# การพัฒนาวิธีอิไลซา สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei

# Development of ELISA method for detection of Burkholderia pseudomallei antibody

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศราวุธ สุทธิรัตน์ [1], ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ [1], ณัฐริณี หอระตะ [1], สุทิน วันสวัสดิ์ [1]
[1]กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

**บทคัดย่อ**

พัฒนาวิธี ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยการทำ checkerboard titration เมื่อทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยและกลุ่มตัวอย่างควบคุม จำนวน 54 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มประกอบด้วย ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส 24 ตัวอย่าง ผู้ที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่ระบาดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 10 ตัวอย่าง ผู้ที่มีสุขภาพดีซึ่งไม่มีภูมิลำเนาในพื้นที่ระบาด 10 ตัวอย่าง และผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่เมลิออยโดสิส (ซิฟิลิส, ภูมิต้านตนเอง, ไทฟอยด์, มัยโคพลาสมา, ไวรัสตับอักเสบ บี, ไวรัสตับอักเสบ ซี, ไข้เลือดออก และ มะเร็งตับ) 10 ตัวอย่าง คำนวณค่า cut-off ได้ 0.21 พบผลบวกปลอมในกลุ่มตัวอย่างที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาด 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคอื่น ๆ เมื่อคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบได้ร้อยละ 100, 96.7 และ 98.2 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้ แม้จะมีความไว และความจำเพาะสูง แต่ยังมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ไม่สะดวกในการนำไปใช้ในพื้นที่ห่างไกล ซึ่งงานวิจัยนี้ควรจะพัฒนา ปรับปรุง และเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อความน่าเชื่อถือของวิธีทดสอบต่อไป

**คำสำคัญ : เมลิออยโดสิส / ELISA / checkerboard titration**

**Abstract**

Optimal conditions of ELISA method for Burkholderia pseudomallei antibody detection were developed by checkerboard titration. Four groups of 54 sera consisting of 24 patient sera, 10 human sera in endemic areas, 10 sera of normal healthy population inhabitant of endemic area and 10 of other diseases (syphilis, autoimmune, typhoid, mycoplasma, hepatitis B, hepatitis C, dengue fever & hepatocellular carcinoma). The cut-off of this method was 0.21. One sample of human in endemic area showed false positive result but no cross reaction with other diseases. Sensitivity, specificity and efficiency of diagnosis were 100%, 96.7% and 98.2% respectively. Although developed ELISA showed high sensitivity and specificity but had complicated procedure so was not suitable to apply in rural area. However, more samples should be included for increasing reliability of this test method.

**Keyword: Melioidosis / ELISA / checkerboard titration**

**บทนำ**

เมลิออยโดสิส (melioidosis) เป็นโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่มีชื่อว่า Burkholderia pseudomallei ซึ่งพบได้ทั้งในคนและสัตว์ สำหรับในประเทศไทยพบโรคนี้ได้ทุกภาค แต่พบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชาวไร่ชาวนาที่ทำงานกับดินและน้ำ จากการสำรวจพบว่าระดับแอนติบอดีต่อเชื้อของคนปกติในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการติดเชื้อ (seroprevalence) ประมาณร้อยละ 20 ในปี พ.ศ.2551 สำนักระบาดวิทยาได้รับรายงานผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสจำนวนทั้งสิ้น 1,098 ราย อัตราป่วย 1.74 ต่อประชากรแสนคน อัตราตายร้อยละ 0.73 แนวโน้มอัตราป่วยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 0.50 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2544 เป็น 1.74 ต่อประชากรแสนคน ในปี พ.ศ. 2551 ซึ่งมีอัตราป่วยต่อประชากรแสนคนสูงที่สุดในรอบ 10 ปี ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2553 -2554 ยังพบว่า สถานการณ์ของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น พบผู้ป่วยถึง 2,092 รายและ 3,920 ราย (4.56 และ 6.13 ต่อประชากรแสนคน) ตามลำดับ (สำนักระบาดวิทยา, 2555) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโรคเมลิออยโดสิสยังเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทย

สำหรับวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei นั้นมีหลายวิธี เช่น ELISA, indirect hemagglutination และ immunochromatographic test เป็นต้น วิธี ELISA เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้ทั้งชนิด IgM และ IgG จากผลการวิจัยพบว่าวิธี ELISA นั้นมีความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 82 และ 72 ตามลำดับ โดยใช้ affinity-purified antigen แต่ถ้าใช้ crude antigen จะมีความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 81 และ70ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ IgG ELISA จะชี้บ่งการเกิดโรคได้ดีกว่า IgM ELISA อีกด้วย (Chantratita N, 2007) สำหรับวิธี indirect hemagglutination พบว่า มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 73 และ64 ตามลำดับ (Chenthamarakshan V, 2001) และมีข้อเสียคือไม่สามารถใช้แยกระหว่างการติดเชื้อปัจจุบัน (current infection) หรือการติดเชื้อที่หายแล้ว (previous infection) และ เนื่องจากประชาชนที่อาศัยอยู่ในท้องถิ่นต่าง ๆ กันมีระดับแอนติบอดีไม่เท่ากัน ระดับแอนติบอดีที่ใช้ในการแยกผู้ป่วยจากคนปกติ (cut off titer) จึงแตกต่างกันออกไปในแต่ละแห่ง ทำให้การใช้ระดับแอนติบอดีในการวินิจฉัยโรคเป็นไปด้วยความยากลำบาก ส่วนวิธี immunochromatographic test เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว ซึ่งจากผลการวิจัยของ Chuash SC และคณะ โดยใช้ Panbio IgG kit พบว่าความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 50.6 และ 94.7 ตามลำดับ ส่วน Panbio IgM kit มีความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 72.0 และ 71.5 ตามลำดับ (Chuah SC, 2005) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีราคาค่อนข้างสูง

ด้วยเหตุนี้ทางคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei โดยวิธี ELISAให้มีความแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ต่อเชื้อนี้ และเกิดผลบวกปลอมได้น้อยกว่าวิธีอื่น ทั้งยังมีราคาถูก และเหมาะสมสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปอีกด้วย

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei โดยวิธี ELISA

2. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei โดยวิธี ELISA ต่อไป

**ขอบเขตการวิจัย**

ทำการพัฒนาวิธี ELISA โดยใช้ crude antigen เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาแอนติบอดีชนิด IgG ต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei โดยใช้ซีรัมผู้ป่วย 24 ตัวอย่าง และซีรัมควบคุมจากผู้ที่มีสุขภาพดี ผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาดและผู้ป่วยโรคอื่น ๆ จำนวน 30 ตัวอย่าง

**การทบทวนวรรณกรรม**

เมลิออยโดสิสเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียรูปแท่งติดสีแกรมลบที่มีชื่อว่า Burkholderia pseudomallei เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะ septicemia และปอดอักเสบในประเทศทางแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงสูงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาล่าช้าหรือไม่ถูกต้อง

สามารถพบเชื้อนี้ได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปเช่น ดิน น้ำและในนาข้าว (Chambon L, 1955) เชื้อสามารถเคลื่อนไหวได้โดยอาศัย flagella ที่ปลายทั้ง 2 ข้างเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42OC ไม่สร้างสปอร์ ต้องพึ่งพาออกซิเจนเพื่อการอยู่รอด และอาศัยอยู่ภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ลักษณะโคโลนีมีหลายแบบ ตั้งแต่เป็นเมือกหรือเรียบขรุขระ และย่น มีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นไอดินที่ระเหยจากดินหลังฝนตกใหม่ๆ(earthy smell) เชื้อมีความทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดีโดยสามารถมีชีวิตอยู่ในอุณหภูมิต่ำในตู้เย็นได้หลายเดือน (อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2553)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาโดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ B. pseudomallei ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบว่า ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อนี้ได้ในเด็กอายุระหว่าง 6 เดือนถึง 4 ปี โดยในแต่ละปีจะมีเด็กติดเชื้อใหม่ประมาณร้อยละ 25 ความชุกของโรคแปรผันตามฤดูกาล โดยพบจำนวนผู้ป่วยสูงสุดในฤดูฝน เนื่องจากเป็นช่วงที่เกษตรกรมีโอกาสสัมผัสและรับเชื้อจากดินหรือน้ำที่มีการปนเปื้อนเชื้ออยู่มากที่สุด ส่วนใหญ่เชื้อเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่เกิดบาดแผลหลังจากการสัมผัสดินและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่

