

การตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *Mycobacterium leprae* ในผู้ป่วยโรค เรื้อนประเภทเชื้อมนอย โดยชุดทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว

Screening Test of *Mycobacterium leprae* Infection in Paucibacillary Patients by LID-1 Rapid Serological Test

สุทธิศักดิ์ งามวชิราพร*

สถาบันราชประชาสมาสัย

ถนนปู่เจ้าสมิงพราย ตำบลบางหญ้าแพรก อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130

สินารณ ชูเมียน และถวัลย์ ฤกษ์งาม

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sutthisak Ngamwachiraporn*

Rajprachasamasai Institute,

Poochaosamingpai Road, Bang Ya Phraek, Phra Pradaeng, Samut Prakan 10130

Sirinart Chomean and Thaval Rerksngarm

Medical Technology Faculty of Allied, Health Science, Thammasat University, Rangsit Centre,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนอย (paucibacillary, PB) เป็นผู้ติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Mycobacterium leprae* ที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (cell mediated immune response, CMI) ระดับปานกลางหรือมาก ผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงไม่แสดงอาการ แต่จากรายงานอุบัติการณ์งานรักษาและป้องกันควบคุมโรคเรื้อนปี พ.ศ. 2557 พบผู้ป่วยโรคเรื้อนรายใหม่ประเภทเชื้อมนอย จำนวนร้อยละ 27.32 ซึ่งหากไม่ได้รับการวินิจฉัยและรักษาตั้งแต่วะยะเริ่มแรก อาจทำให้พัฒนาเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนรายใหม่ประเภทเชื้อมาก (multibacillary, MB) ซึ่งแพร่เชื้อให้กับชุมชนและเกิดความพิการถาวร นำมาซึ่งปัญหาทางจิตใจ สังคม และเศรษฐกิจ อาการแสดงสำคัญที่ใช้วินิจฉัยโรคเรื้อนในปัจจุบัน คือ (1) ตรวจพบรอยโรคผิวหนังที่มีลักษณะเฉพาะของโรคเรื้อน (2) ตรวจพบอาการชาข้อหนึ่งข้อใดต่อไปนี คือ ชาที่รอยโรคผิวหนัง หรือชาที่ผิวหนังบริเวณที่รับรู้ความรู้สึกจากเส้นประสาทส่วนปลายที่ถูกทำลายโดยเชื้อโรคเรื้อน (3) ตรวจพบเส้นประสาทโต และ (4) ตรวจพบเชื้อรูปแท่งติดสีทนกรด (acid fast bacilli, AFB) จากการขีดผิวหนัง (slit skin smear, SSS) หากพบอาการแสดงอย่างน้อย 2 ข้อ จาก 3 ข้อแรก หรือพบข้อ 4 เพียงข้อเดียว ให้วินิจฉัยว่าเป็นโรคเรื้อน ดังนั้นเมื่อผู้ป่วยมีพื้นที่เข้าได้กับโรคเรื้อนและมีอาการชาที่รอยโรค จึงสามารถ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : sutthisaklab@hotmail.com

วินิจฉัยเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ได้เลย โดยไม่ต้องอาศัยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยที่มีอาการสงสัยเป็นโรคเรื้อน แต่มีผื่นและหรืออาการชาที่รอยโรคไม่ชัดเจน จึงต้องอาศัยวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการมาช่วยยืนยัน ซึ่งในปัจจุบันวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยามีความไวต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่มีความไวต่อเชื้อมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของชุดทดสอบภูมิคุ้มกันต่อ *M. leprae* ชนิด Leprosy IDRI Diagnostic 1 (LID-1) โดยเก็บตัวอย่างเลือดคนปกติ จำนวน 10 ราย และผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนรายใหม่ประเภทเชื้อมนุษย์ จำนวน 10 ราย มาทดสอบด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test และยืนยันการพบ *M. leprae* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ผลการศึกษาพบว่าชุดตรวจ LID-1 rapid serological test ให้ผลบวกกับตัวอย่างเลือดผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ จำนวน 9 ราย และพบ *M. leprae* จำนวน 6 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test และผลการวินิจฉัยจากอาการแสดงพบว่าชุดตรวจนี้ให้ผลบวกจริง (true positive) ร้อยละ 45 ผลลบจริง (true negative) ร้อยละ 50 ผลลบปลอม (false negative) ร้อยละ 5 โดยไม่มีตัวอย่างใดผลบวกปลอม (false positive) ผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 90 ความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ร้อยละ 100 และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) ร้อยละ 91 โดยอัตราที่ผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ที่ป่วยเป็นโรคเปรียบเทียบกับผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ที่ไม่ป่วยเป็นโรค (negative likelihood ratio) เท่ากับร้อยละ 0.1 ดังนั้นการทดสอบด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test นี้จึงน่าจะมีประโยชน์ในการตรวจคัดกรองโรคเรื้อนเบื้องต้น (screening test) ในกลุ่มประชากรบางกลุ่ม เช่น แรงงานต่างด้าว ผู้อาศัยร่วมบ้านกับผู้ป่วยโรคเรื้อน และผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการ

