมาณ 2 กิโลกรัม จากนั้นวางกระติกไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาฉีดไข่ไก่ฟัก ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างทุกระดับความเจือจางยังมีเชื้อไวรัสอยู่โดยให้ผลการฉีดไข่เป็นบวกใน passage แรกทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังทดลองถึงปัจจัยการเก็บเชื้อไวรัสในอุณหภูมิต่างๆระหว่างรอฉีดไข่ โดยนำตัวอย่างชุดเดียวกันนี้ แยกเก็บที่อุณหภูมิ 4°C, -20°C และ –80°C นาน 5 วัน หลังจากนั้นจึงนำมาฉีดไข่ ผลการทดสอบพบว่า การเก็บไวรัสนิวคาสเซิลในทั้ง 3 อุณหภูมิยังคงมีเชื้อ

ตารางที่ 1 แสดงผลการสอบเทียบของห้องปฏิบัติการทั้ง 7 แห่ง

ห้องปฏิบัติการที่	Total	ตรวจได้ผลบวก	ตรวจได้ผลลบ	คลาดเคลื่อน
1	26	14	12	1
2	26	9	17	6
3	26	15	11	0
4*	20	3	17	7
5*	20	12	8	2
6	26	15	11	0
7	26	15	11	0

* ขาดส่งตัวอย่าง 1 ครั้ง

ไวรัสในปริมาณที่ตรวจสอบได้โดยวิธีการฉีดไข่โดยไวรัสทุกระดับความเจือจาง (dilution 10^{-2}-10^{-5}) ที่เก็บในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลองให้ผลบวกโดยวิธีฉีดไข่ ตั้งแต่ passage แรก จากผลการทดลองทั้ง 2 สรุปได้ว่า ระยะเวลาในการส่งตัวอย่างน่าจะมีผลไม่มากนักต่อปริมาณไวรัสที่รอดชีวิต หากสามารถรักษาความเย็นได้ครบตลอดระยะเวลาเดินทาง การเก็บเชื้อไวรัสในอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ในตู้เย็นชั้นธรรมดา ชั้นแช่แข็ง และอุณหภูมิ –80°C ก็สามารถคงชีวิตอยู่ได้ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 สัปดาห์ นอกจากนี้แหล่งที่มาของไก่ไข่ฟักที่เป็นปัจจัยสำคัญต่อการแยกเชื้อนิวคาสเซิล โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีที่ใช้ไข่ไก่ฟักจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อนิวคาสเซิล เนื่องจากแม่ไก่จะถ่ายทอดแอนติบอดีดังกล่าวไปยัง embryo หากมีระดับแอนติบอดีย่อมจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสในไก่ไข่ฟักได้ เป็นผลให้การแยกเชื้อนิวคาสเซิลไม่ได้ผล

จากผลการสอบเทียบพบว่าห้องปฏิบัติการเพียง 3 จาก 7 แห่ง (ค่า kappa =1) ที่ให้ผลถูกต้องทุกตัวอย่าง ส่วนห้องปฏิบัติการที่เหลือ คือ 4 แห่ง มีระดับความคลาดเคลื่อนต่างกันตั้งแต่ระดับต่ำสุด 1 ตัวอย่าง (คิดเป็น 3.85%) จนถึงสูงสุด 7 ตัวอย่าง (คิดเป็น 26.92%) ความคลาดเคลื่อนที่พบแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ รายงานผลเป็นลบในตัวอย่างที่เป็นบวก (positive) และรายงานผลเป็นบวกในตัวอย่างที่เป็นลบ (negative) ในกรณีที่ผลการทดสอบเป็นบวกในตัวอย่างที่เป็นลบ อาจเกิดจาก cross contamination ในระหว่างตัวอย่าง ดังนั้นแนวทางแก้ไขผู้ปฏิบัติควรเพิ่มความระมัดระวังในแต่ละขั้นตอนของการตรวจ ส่วนกรณีผลการทดสอบเป็นลบในตัวอย่างที่เป็นบวก มีสาเหตุได้หลายประการเช่น ไข่ไก่ฟักมีแอนติบอดีต่อเชื้อนิวคาสเซิล คุณภาพของตู้เย็นที่เก็บเชื้อก่อนฉีดไข่ไก่ฟัก สามารถรักษาอุณหภูมิได้คงที่หรือไม่ ตลอดจนความชำนาญของผู้ปฏิบัติ จากตารางที่ 2 พบว่าห้องปฏิบัติการที่มีปัญหาต้องปรับปรุงคือห้องปฏิบัติการที่ 2 และ 4 ซึ่งค่าความสอดคล้อง (kappa) เพียง 0.56 และ 0.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงผลการคำนวณค่า kappa จากผลการสอบเทียบของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง และการแปรผล

