

การประเมินเบื้องต้นของชุดทดสอบโรคmelioidosisในปศุสัตว์ โดยวิธี Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

สุรพงษ์ วงศ์เกษมจิตต์* เรขา คณิตพันธ์ นิตยา ศรีแก้วเขียว

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 0-2579-8908-14 ต่อ 232 e-mail: surapongw@dld.go.th

บทคัดย่อ

ชุดทดสอบต้นแบบ Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (i-ELISA) ของโรคmelioidosisในปศุสัตว์ของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ได้ถูกผลิตขึ้นโดยการเตรียมแอนติเจนชนิด extracellular จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งแยกได้จากคนและสัตว์ (สุกรและแพะ) วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้านี้เพื่อประเมินคุณภาพของชุดทดสอบนี้ พบมีค่า optical density (OD) ของ lower control limit (LCL) และ upper control limit (UCL) ของ strong positive control (C++), weak positive control (C+), negative control (C-) และ conjugate control (Cc) ในชุดทดสอบอยู่ระหว่าง 0.810-1.182, 0.423-0.607, 0.199-0.307 และ 0.062-0.166 ส่วนค่า percent positivity (PP) อยู่ที่ 81.325-118.674%, 42.469-60.943%, 19.979-30.823% และ 6.224-16.667% ตามลำดับ (จากการทดสอบซ้ำ 500 ครั้ง) เมื่อพิจารณาค่า PP ที่มีการกระจายตัวในระดับต่างๆ ร่วมกับ Receiver-Operator Characteristic (ROC) curve ของระดับแอนติบอดีของซีรัมควบคุมบวกและลบ ได้จุด cut-off ของ i-ELISA ที่ PP 40% โดยมีค่าความไม่แน่นอนอยู่ระหว่าง PP 30-50% ในการประเมินคุณภาพชุดทดสอบ การควบคุมคุณภาพภายใน พบว่าจากการทดสอบซ้ำในแต่ละกลุ่มของ C++, C+, C- และ Cc จำนวน 20 ครั้งๆ ละ 5 เพลท ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงของค่า LCL และ UCL ตามที่กำหนดในระบบของการทดสอบ เมื่อทำการทดสอบกับซีรัมควบคุมบวกและลบที่ทราบประวัติชัดเจน โดยมีการเพาะแยกเชื้อยืนยัน ได้ค่า diagnosis sensitivity (DSe) 86.67%, ค่า diagnosis specificity (DSp) 91.40%, ค่าความแม่นยำ (Accuracy, Ac) ที่ 91.26% ส่วนค่า relative Se, Sp, Ac และ Kappa (K) ได้จากการเปรียบเทียบการขึ้นสูตรทางซีรัมวิทยากับวิธี Indirect haemagglutination (IHA) และ i-ELISA โดยทดสอบกับซีรัมแพะในพื้นที่จำนวน 590 ตัวอย่าง พบว่าค่า relative Se และ Sp ของ i-ELISA เป็น 76.03% และ 100% ส่วน Ac และ K เป็น 94.06% และ 0.827 ตามลำดับ ส่วนวิธี IHA จะมีค่าความไวต่ำมาก ซึ่งในการศึกษาค้นคว้านี้ การทดสอบวิธี i-ELISA และ IHA มีค่าความสอดคล้องกันในระดับพอใช้ ผลจากการศึกษาค้นคว้าต่างๆ รวมทั้งค่าความไวและความจำเพาะ พบว่าสามารถใช้ในการทดสอบเพื่อคัดกรองโรคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ที่อยู่ในระยะท้ายของ subclinical ถึงระยะที่แสดงอาการ ซึ่งจะมีค่าความไวค่อนข้างสูง เป็นประโยชน์ในการเฝ้าระวังและควบคุมโรคmelioidosisในปศุสัตว์ของประเทศไทย