คำสำคัญ : ผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์; การทดสอบภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว; การตรวจคัดกรอง

Abstract

Paucibacillary (PB) is leprosy patients infected with *Mycobacterium leprae* whom have strongly moderate to moderate cell mediated immune response (CMI) causing no clinical symptom in most patients. Treatment and prevention report in 2005 proposed that approximately 27.32 percent of leprosy were new cases of PB patients. Detection of leprosy relies on cardinal signs with or without positive AFB from SSS testing. Clearly signs without positive result of AFB were diagnosis as PB patients. However, some suspected leprosy showed ambiguous skin lesion or nerve involvement resulting in mis- or late diagnosis. The patients can develop to MB patients causing poor prognosis and finally disability. Moreover, they also spread *M. leprae* throughout the household or contact person. These are not only public health problem but also a socio-economic problem. Therefore, immunological testing which has high sensitive, specific and early diagnosis has been developed. The study aims to investigate the efficacy of Leprosy IDRI Diagnostic 1 (LID-1) rapid serological test. Whole blood was collected from 10 samples of normal blood and 10 samples of

PB patients with negative AFB from SSS testing. All samples were analyzed LID-1 rapid serological test. Slit skin smear were done and confirmed *M. leprae* infection with PCR method in PB patients. The LID-1 rapid serological test showed that 11 samples (55 %) were negative results and 9 samples (45 %) were positive results. Only 60 % of PB patients found *M. leprae* when analyzed by PCR method. Efficiency evaluation of LID-1 rapid serological testing with cardinal signs represented that the LID-1 rapid serological test has 45 % of true positive, 50 % of true negative and 5 % of false negative with on false positive. These were corresponded to 90 % sensitivity, 100 % specificity, 100 % positive predictive value, 91 % negative predictive value and 0.1 % negative likelihood ratio. Therefore, the LID-1 rapid serological test can be useful in primary screening which could reduce the cost of leprosy diagnosis and early diagnosis. In addition, it is non-invasive method so it also suitable for patients that didn't wanted to examine with SSS test. LID-1 rapid serological test will be very useful in the population that needs leprosy diagnosis, such as migrant worker and household contact to prevent the progression of the disease.

Keywords: paucibacillary leprosy; rapid serological test; screening test

1. บทนำ

โรคเรื้อน (leprosy) เป็นโรคติดต่อเรื้อรังที่ผิวหนังและเส้นประสาทส่วนปลาย เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *M. leprae* ติดต่อกับคนสู่คนได้ทางเดินหายใจ (respiratory transmission) และทางบาดแผลรอยถลอก [1] ผู้ที่ติดเชื้อ *M. leprae* ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการในทันที ทั้งนี้ประชากรที่ได้รับเชื้อเพียงร้อยละ 3 เท่านั้น จะสามารถพัฒนาไปเป็นโรคเรื้อนเมื่อติดเชื้อโรคเรื้อนในร่างกายแล้วเชื้อจะแบ่งตัวในร่างกายทำให้เกิดอาการที่ผิวหนังเป็นวงต่างขาวหรือผื่นนูนแดงเป็นวงแหวน อีกทั้งเชื้อยังสามารถทำลายเส้นประสาทส่วนปลาย ทำให้มีอาการชา ไม่มีเหงื่อออกเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อเป็นเวลานานจะทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรงหรือเป็นอัมพาต และมีความพิการ สถานการณ์โรคเรื้อนในประเทศไทย [2] ในปี พ.ศ. 2557 อัตราความชุกโรค 0.09 ต่อประชากรหมื่นคน และอัตราการตรวจพบผู้ป่วยใหม่ 0.32 ต่อประชากรแสนคน และอัตราการตรวจพบผู้ป่วยใหม่ 0.66 ต่อประชากรแสนคนของ

ชาวต่างด้าวที่มาจ้างทำงานในประเทศไทย [3] ถึงแม้ว่าอุบัติการณ์และอัตราการตรวจพบผู้ป่วยใหม่จะลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปัญหาด้านสาธารณสุข คือ การเกิดความพิการของผู้ป่วย เนื่องจากความล่าช้าในการตรวจวินิจฉัยและรักษา ทำให้การแบ่งตัวของเชื้อโรคในร่างกายดำเนินไปจนเกิดเป็นโรคได้ หรือการเกิดผื่นหรือวงต่างขาว ขา แต่ไม่คัน ทำให้ผู้ป่วยขาดความตระหนัก และ/หรือไม่ได้รับการคัดกรองตรวจวินิจฉัยว่าเป็นโรคเรื้อน จนทำให้การดำเนินโรคสู่ระบบแพร่ติดต่อร้ายแรง ซึ่งสามารถแพร่เชื้อโรคเรื้อนไปให้ผู้ใกล้ชิดได้ เช่น ผู้สัมผัสโรคร่วมบ้าน