การวินิจฉัยโรคสามารถแบ่งออกได้ 4 วิธี คือ

1. การเพาะเชื้อ การเพาะเชื้อจากเลือดหรือสิ่งส่งตรวจ ถือเป็น gold standard วิธีนี้มีความไวและความน่าเชื่อถือในการวินิจฉัยโรคดีมาก แต่ต้องอาศัยความชำนาญในการเพาะแยกเชื้อรวมทั้งการแปลผลความไวของเชื้อต่อยา Co-trimoxazole โดยทั่วไปการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกจะได้ผลใน 3-5 วัน ซึ่งใช้เวลานาน แม้จะมีการนำเทคนิคต่างๆเข้ามาใช้เพื่อลดระยะเวลาในการเพาะเชื้อ แต่ก็ยังมีค่าใช้จ่ายที่สูง

2. การตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อในซีรัม หรือวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา ประกอบด้วย

2.1 Indirect hemagglutination (IHA) การตรวจโดยวิธีนี้ใช้ crude antigen ของเชื้อ เคลือบบนผิวของเม็ดเลือดแดงซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยจะจับกลุ่มให้เห็น เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและให้ผลรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถแยกผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในปัจจุบันจากผู้ป่วยที่เคย

มีการติดเชื้อมาก่อน สามารถตรวจพบแอนติบอดีในคนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งของโรคที่มีสุขภาพแข็งแรง และไม่เคยเป็นโรคนี้มาก่อนด้วย และยังพบผลบวกปลอมได้จากการติดเชื้อ Mycobacterium tuberculosis และ Pseudomonas aeruginosa อีกด้วย

2.2 Complement fixation test (CFT) วิธีนี้ใช้แอนติเจนของเชื้อที่แตกต่างกัน มีความไวในการตรวจวินิจฉัยโรคอยู่ระหว่างร้อยละ 80-100 แต่พบผลบวกปลอมได้จากการติดเชื้ออื่น ๆ เช่น วัณโรค เลปโตสไปโรซิส ไข้ไทฟอยด์ ไข้หวัดใหญ่

2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่มีการพัฒนาออกมามากที่สุด โดยใช้แอนติเจนของเชื้อที่แตกต่างกัน สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้ทั้งชนิด IgG ซึ่งจะให้ความไวและความจำเพาะอยู่ระหว่างร้อยละ 82-96 และ 94-96 ตามลำดับ และ IgM จะให้ความไวและความจำเพาะอยู่ระหว่างร้อยละ 64-75 และ 82-97 ตามลำดับ

2.4 Indirect fluorescent antibody test (IFA) การตรวจโดยวิธีนี้ใช้ crude antigen ของเชื้อ มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 93 และ 95 ตามลำดับ ใช้ในการติดตามการรักษาได้ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้กล้องfluorescent microscope ซึ่งมีราคาแพง

2.5 Immunochromatographic test (ICT) เป็นวิธีที่ง่ายและได้ผลรวดเร็ว สามารถตรวจหาแอนติบอดีได้ทั้งชนิด IgM ซึ่งจะให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 และ 95 ตามลำดับ และ IgG ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 93 และ 95 ตามลำดับ แต่มีราคาแพง

3. การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ ทำได้ 3 วิธีคือ enzyme-linked immunosorbent assay, latex agglutination และ indirect immunofluorescent

4. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคทาง PCR เพื่อนำมาวินิจฉัยโรคนี้ โดยใช้ primer ที่แตกต่างกัน มีความไวในการวินิจฉัยโรคร้อยละ100 แต่มีความจำเพาะร้อยละ 67 อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวยังมีราคาแพงและต้องอาศัยความชำนาญ (เพลินจันทร์ เชษฐ์โชติศักดิ์, 2547)

**วิธีดำเนินการวิจัย**

1. กลุ่มตัวอย่างทดสอบ ประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส (case) และกลุ่มควบคุม (control) รวม 54 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

1.1 ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส ที่ทดสอบด้วยหลักการ agglutination หรือ IFA ที่ให้ผลบวกที่ไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 160 จำนวน 24 ตัวอย่าง

1.2 ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาดที่ไม่ได้เป็นโรคเมลิออยโดสิส (อำนาจเจริญ, สกลนคร, กาฬสินธุ์, อุบลราชธานี, อุดรธานี, ชัยภูมิ และ ศรีสะเกษ) จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.3 ตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีสุขภาพดีที่ไม่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาด จำนวน 10 ตัวอย่าง

1.4 ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคอื่นๆที่ไม่ใช่โรคเมลิออยโดสิส (syphilis, autoimmune, typhoid, mycoplasma, hepatitis B, hepatitis C, dengue fever และ hepatocellular carcinoma) จำนวน 10 ตัวอย่าง

2. ขั้นตอนการทดสอบ

2.1 การเตรียมแอนติเจน

แอนติเจนของเชื้อ Burkholderia pseudomallei ได้มาจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาล

นครพนม จ.นครพนม ที่ผ่านการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อทางชีวเคมี นำมาเพาะเชื้อ แล้วนำไป sonicate ที่ 20KHz เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี nanodrop และแบ่งเก็บเป็น aliquot ที่ -200C จนกว่าจะใช้งาน

2.2 ขั้นตอนการทำ checkerboard titration เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย ระดับความเข้มข้นแอนติเจนของเชื้อ Burkholderia pseudomallei, ระดับความเข้มข้นและชนิดของblocking, ระดับความเข้มข้นของซีรัมที่ใช้, ระดับความเข้มข้นของ goat anti-human IgG conjugated HRP และระยะเวลาที่เหมาะสมในการ incubate แต่ละขั้นตอน

3. ขั้นตอนการหาความไว ความจำเพาะ ประสิทธิภาพ ของการทดสอบ

นำวิธี ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับตัวอย่างน้ำเหลืองผู้ป่วย และตัวอย่างควบคุม จำนวน 54 ตัวอย่าง เพื่อหาความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบต่อไป

4. สถิติที่ใช้ทดสอบ

4.1 การคำนวณหาค่า cut off ของวิธี ELISA จากสูตร

ค่า cut off = mean of negative control + 2 SD

4.2 การคำนวณประสิทธิภาพของการทดสอบ ซึ่งประกอบด้วย ความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ค่าทำนายผลบวก หรือ predictive value of positive (PPV), ค่าทำนายผลลบ หรือ predictive value of negative (NPV) และ ประสิทธิผลของวิธีทดสอบ (efficiency)

**ผลการวิจัย**

แอนติเจนของการทดสอบ

แอนติเจนของการทดสอบได้มาจากเชื้อ Burkholderia pseudomallei จากโรงพยาบาลศูนย์นครพนม จังหวัดนครพนม เมื่อนำมาเพาะเชื้อใน blood agar แล้วนำไป sonicated ที่ 20KHz เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี nanodrop พบว่าความเข้มข้นที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 4.2 mg/dl และแบ่งเก็บเป็น aliquot ที่ -200C จนกว่าจะใช้งาน ซึ่งนำมาเคลือบไมโครไตเตอร์เพลทด้วยแอนติเจนความเข้มข้น 1 µg/dl ปริมาตร 50 µl/หลุม

การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนของเชื้อ Burkholderia pseudomallei ที่เตรียมได้โดยวิธี sonicate

จากการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimized condition) ของหลักการ ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ Burkholderia pseudomallei ซึ่งทำโดย checkerboard titration มีขั้นตอนโดยสรุปดังต่อไปนี้

ใช้แอนติเจนความเข้มข้น 1 µg/dl เคลือบไมโครไตเตอร์เพลท 50 µl/หลุม จากนั้น block ด้วย 1% bovine serum albumin 100 µl/หลุม แล้วเจือจางซีรัมเป็น 1:200 ใส่หลุมละ 100 µl จากนั้นจึงใส่ goat anti-human IgG conjugated HRP ที่เจือจางเป็น 1:80,000 หลุมละ 100 µl โดยที่ทุกขั้นตอน incubate เป็นเวลา 30 นาที และล้าง 3 ครั้งด้วย PBST 100 µl/หลุม แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดซัลฟุริก นำไปวัด OD ที่ความยาวคลื่น 450 nm

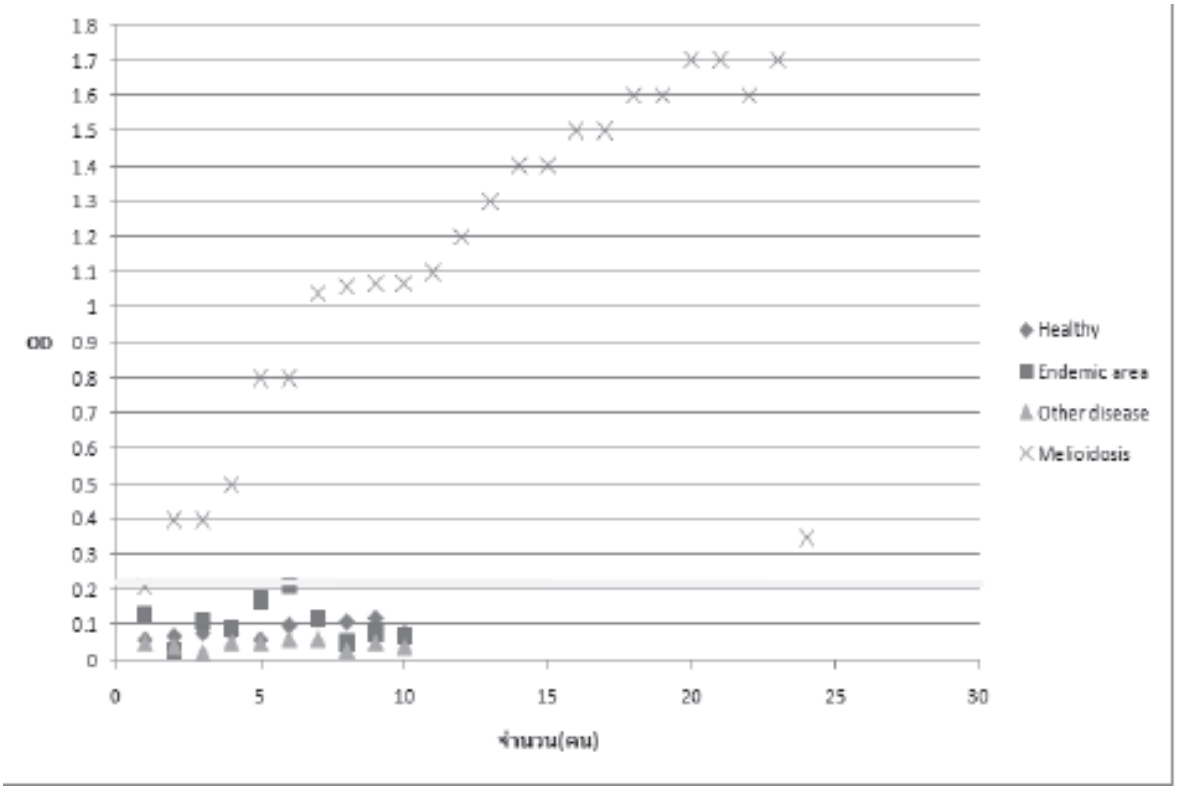
โดยที่ positive control serum ให้สีเข้มที่สุด และมีค่า OD สูงกว่า cut off และ negative control serum ให้สีจางที่สุด และมีค่า OD ต่ำกว่า cut off และ reagent ไม่เปลี่ยนสี