ห้องปฏิบัติการที่	ค่า kappa	การแปลผล
1	0.92	Perfect agreement
2	0.56	Moderate agreement
3	1	Complete agreement
4	0.3	Substantial agreement
5	0.8	Almost perfect agreement
6	1	Complete agreement
7	1	Complete agreement

ผลการสอบเทียบชี้ให้เห็นว่า แม้ห้องปฏิบัติการจะใช้เทคนิคการตรวจโรคเป็นวิธีมาตรฐานเดียวกัน การตรวจสอบคุณภาพในส่วนต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นการวางระบบควบคุมให้การปฏิบัติงานมีความคล่องตัวรวมทั้งจัดสรรงานให้เหมาะสมกับความรู้ ความชำนาญของแต่ละบุคคล (design control) การวางระบบควบคุมวัสดุอุปกรณ์ให้ได้มาตรฐาน (material control) การจัดตารางบำรุงรักษาเพื่อให้เครื่องมือ เครื่องใช้สามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (process control) และการควบคุมผลที่ได้ (output control) เป็นสิ่งสำคัญที่ห้องปฏิบัติการทุกแห่งควรมีการควบคุมอย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง (กุลนารีและคณะ, 2542) การฝึกอบรมให้ผู้ปฏิบัติงานมีความรู้และความชำนาญในการทดสอบตลอดจนการตรวจสอบวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ จะทำให้ห้องปฏิบัติการการตรวจโรคนิวคาสเซิลของภาครัฐทุกพื้นที่มีคุณภาพได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล กระบวนการดังกล่าวเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อการสร้างความเชื่อมั่นให้แก่องค์การทั้งภายในและภายนอกประเทศถึงศักยภาพในการวินิจฉัยโรค อีกทั้งเป็นแนวทางที่สำคัญในการควบคุมและกำจัดโรคทั้งในปัจจุบันและอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิงกัญยา อาษายุทธ ที่กรุณาให้คำแนะนำการคำนวณตัวเลขทางสถิติ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ทุกท่านที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งในการดำเนินการสอบเทียบครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กุลนารี สิริสาลี, สุดารัตน์ มโนเชี่ยวพินิจ, จำรัส พร้อมมาศ และปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ 2542 การประกันคุณภาพ: กระบวนการวิเคราะห์คุณภาพห้องปฏิบัติการชันสูตรโรคตามระบบ ISO เอช.ที.พี.เพรส จำกัด กรุงเทพฯ หน้า 77-85

Calnex B.W., Barnes H.J., Beard C.W.McDougald L.R. and Saif Y.M. 1997. Disease of Poultry 10th ed. Iowa State University Press, USA. 541-569

Castro A.E. and Heuschele W.P. 1992 Veterinary Diagnostic Virology: A practitioner's guide, Mosby Year Book, Toronto. 54-56

Gardner,I. 1998 Evaluate Laboratory Diagnosis, Lecture note VME 217, Spring course, Navin's Copy Shop, California. 279-291

Thrusfield M. 1995 Veterinary Epidemiology 2nd edition, Blackwell Science, London 280-283

Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. and Reed W.M. 1998 A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens 4th edition Rose Printing, Florida. 156-163