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนตามองค์การอนามัยโลก (WHO) อาศัยอาการแสดงสำคัญ (cardinal signs) คือ (1) ตรวจพบรอยโรคผิวหนังที่มีลักษณะเฉพาะของโรคเรื้อน เช่น วงต่างขาว (2) ตรวจพบอาการชาข้อหนึ่งข้อใดต่อไปนี้เป็น (2.1) ขาที่รอยโรคผิวหนัง หรือ (2.2) ขาที่ผิวหนังบริเวณที่รับความรู้สึกจากเส้นประสาทส่วนปลายที่ถูกทำลายโดยเชื้อโรค

เรื้อรัง (3) ตรวจพบเส้นประสาทโต และ (4) ตรวจพบเชื้อรูปแท่งติดสีทนกรด (acid fast bacilli, AFB) จากการกรีดผิวหนัง (slit skin smear, SSS) หากพบอาการแสดงอย่างน้อย 2 ข้อ จาก 3 ข้อแรก หรือพบข้อ 4 เพียงข้อเดียว ให้วินิจฉัยว่าเป็นโรคเรื้อรัง [1] แต่การตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยการกรีดผิวหนังนั้นต้องอาศัยทักษะและความชำนาญของบุคลากรที่กรีดผิวหนังและรายงานผลทดสอบ อีกทั้งยังให้ผลลบในกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังประเภทเชื้อมนุษย์ (PB) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง ทั้งอ่านผลได้รวดเร็วและราคาถูก เพื่อมาใช้ในการตรวจคัดกรองผู้ที่มีอาการสงสัยเป็นโรคเรื้อรังหรือผู้สัมผัสโรคร่วมกับผู้ป่วยที่ยังไม่แสดงอาการ และในกลุ่มแรงงานต่างด้าวที่มาตรวจสุขภาพประจำปีเพื่อขึ้นทะเบียน

การตรวจผู้ที่อาการโรคเรื้อรังยังไม่ปรากฏให้เห็นชัดเจนแต่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคเรื้อรังได้ เช่น fluorescence leprosy antibody absorption (FLA-ABS) การตรวจความจำเพาะของปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ (ELISA) และวิธี PCR เป็นวิธีที่มีการศึกษากันมากและมีข้อมูลบ่งชี้ว่าสามารถใช้ตรวจค้นหาผู้ป่วยโรคเรื้อรังระยะแรกได้ [4] แต่วิธีการมีความซับซ้อนต้องใช้เครื่องมือนำเข้าจากต่างประเทศ ราคาแพง และอาศัยทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน ทำให้ไม่สะดวกปฏิบัติในพื้นที่ภาคสนาม การตรวจทางภูมิคุ้มกันโดยชุดตรวจที่สะดวกและให้ผลรวดเร็วโดยอาศัยหลักการโครมาโทกราฟี (chromatography strip test) ในการตรวจหา Anti PGL-1 ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ร่างกายผลิตขึ้นเมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของเชื้อ *M. leprae* โดยมีโครงสร้างเป็น phenolic glycolipid 1 (PGL-1) มีความจำเพาะต่อเชื้อโรคเรื้อรังสูง โดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross reaction) กับเชื้อ *Mycobacterium* วงศ์อื่น ๆ [4] อีกทั้งปริมาณ Anti

PGL-1 ที่สร้างขึ้นยังสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรีย (bacillary load) ของผู้ป่วยโรคเรื้อรังประเภทต่าง ๆ อีกด้วย [5] อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยโรคเรื้อรังประเภทเชื้อมนุษย์จะมีการสร้าง Anti PGL-1 ได้น้อย จนทำให้ไม่สามารถตรวจพบด้วยวิธีดังกล่าวได้ และยังให้ผลบวกในผู้ร่วมบ้านกับผู้ป่วยเป็นระยะเวลานาน (household contact) โดยที่ผู้ร่วมบ้านยังไม่พัฒนาไปเป็นโรคเรื้อรัง [6] ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อรัง ให้มีความไวสูงขึ้น ทำได้ง่าย ให้ผลการตรวจรวดเร็วและราคาถูก โปรตีนลูกผสม (fusion protein) Leprosy IDRI Diagnostic 1 หรือ LID-1 ซึ่งเป็นการรวมกันของแอนติเจน PGL-1 ML0405 และ ML2331 ของเชื้อ *M. leprae* จึงถูกพัฒนาขึ้น ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อรังในภาคสนาม เช่น กลุ่มแรงงานต่างด้าว สามารถตรวจผู้ป่วยโรคเรื้อรังประเภทเชื้อมนุษย์ และผู้ที่ยังไม่แสดงอาการได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพชุดทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว ในการตรวจหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) ที่จำเพาะต่อเชื้อโรคเรื้อรัง ในกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังประเภทเชื้อมนุษย์