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้วนำไปทดสอบกับกลุ่มควบคุม 10 ตัวอย่างเพื่อคำนวณหาค่า cut off โดยใช้สูตร mean + 2 SD ได้ค่า cut off เท่ากับ 0.21

การหาความไว ความจำเพาะและประสิทธิผลของวิธีการ ELISA ที่พัฒนาขึ้น

นำสภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบกลับกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยและกลุ่มตัวอย่างควบคุม จำนวน 54 ตัวอย่างประกอบด้วย ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส 24 ตัวอย่าง ผู้ที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาด 10 ตัวอย่าง ผู้มีสุขภาพดีที่ไม่มีภูมิลำเนาในพื้นที่ระบาด 10 ตัวอย่าง และผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรคเมลิออยโดสิส 10 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าให้ผลบวกปลอมกับกลุ่มตัวอย่างที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาด 1 ตัวอย่าง (จากกาฬสินธุ์) และไม่พบผลข้ามกลุ่มกับโรคอื่น ๆ

กราฟแสดง ผลการทดสอบกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยและกลุ่มตัวอย่างควบคุมด้วยสภาวะที่เหมาะสมที่พัฒนาขึ้นของหลักการELISA




จากการคำนวณพบว่า ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าประสิทธิผลของการทดสอบมีค่าเป็น 100, 96.7, 96, 100 และ 98.2% ตามลำดับ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และค่าประสิทธิผลของวิธี ELISAที่พัฒนาขึ้น

| | |
|---|---|
| ค่าความไว (Sensitivity) | 100 % |
| ค่าความจำเพาะ (Specificity) | 96.7 % |
| ค่าทำนายผลบวก (PPV) | 96 % |
| ค่าทำนายผลลบ (NPV) | 100 % |
| ค่าประสิทธิผล (Efficiency) | 98.2 % |

**อภิปรายผลการวิจัย**

จากผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของโรคเมลิออยโดสิสด้วยหลักการ ELISA ที่พัฒนาขึ้น โดยการทำ checkerboard titration พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและประสิทธิภาพของการทดสอบร้อยละ 100, 96.7, 96, 100 และ 98.2 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Limmathurotsakul D et al (Limmathurotsakul D, 2011) ซึ่งทดสอบด้วยหลักการเดียวกันและใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยวิธี sonicated เหมือนกัน พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ 80.5 และ 95.8 ตามลำดับ ผลที่ได้ต่างกันนั้น น่าจะเกิดจาก Limmathurotsakul D และคณะใช้จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากกว่า ในขณะที่การศึกษาของ Chantratita N et al. (Chantratita N, 2007) และ Dharakul T et al. (Dharakul T, 1997) พบว่ามีความไวร้อยละ 82 และ 85.7 ตามลำดับ มีความจำเพาะร้อยละ 72 และ 82.5 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการศึกษาของคณะผู้วิจัย เนื่องจาก Chantratita N et al.และ Dharakul T et al. ใช้แอนติเจนชนิด affinity purified antigen และChantratita N et al.ได้ทำการศึกษาโดยใช้ crude antigen ก็พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 81, 70, 62 และ 86 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้ต่างจากคณะผู้วิจัยอาจเกิดจาก Chantratita N et al. ใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากกว่า และเตรียม crude antigen ด้วยการทำลายด้วยความร้อน แต่คณะผู้วิจัยใช้ crude antigen ที่เตรียมด้วยวิธี sonicated สำหรับ Phung LV et al. ได้ศึกษาโดยใช้แอนติเจนชนิด purified glycolipid antigen พบว่ามีความไว ความจำเพาะร้อยละ 98 และ 98.9 ตามลำดับ ซึ่งได้ค่าที่ต่างจากการศึกษาของคณะผู้วิจัย อาจเกิดจากใช้แอนติเจนต่างชนิด หรือใช้จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากกว่าเช่นกัน