2. วัสดุและวิธีการ

2.1 กลุ่มตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้รับอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (รทสงานวิจัย 005/2559) โดยเก็บตัวอย่างเลือด ณ สถาบันราชประชาสมาสัย จากอาสาสมัคร อายุมากกว่า 18 ปีขึ้นไป มีสัญชาติไทย โดยจัดออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมจำนวน 10 คน ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (1) ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ตามเกณฑ์ของ WHO ว่าไม่เป็นโรคเรื้อรัง (2) เป็นผู้ที่ไม่ได้มารับการรักษาโรคเกี่ยวกับโรคผิวหนัง และ (3) ไม่เคยเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อรังเดิมจาก

คลินิกอายุรกรรม กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ จำนวน 10 คน ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ (1) ตรวจพบรอยโรคผิวหนังที่มีลักษณะเป็นวงต่างขาว (2) ตรวจพบอาการชาที่รอยโรคผิวหนัง และ/หรือที่ผิวหนังบริเวณที่รับรู้ความรู้สึกจากเส้นประสาทส่วนปลายที่ถูกทำลายโดยเชื้อโรคเรื้อน (3) ตรวจพบเส้นประสาทโต (4) ตรวจไม่พบเชื้อรูปแท่งติดสีทนกรด (AFB) จากการกรีดผิวหนัง (SSS) และ (5) ผู้ป่วยยังไม่ได้รับยารักษาโรคเรื้อน

เลือดจากอาสาสมัครจำนวน 20 ตัวอย่าง ปริมาณ 3 มิลลิเมตร จะเก็บใน clot blood เพื่อตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยชุดทดสอบ LID-1 rapid serological test และผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ จะได้รับการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผิวหนัง (SSS) โดยใช้ใบมีด เพื่อตรวจหาเชื้อ *M. leprae* ด้วยการย้อมสี Ziehl-Neelsen และวิธี PCR

2.2 การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยการกรีดผิวหนัง (slit skin smear)

การกรีดผิวหนังตรวจหาตัวเชื้อโดยตรง (SSS) เป็นวิธีการที่ต้องปฏิบัติตามคำแนะนำขององค์การอนามัยโรค (WHO) วิธีการทดสอบจะเลือกตำแหน่งทดสอบตามหลักมาตรฐาน คือ ดั้งหู และบริเวณที่มีรอยโรคดำเนินอยู่ รอยโรคที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคเรื้อนที่เหมาะสมแก่การตรวจหาเชื้อ คือ รอยโรคระยะกำเริบที่สุด ทั้งนี้ผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ จะกรีด 3 ตำแหน่ง คือ ที่ดั้งหู 2 ข้าง และรอยโรคที่กำเริบมากที่สุดอีก 1 ตำแหน่ง ตามมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนทางห้องปฏิบัติการ เมื่อได้ตำแหน่งทดสอบต้องบีบด้วยนิ้วมือให้แน่นเพื่อจะไม่ให้มีเลือดออกมาผสมกับ tissue pulp ที่ต้องการ จากนั้นใช้ใบมีดขนาดเบอร์ 15 กรีดบริเวณผิวหนังให้เป็นบาดแผลยาว 5 มิลลิเมตร ลึก 2 มิลลิเมตร เมื่อได้ tissue pulp แล้วนำมาเสมียร์บนสไลด์และย้อมด้วยสี

Ziehl-Neelsen stain [1] หากพบตัวเชื้อ *M. leprae* จะติดสีแดงของ acid fast bacilli โดยพื้นหลังจะติดสีน้ำเงิน และพบการเรียงตัวเป็นแบบเกาะกลุ่มแน่น (globi) ซึ่งการรายงานผลการทดสอบมีการรายงาน 2 แบบ คือ รายงานเชิงปริมาณ (bacteriological index, BI) และรายงานผลเชิงคุณภาพ (morphology index, MI) [7]

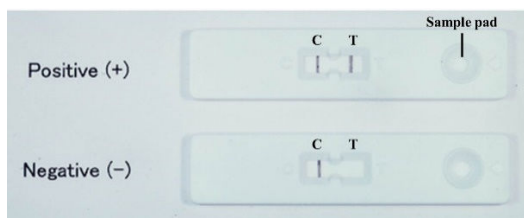
2.3 การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยชุดทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว ในการตรวจหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test)

การทดสอบหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยชุดทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว ชื่อชุดทดสอบ NDO-LID 1 เพื่อตรวจหา Anti LID-1 นี้ อาศัยหลักการ Immunochromatography assay ชุดทดสอบใช้ PGL-1 ร่วมกับ ML0405 และ ML2331 เป็น fusion protein เรียกว่า LID-1 เป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบ ซึ่งชุดทดสอบดังกล่าวนี้มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 87 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96.1 [8] วิธีการทำโดยย่อ คือ นำซีรัมที่แยกจากตัวอย่างเลือด clot blood จำนวน 10 ไมโครลิตร หยดลงบนบริเวณที่ใส่ตัวอย่าง (sample pad) และใส่บัฟเฟอร์ที่ให้กับชุดทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตรตามลงไป รอให้ตัวอย่างตรวจเคลื่อนที่บนแถบทดสอบ เวลา 10 นาที โดยแถบควบคุม (C) จะต้องให้ผลบวก (เกิดแถบสีชมพู) จึงบันทึกผล ซึ่งหากในซีรัมผู้ป่วยมี Anti LID-1 ต่อเชื้อโรคเรื้อน ชุดทดสอบจะปรากฏแถบสีชมพู 2 แถบ ที่บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C) แต่ถ้าผู้ป่วยไม่มี Anti LID-1 ต่อเชื้อโรคเรื้อน จะพบแถบสีชมพูที่ตำแหน่งแถบควบคุม (C) เพียงแถบเดียว (รูปที่ 1)

2.4 การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี PCR

การหาเชื้อ *M. leprae* โดยวิธี PCR ได้รับการตรวจจากสถาบันราชประชาสมาสัย โดยอาศัยชุด

ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *RLEP* ของเชื้อ *M. leprae* (*M. leprae*-specific *RLEP* primers) [9] ซึ่งมีความไวร้อยละ 73 และมีความจำเพาะร้อยละ 100 สำหรับผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ [10] กล่าวโดยย่อ คือ สกัดดีเอ็นเอของเชื้อจากตัวอย่างไข่มด โดยวิธี Proteinase K lysis [11] คือ นำไข่มดที่เก็บอยู่ในเอทานอลร้อยละ 70 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสที่นำตะกอนสีขาวที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อตะกอนที่ได้แห้งสนิทแล้วจึงนำมาเติม lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี PCR หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์



รูปที่ 1 ชุดทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อตรวจหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) โดยตำแหน่งทดสอบตัวอย่าง (sample pad) ตำแหน่งการอ่านผลการทดสอบ คือ บริเวณแถบทดสอบ (T) และแถบควบคุม (C)

การตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี PCR จากดีเอ็นเอที่สกัดจากไข่มด กล่าวคือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้

ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาเพิ่มจำนวนใน 2x PCR master mix (i-Taq) โดยแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 30 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที นำผลผลิตที่ได้มาแยกขนาดในเจลด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และนำไปดูขนาดผลผลิตด้วย UV-Vis transilluminator

3. ผลการศึกษา

ตัวอย่างซีรัมที่ได้รับการวินิจฉัยโรคเรื้อนจากแพทย์ตามเกณฑ์ WHO จำนวน 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างของผู้ไม่ติดเชื้อ *M. leprae* (กลุ่มควบคุม) จำนวน 10 ราย และผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ที่ยังไม่ได้รับการรักษา (กลุ่มทดลอง) จำนวน 10 ตัวอย่าง ถูกนำมาทดสอบด้วยชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว (NDO-LID 1) เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) พบว่าชุดตรวจนี้ให้ผลบวกจำนวน 9 ราย (ตัวอย่างตรวจที่ 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 และ 20) คิดเป็นร้อยละ 45 และผลลบจำนวน 11 ราย (ตัวอย่างที่ 1-10 และ 13) คิดเป็นร้อยละ 55 ดังตารางที่ 1 เมื่อยืนยันการตรวจพบเชื้อ *M. leprae* จากตัวอย่างไข่มดของผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ ด้วยวิธี PCR หากผู้ป่วยติดเชื้อ *M. leprae* จะปรากฏขนาดของผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเท่ากับ 129 เบส [11] ซึ่งผลการตรวจพบว่าให้ผลบวก จำนวน 6 ราย (ตัวอย่างตรวจที่ 11, 13, 14, 18, 19 และ 20) คิดเป็นร้อยละ 60 และให้ผลลบ จำนวน 4 ราย (ตัวอย่างตรวจที่ 12, 15, 16 และ 17) คิดเป็นร้อยละ 40 ดังรูปที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบตัวอย่างผู้ไม่ติดเชื้อโรคเรื้อน (ตัวอย่างที่ 1-10) และผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ (ตัวอย่างที่ 11-20) ด้วยวิธีการกรีดผิวหนัง (SSS) ชุดตรวจ LID-1 rapid serological test และวิธี PCR

เบอร์	ผลการกรีดผิวหนัง slit skin smear และย้อมด้วยสี Ziehl-Neelsen	ผลการทดสอบด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test	ผล PCR โดยมี SSS
ตัวอย่างควบคุม	บวก	บวก	บวก
ตัวอย่างควบคุม	ลบ	บวก	ลบ
1	ND	ลบ	ND
2	ND	ลบ	ND
3	ND	ลบ	ND
4	ND	ลบ	ND
5	ND	ลบ	ND
6	ND	ลบ	ND
7	ND	ลบ	ND
8	ND	ลบ	ND
9	ND	ลบ	ND
10	ND	ลบ	ND
11	ลบ	บวก	บวก
12	ลบ	บวก	ลบ
13	ลบ	ลบ	บวก
14	ลบ	บวก	บวก
15	ลบ	บวก	ลบ
16	ลบ	บวก	ลบ
17	ลบ	บวก	ลบ
18	ลบ	บวก	บวก
19	ลบ	บวก	บวก
20	ลบ	บวก	บวก