สำหรับการศึกษาของ Wongratanacheewi S et al (Wongratanacheewi S, 2001).พบว่าเกิดผลบวกปลอมในกลุ่มโรคแบคทีเรียแกรมบวก โดยพบมากในเชื้อกลุ่ม Stapphylococcus อาจเกิดจากผู้ป่วยเคยได้รับเชื้อ Burkholderia pseudomallei มาก่อน หรือเกิดจาก mixed infection ในขณะที่คณะผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษาโรคในกลุ่มนี้ ในขณะเดียวกันการศึกษาของคณะผู้วิจัยพบว่าเกิดผลบวกปลอมในกลุ่มผู้ที่มีภูมิลำเนาในพื้นที่การระบาดจำนวน1ตัวอย่างคือจังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งอาจเกิดจากตัวอย่างของผู้ที่เคยติดเชื้อมาก่อน และได้รับการรักษาหายแล้วแต่ยังมีแอนติบอดีหลงเหลืออยู่ ในขณะที่การศึกษาของ Phung LV et al. (Phung LV, 1995) พบผลลบปลอมในกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน1ตัวอย่าง แต่ในส่วนของคณะผู้วิจัยนั้นไม่พบ ซึ่งอาจเกิดจากการใช้แอนติเจนที่ต่างชนิดกัน และการศึกษาของ Kunakorn M et al. พบผลลบปลอมจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยใช้แอนติเจนชนิด crude antigen ด้วยวิธี sonicated เช่นเดียวกับคณะผู้วิจัย แต่อาจเกิดจากใช้จำนวนกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยที่น้อยกว่า

จากการศึกษาของ Kunakorn M et al.(Kunakorn M, 1990) โดยการศึกษาตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM พบว่ามีความไว และความจำเพาะร้อยละ 88 และ 92.2 ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้นั้นน้อยกว่าคณะผู้วิจัย เนื่องจากคณะผู้วิจัยทำการศึกษาตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG และอาจเกิดจาก Kunakorn M et al.ใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกซึ่งอาจจะไม่อยู่ในระยะเฉียบพลัน ในขณะที่การศึกษาของ Dharakul T et al (Dharakul T, 1997). ทำการศึกษาผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสระยะเฉียบพลันในพื้นที่การระบาดพบว่าแอนติบอดีชนิด IgG มีความไว และความจำเพาะร้อยละ 85.7 และ 82.5 ตามลำดับ และแอนติบอดีชนิด IgM มีความไวและความจำเพาะร้อยละ 63.5 และ 81.8 ตามลำดับ ซึ่งการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG มีค่าสูงเช่นเดียวกับการศึกษาของทางคณะผู้วิจัย

สำหรับการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสทางห้องปฏิบัติการนอกจากวิธี ELISA แล้ว พบว่า ยังมีวิธีการวินิจฉัยด้วยหลักการอื่น เช่น Indirect hemagglutination test (IHA) เป็นวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง สำหรับโรคเมลิออยโดสิสที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว แต่มีความไวและความจำเพาะที่ต่ำ จากการศึกษาของ Kunakorn M et al.(Kunakorn M, 1990). พบว่า IHA สามารถให้ผลลบได้ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดระยะเฉียบพลัน ส่วนการศึกษาของ Ashdown LR. et al.(Ashdown L, 1989) ที่ทำในกลุ่มผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด (endemic area) และผู้ที่ไม่ได้อยู่ในพื้นที่การระบาด (non-endemic area) พบว่า ELISA-IgG มีความไวมากกว่า IHA (ร้อยละ 74) ในขณะเดียวกันการศึกษาของ Chantratita N et al. พบว่า IHA มีความตรงของการทดสอบที่ต่ำในกลุ่มผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด ส่วนการศึกษาของ Wongratanacheewi S et al. พบว่า dot immunoassay และ IgG-ELISA มีความไว และความจำเพาะสูงกว่า IHA และพบว่า dot immunoassay และ IgG-ELISA นั้นมีค่าทำนายผลลบที่สูงเหมาะแก่กลุ่มประชากรที่มีความชุกสูงของโรคในการแยกกลุ่มผู้ที่เป็นโรคนี้ ออกจากผู้ที่ไม่ได้เป็นโรค ในขณะเดียวกัน dot immunoassay มีความไว และความจำเพาะน้อยกว่า IgG- ELISA อย่างไรก็ตาม IgG- ELISA มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ควรจะมีการพัฒนา ปรับปรุง เพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างมากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อไป

**ข้อเสนอแนะ**

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ ซึ่งควรจะเพิ่มกลุ่มตัวอย่างทดสอบและกลุ่มควบคุมให้มากขึ้นเพื่อความน่าเชื่อถือของผลการวิจัยต่อไป

**เอกสารอ้างอิง**


เพลินจันทร์ เชษฐ์โชติศักดิ์, วรรณพร วุฒิเอกอนันต์, วีระชัย โควสุวรรณ, สุภาภรณ์ พัวเพิ่มพูลศิริ, สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. (2547). **โรคเมลิออยโดสิส** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2555). **สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2554.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์.

อิสยา จันทร์วิทยานุชิต และคณะ. (2553). **แบคทีเรียทางการแพทย์** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Ashdown LR, Johnson RW, Koehler JM, Cooney CA. (1989). **Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis.** J Infect Dis. 160(2), 253-260.

Chambon L. (1955). **Isolement du bacille de Whitmore a partir du mileu exterieur.** Ann. Inst. Pasteur (Paris). 89, 229-35.

Chantratita N, Wuthiekanun V, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, Cheng AC, Chierakul W, Day NP, Peacock SJ. (2007). **Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Crude and Purified Antigens for Serodiagnosis of Melioidosis.** Clin Vaccine Immunol. 14(1), 110-3.

Chenthamarakshan V, Vadivelu J, Puthucheary SD. (2001). **Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of Burkholderia pseudomallei.** Diagn Microbiol Infect Dis. 39, 1-7.

Chuah SC, Gilmore G, Norton RE. (2005). **Rapid serological diagnosis of melioidosis: an evaluation of a prototype immunochromatographic test.** Pathology. 37(2), 169-171.

Dharakul T, Songsivilai S, Anuntagool N, Chaowagul W, Wongbunnate S, Intachote P, Sirisinha S. (1997). **Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis.** Am J Trop Med Hyg. 56(4), 418-423.

Kunakorn M, Boonma P, Khupulsup K, Petchclai B. (1990). **Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis.** J Clin Microbiol. 28(6), 1249 –1253.

Limmathurotsakul D, Chantratita N, Teerawattanasook N, Piriyagitpaiboon K, Thanwisai A, Wuthiekanun V, Day NP, Cooper B, Peacock SJ. (2011). **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Melioidosis: Better Than We Thought.** Clin Infect Dis. 52(8), 1024-1028.

Phung LV, Han Y, Oka S, Hotta H, Smith MD, Theeparakun P, Yabuuchi E, Yano I. (1995). **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a glycolipid antigen for the serodiagnosis of melioidosis.** FEMS Immunol Med Microbiol. 12(3-4), 259-264.

Wongratanacheewi S, Sermswan RW, Anuntagool N, Sirisinha S. (2001). **Retrospective Study on the Diagnostic Value of IgG ELISA, Dot Immunoassay and Indirect Hemagglutination in Septicemic Melioidosis.** Asian Pac J Allergy Immunol. 19, 129-133.