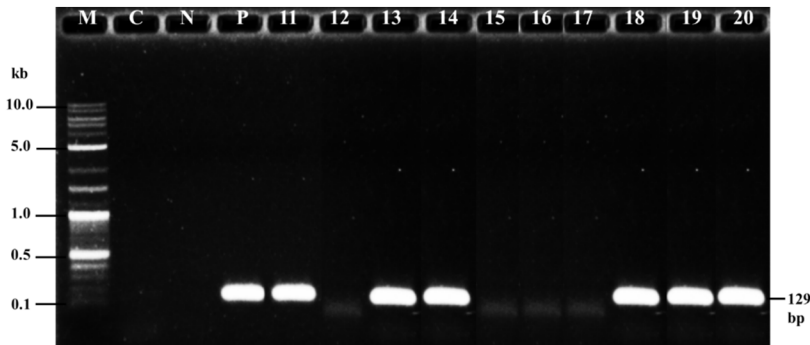
ND = ไม่ได้ทดสอบ

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจด้วยชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) กับการวินิจฉัยโรคเรื้อนตามองค์การอนามัยโลก โดยอาศัยอาการแสดงสำคัญ (cardinal sign) ในตัวอย่างตรวจ จำนวน 20 ราย

พบว่าในกลุ่มตัวอย่างของผู้ไม่ติดเชื้อ *M. leprae* ให้ผลลบทั้ง 10 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1-10) ซึ่งเป็นผลลบจริง (true negative) คิดเป็นร้อยละ 50 และในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมนุษย์ให้ผลบวกกับชุดทดสอบจำนวน 9 ราย (ตัวอย่างตรวจที่ 11, 12, 14,

15, 16, 17, 18, 19 และ 20) ซึ่งเป็นผลบวกจริง (true positive) คิดเป็นร้อยละ 45 และให้ผลลบ จำนวน 1 ราย (ตัวอย่างตรวจที่ 13) ซึ่งเป็นผลลบปลอม (false negative) คิดเป็นร้อยละ 5 โดยไม่ให้ผลบวกปลอม (false positive) ดังตารางที่ 2 จึงสามารถสรุปได้ว่าชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) มีความไวร้อยละ

90 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ผลบวก (positive predictive value) ร้อยละ 100 และค่าพยากรณ์ผลลบ (negative predictive value) ร้อยละ 91 โดยอัตราที่ผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ป่วยเป็นโรคเปรียบเทียบกับผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ที่ไม่ป่วยเป็นโรค (negative likelihood ratio) ร้อยละ 0.1



รูปที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างใบมีดของผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อย ที่ไม่ได้รับการรักษา (ตัวอย่างที่ 11-20) โดย M คือ แถบดีเอ็นเออ้างอิง ที่มีขนาด 0.1 ถึง 10 กิโลเบส C คือ ปฏิกริยาควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ N คือ ตัวอย่างตรวจของผู้ไม่ติดเชื้อโรคเรื้อน และ P คือ ดีเอ็นเอของผู้ติดเชื้อโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อโรคเรื้อนด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test และการตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนตามอาการแสดงสำคัญ (cardinal sign) ในกลุ่มไม่เป็นผู้ติดเชื้อโรคเรื้อน จำนวน 10 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อย จำนวน 10 ราย

ชุดตรวจ LID-1 rapid serological test (คน)	การตรวจวินิจฉัยโรคเรื้อนตามอาการแสดงสำคัญ (คน)		รวม (คน)
	บวก	ลบ	
บวก	9	0	9
ลบ	1	10	11
รวม	10	10	20

4. วิจัยรณผล

การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเรื้อน อาศัยอาการแสดงและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ คือ การกรีดผิวหนัง (SSS) แล้วนำไปย้อมด้วยสีทนกรด (Ziehl-

Neelsen stain) ซึ่งผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก (multibacillary leprosy, MB) ได้แก่ กลุ่ม border-line tuberculoid (BT), mid borderline (MB), borderline lepromatous (BL) และ lepromatous

(LL) จะแสดงรอยโรคอย่างชัดเจน เช่น ผื่นวงแหวน มีอาการชา เส้นประสาทโต และพบเชื้อ *M. leprae* เมื่อตรวจด้วยการกรีดผิวหนัง [1] ส่วนผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อย (paucibacillary leprosy, PB) ได้แก่ กลุ่ม indeterminate (I), tuberculoid (TT) และ borderline tuberculoid (BT) จะอาศัยการตรวจอาการทางผิวหนัง [1] ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยในกลุ่มนี้อาจทำได้ล่าช้า มีการดำเนินของโรคเลวร้ายลง ทำให้ผู้ป่วยสามารถพัฒนาไปเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อมาก เกิดความพิการของผู้ป่วย อีกทั้งผู้ป่วยยังสามารถแพร่เชื้อไปให้ผู้ที่อยู่ใกล้ชิดได้ การเพาะเลี้ยงเชื้อโรคเรื้อนในห้องปฏิบัติการในปัจจุบันยังไม่สามารถทำได้ แต่สามารถเพาะในสิ่งมีชีวิต เช่น ตัวนิ่มเก้าลาย (nine banded armadillo) แต่วิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยาก การลงทุนสูง และใช้เวลานาน การตรวจหาเชื้อ *M. leprae* ด้วยวิธี PCR นำมาใช้ในการวินิจฉัยการกลับมาเป็นโรคเรื้อนซ้ำ (relapse) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง แต่มีราคาแพง ใช้เครื่องมือจำเพาะ ใช้สารก่อมะเร็ง และอาศัยทักษะความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานในการทดสอบ ดังนั้นการตรวจหาภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อโรคเรื้อน จึงน่าจะมีประโยชน์ในผู้ที่อาการของโรคเรื้อนที่ยังไม่แสดงอย่างชัดเจน แต่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคเรื้อนได้ การตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโปรตีนลูกผสม LID-1 (Anti LID-1) ซึ่งเป็นแอนติเจนของเชื้อ *M. leprae* เกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีน PGL-1 ML0405 และ ML2331 จึงถูกพัฒนาขึ้น จากการศึกษาของ Malcom และคณะ [4] พบว่า Anti LID-1 สามารถตรวจพบได้ในผู้ป่วยโรคเรื้อนที่ยังไม่แสดงอาการ สามารถตรวจผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อยได้ และให้ผลการตรวจที่จำเพาะกับผู้อาศัยร่วมบ้านกับผู้ป่วยโรคเรื้อนที่พัฒนาไปเป็นผู้ป่วยโรคเรื้อน ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาตรวจคัดกรองกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรค

เรื้อนสูง เช่น กลุ่มแรงงานต่างด้าว ผู้อาศัยร่วมบ้านกับผู้ป่วยโรคเรื้อน อีกทั้งระดับของ Anti LID-1 สัมพันธ์กับการรักษา จึงสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการรักษาของยา multidrug ที่ใช้รักษาได้ [1]

งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) ในการค้นหาผู้ป่วยประเภทเชือน้อยในกลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อยที่ยังไม่แสดงอาการชัดเจน ผลการศึกษาพบว่าจากตัวอย่างตรวจผู้ที่ไม่ติดเชื้อโรคเรื้อนให้ผลลบจากการตรวจด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test ร้อยละ 100 และตัวอย่างตรวจผู้ติดเชื้อโรคเรื้อนประเภทเชือน้อย ให้ผลบวกกับชุดตรวจดังกล่าวร้อยละ 90 และให้ผลลบร้อยละ 10 (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามเมื่อยืนยันการพบเชื้อด้วยวิธี PCR (รูปที่ 2) นั้น พบเชื้อ *M. leprae* คิดเป็นร้อยละ 60 และไม่พบเชื้อ คิดเป็นร้อยละ 40 ซึ่งการที่ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อโรคเรื้อนชนิด LID-1 แต่ไม่พบเชื้อพบตัวเชื้อเมื่อตรวจด้วยวิธี PCR อาจเกิดจากผู้ป่วยเพิ่งได้รับเชื้อ ทำให้เชื้อมีปริมาณน้อยมาก และมีรอยโรคไม่ชัดเจน ทำให้ตำแหน่งในการเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจไม่เหมาะสม [1] นอกจากนี้มีตัวอย่างตรวจจำนวน 1 ราย ที่ให้ผลการตรวจด้วยชุดตรวจ LID-1 rapid serological test เป็นลบ แต่พบเชื้อ *M. leprae* ด้วยวิธี PCR ซึ่งผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชือน้อยรายนี้อาจจัดอยู่ในกลุ่ม I โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้มักสร้างระดับภูมิคุ้มกันไม่แน่นอน บางครั้งพบผลบวกต่ำ ๆ หรือเป็นลบ [1]

การประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจ LID-1 rapid serological test กับการวินิจฉัยโรคเรื้อนในปัจจุบันซึ่งอาศัยอาการแสดงสำคัญ (cardinal sign) นั้นพบว่าชุดตรวจ LID-1 rapid serological test ให้ผลบวกจริงร้อยละ 45 ผลลบจริงร้อยละ 50 และผลลบปลอมร้อยละ 5 โดยไม่ให้ผลบวกปลอม ซึ่งอาจช่วย

ป้องกันผู้ป่วยไม่ได้รับยาโดยไม่มีการติดเชื้อ จากผลการประเมินชุดตรวจ LID-1 rapid serological test ในตัวอย่างเลือดจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถสรุปได้ว่าชุดตรวจนี้มีความไวร้อยละ 90 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ผลบวกร้อยละ 100 ค่าพยากรณ์ผลลบร้อยละ 91 และอัตราที่ผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ป่วยเป็นโรคเปรียบเทียบกับผลการทดสอบให้ผลลบในผู้ที่ไม่ป่วยเป็นโรคร้อยละ 0.1 การศึกษาครั้งนี้มีความไวสูงกว่าการศึกษาของ Malcom และคณะ [12] ซึ่งตรวจผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อน้อยในประเทศฟิลิปปินส์โดยใช้ชุดการทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็วชนิดเดียวกัน จำนวน 19 ราย และให้ผลการทดสอบบวก จำนวน 10 ราย (คิดเป็นร้อยละ 53) อาจเกิดจากจำนวนประชากรผู้ป่วยโรคเรื้อนประเภทเชื้อน้อย (PB) ที่ใช้ในการประเมินชุดทดสอบนี้มีจำนวนน้อย

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของชุดตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาชนิดรวดเร็ว เพื่อหา Anti LID-1 (LID-1 rapid serological test) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถกล่าวได้ว่าชุดตรวจ LID-1 rapid serological test น่าจะมีประโยชน์ในการใช้เป็นชุดทดสอบเบื้องต้น (screening test) ในการคัดกรองผู้ป่วยโรคเรื้อนระยะแรกที่ไม่แสดงอาการไม่ชัดเจน เช่น การตรวจคัดกรองผู้ร่วมบ้าน หรือสัมผัสกับผู้ป่วยโรคเรื้อน หรือแรงงานต่างด้าวก่อนเข้าทำงานในประเทศไทย และผู้ป่วยที่ไม่พร้อมทดสอบด้วยวิธีการกีดผิวหนัง ก่อนที่จะทดสอบยืนยันด้วยวิธีมาตรฐานต่อไป เนื่องจากชุดตรวจนี้มีความไวสูง ทดสอบได้ง่าย สะดวก ให้ผลรวดเร็ว ราคาถูก และสามารถนำไปตรวจในภาคสนามได้ เพื่อลดการรอคอย ให้การวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว และรักษาได้ทันเวลา

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีงบประมาณ 2559 (เลขที่ 89/2559)

6. รายการอ้างอิง

- [1] สถาบันราชประชาสมาสัย, 2553, คู่มือการวินิจฉัยและการรักษาโรคเรื้อน, กรมควบคุมโรค, สมุทรปราการ, 69 น.
- [2] สถาบันราชประชาสมาสัย, 2557, รายงานอุบัติการณ์จากงานรักษาและป้องกันควบคุมโรคเรื้อน, น. 24-27, กรมควบคุมโรค, สมุทรปราการ.
- [3] สำนักงานบริหารคนงานต่างด้าว, 2557, สถิติรายปีคนงานต่างด้าวประจำปี 2557, เอกสารเผยแพร่, กรมการจัดหางาน, กรุงเทพฯ.
- [4] Duthie, M.S., Goto, W., Ireton, G.C., Reece, S.T., Cardoso, L.P.V., Martelli, C.M.T., Stefani, M.M.A., Nakatani, M., de Jesus, R.C., Netto, E.M., Balagon, M.V.F., Tan, E., Gelber, R.H., Maeda, Y., Makino, M., Hoft, D. and Reed, S.G., 2007, Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy, Clin. Vaccine Immunol. 14: 1400-1408.
- [5] Meeker, H.C., Schuller-Levis, G., Fusco, F., Giardina-Becket, M.A., Sersen, E. and Levis, W.R., 1990, Sequential monitoring of leprosy patients with serum antibody levels to phenolic glycolipid-I, a synthetic analog of phenolic glycolipid-I, and mycobacterial lipoarabinomannan, Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 58: 503-511.
- [6] Brennan, P.J. and Barrow, W.W., 1980, Evidence for species-specific lipid antigens

- in *Mycobacterium leprae*, Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 48: 382-387.
- [7] Shepard, C.C. and McRae, D.H., 1968, A method for counting acid-fast bacteria, Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 36: 78-82.
- [8] Paula Vaz Cardoso, L., Dias, R.F., Freitas, A.A., Hungria, E.M., Oliveira, R.M., Collovati, M., Reed, S.G., Duthie, M.S. and Martins Araújo Stefani, M., 2013, Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology, BMC Infect. Dis. 13: 497.
- [9] Turankar, R.P., Pandey, S., Lavania, M., Singh, I., Nigam, A., Darlong, J., Darlong, F. and Sengupta, U., 2015, Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples, Int. J. Mycobacteriol. 4: 54-59.
- [10] Martinez, A.N., Talhari, C., Moraes, M.O. and Talhari, S., 2014, PCR-based techniques for leprosy diagnosis: From the laboratory to the clinic, PLoS Negl. Trop. Dis. 8(4): e2655.
- [11] de Wit, M.Y., Faber, W.R., Krieg, S.R., Douglas, J.T., Lucas, S.B., Montreewasuwat, N., Pattyn, S.R., Hussain, R., Ponnighaus, J.M. and Hartskeerl, R.A., 1991, Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues, J. Clin. Microbiol. 29: 906-910.
- [12] Duthie, M.S., Balagon, M.F., Maghanoy, A., Orcullo, F.M., Cang, M., Dias, R.F., Collovati, M. and Reed, S.G., 2014, Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, J. Clin. Microbiol. 52: 613-619.