คำสำคัญ: การประเมินเบื้องต้น ชุดทดสอบต้นแบบ i-ELISA โรคmelioidosis ปศุสัตว์

บทนำ

โรคเมลิออยโดสิส (Meliodosis) หรือ โรคมงคล่อเทียม มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีชื่อเรียกว่า *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) ทำให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ แสดงอาการแบบไม่รุนแรงหรืออาการรุนแรงและตายในที่สุด เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในเขตอากาศร้อนและกึ่งร้อน เช่น ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และออสเตรเลีย (Cheng and Currie, 2005) การเกิดโรคในสัตว์ในประเทศไทยยังมีรายงานไม่มากนัก ในสัตว์มักไม่แสดงอาการ รอยโรคที่พบคือ ฝีตามอวัยวะต่างๆ สัตว์จะผอมและตายในที่สุด (Ileri, 1965) ฝีมดที่พบในสัตว์ส่วนใหญ่จะมีลักษณะคล้ายเนยมีสีเขียวเหลือง เป็นตุ่มเล็กจำนวนมาก และโดยทั่วไปฝีมดจะพบได้ตามต่อมน้ำเหลือง ปอด ตับ ม้าม และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย ในแพะและรอยโรคที่พบมากคือ ตุ่มฝีมดตามอวัยวะ สุกพบฝีที่เยื่อโพรงจมูกและม้าม ส่วนใหญ่จะพบโรคได้ก็ต่อเมื่อสัตว์ป่วยตาย สัตว์ที่มีความไวต่อโรค ได้แก่ แพะ แกะ สุนัข โค ม้า สุขา แมว สัตว์ฟันแทะ ก็สามารถเกิดโรคได้เช่นกัน (Limmathurtsakul et al., 2012) อย่างไรก็ตามมีรายงานความเป็นไปได้ที่คนจะติดเชื้อโดยเข้าสู่บาดแผลจากการสัมผัสสิ่งคัดหลั่งของสัตว์ที่เป็นโรค (Choy et al., 2000) โรคนี้ถูกจัดให้เป็นโรคติดต่อจากสิ่งแวดล้อมและยังจัดเป็นโรคประจำถิ่น (endemic area) และเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยพบมีผู้ป่วยได้ทุกภาคและพบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรหรือผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับดินและน้ำ (Leelarasamee and Bovomkitti, 1989; Limmathurtsakul et al., 2010)

การวินิจฉัยโรคที่ถือเป็นมาตรฐานคือ การเพาะแยกเชื้อจากอวัยวะต่างๆ (Ketterer et al., 1986) ในแพะสามารถเพาะแยกเชื้อ *B. pseudomallei* ได้จากลูกแพะที่แท้ง มดลูกของแม่แพะที่ป่วยตาย ซึ่งการเพาะแยกเชื้อต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 - 3 วัน ดังนั้นการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรค ด้วยวิธีการทางซีรั่มวิทยา จึงมีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยโรคเบื้องต้นได้เร็วขึ้น ปัจจุบันห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ตรวจโรคในสัตว์ทางซีรั่มวิทยาใช้วิธี indirect haemagglutination test (IHA) ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2549) แต่ข้อจำกัดคือ มีค่า sensitivity ต่ำ ให้ผลไม่ชัดเจนในสัตว์สุขภาพดีที่มีระดับแอนติบอดีโตเตอร์ต่อเชื้อนี้ และมีข้อจำกัดในการแปลผลในพื้นที่ที่โรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น การนำวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) มาใช้จะเป็นการเพิ่มความไวและความจำเพาะในการทดสอบโรคได้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการรายงานโรค (Chantratita et al., 2007; Sermswan et al., 2000) วิธี indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะใช้ในการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ในสัตว์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและอ่านผลได้รวดเร็ว ใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน และทราบผลได้ภายใน 1 วัน (วิมล และคณะ, 2542) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานวิธี ELISA มีค่าความไวและความจำเพาะที่ดีกว่าวิธี IHA (Petkanjanapong et al., 1992; Sirisinha et al., 2000) อย่างไรก็ตามควรใช้วิธี ELISA ร่วมกับ IHA เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่น่าเชื่อถือมากขึ้น (Kunakorn et al., 1990)

วิธีการทดสอบโรคที่มีความไว จำเพาะ แม่นยำ และถูกต้อง เพื่อคัดแยกสัตว์ที่เป็นโรคแต่ไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการไม่เด่นชัดออกจากฝูง จะช่วยในการควบคุมและป้องกันไม่ให้เชื้อแพร่กระจายต่อไป ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้เตรียมชุดทดสอบ i-ELISA หาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว แต่การนำชุดทดสอบไปใช้ จำเป็นต้องมีการประเมินวิธีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ การศึกษานี้เป็นการประเมินชุดทดสอบโรคmelioidosisโดยวิธี i-ELISA ที่ผลิตขึ้นเอง เพื่อใช้ในการคัดกรองสำหรับการควบคุมและป้องกันโรคmelioidosisของประเทศให้สามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการทดสอบ

ซีรัมที่ใช้ในการประเมินชุดทดสอบ ประกอบด้วย

- ซีรัมควบคุมบวกและลบในชุดทดสอบ: ซีรัมควบคุมบวกเป็นซีรัมรวม (pooled sera) จากแพะที่ตรวจพบเชื้อ *B. pseudomallei* และมีปริมาณมากพอสำหรับใช้เป็นซีรัมควบคุมบวกในชุดทดสอบ เพื่อประเมิน upper control limit (UCL) และ lower control limit (LCL) ตามวิธีการของ Nielsen และคณะ (1996) ส่วนซีรัมควบคุมลบ ได้จากซีรัมรวมของแพะที่มีประวัติปลอดโรคmelioidosisและให้ผลลบทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี IHA ที่ระดับไตเตอร์ $\leq 1/10$ และปลอดจากโรค布鲁เซลโลซิสซึ่งให้ผลลบต่อการทดสอบโดยวิธี Rose Bengal test และ complement fixation test
- ซีรัมลบ: ตัวอย่างซีรัมจำนวน 500 ตัวอย่าง ได้จากแพะที่มีประวัติปลอดโรคmelioidosisและให้ผลลบทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี IHA (ระดับไตเตอร์ $\leq 1/10$) และปลอดโรค布鲁เซลโลซิสโดยการทดสอบด้วยวิธี Rose Bengal test และ complement fixation test
- ซีรัมบวก: ตัวอย่างซีรัมจำนวน 15 ตัวอย่าง ได้จากแพะที่เป็นโรคmelioidosis โดยมีการตรวจยืนยันผลจากการเพาะแยกเชื้อและให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี IHA ที่ระดับไตเตอร์ $\geq 1/320$ ทุกตัวอย่าง
- ซีรัมจากพื้นที่: เป็นซีรัมแพะที่ใช้สำหรับการประเมินความสอดคล้องของชุดทดสอบ ได้จากซีรัมแพะที่ส่งตรวจที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2556–2557 จำนวน 590 ตัวอย่าง ทำการทดสอบซีรัมโดยใช้วิธีทดสอบทั้งสองวิธี คือ IHA ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการทดสอบแอนติบอดีต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ตัดสินเป็นบวกที่ไตเตอร์ $\geq 1/320$ (สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ, 2549) และวิธี i-ELISA ที่พัฒนาเป็นชุดทดสอบ

i-ELISA system

การเตรียมแอนติเจน: เตรียมจากเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวน 1 สายพันธุ์ (DMST 21791 Lot 892: 16/02/06) และเชื้อที่เพาะแยกได้จากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ จำนวน 2 สายพันธุ์ (ได้จากสุกรที่ จ. เพชรบูรณ์ ปี 2552 และจากแพะที่ จ. นนทบุรี ปี 2553) ส่วนการเตรียมแอนติเจนแยกตามชนิดเชื้อโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mekaprateep และคณะ (2010) หลังจากได้ extracellular protein แล้ว จึงนำมารวมกันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณที่เหมาะสมของแอนติเจนที่ใช้สำหรับทดสอบโดย i-ELISA

ดำเนินการทดสอบโดยมีการปรับค่า parameters ต่างๆ ให้เหมาะสมในระบบและปรับมาตรฐานเพื่อใช้ในการทดสอบตามวิธีการของ Chantratita และคณะ (2007); Mekaprateep และคณะ (2010) กล่าวโดยย่อคือ ใช้แอนติเจนชนิด extracellular ของเชื้อที่เพาะแยกได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เติมนิคมของเพลทกันแบน 96 หลุม และ incubate ที่ 4°C นาน 18 ชั่วโมง หรือที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท 3 ครั้ง ด้วย washing buffer (0.05% Tween20 ใน PBS) เคาะบนกระดาษซับให้แห้ง แล้วเติมซีรัมควบคุมและซีรัมทดสอบ (dilution 1/200) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ล้างเพลท 3 ครั้ง และเติม Recombinant-Protein G-Peroxidase (HRP-rec-Protein G) conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที ล้างเพลท 3 ครั้ง หลังจากนั้นเติม ABTS peroxidase-substrate 100 ไมโครลิตร แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1% SDS อ่านค่า optical density (OD) ด้วย ELISA reader (Labsystems Multiskan MS, ฟินแลนด์) ที่ wavelength 414 นาโนเมตร

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบ i-ELISA

- การหาค่าของการควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control; IQC): โดยการประมวลค่าควบคุมคุณภาพภายในจาก strong positive control (C++), weak positive control (C+), negative control (C-) และ conjugate control (Cc) ที่ทำการทดสอบซ้ำ จำนวน 500 ซ้ำของ C++, C+, C- และ Cc แล้วนำค่าเหล่านั้นมาคำนวณค่า Mean และ Standard deviations (SD) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95% และนำมากำหนดเป็นค่า upper control limit (UCL) และ lower control limit (LCL) ของค่าควบคุมแต่ละค่า
- การตรวจสอบค่าควบคุม: ดำเนินการทดสอบ 5 เพลท/ครั้ง ทดสอบซ้ำจำนวน 20 ครั้ง สรุปเป็น "Shewhart Chart"
- การยอมรับการทดสอบของแต่ละเพลท: ต้องพิจารณาจากค่า C++, C+, C- และ Cc โดยค่า OD ที่วัดได้ และค่า percent positivity (PP) ทั้ง 4 ค่าของแต่ละเพลท จะต้องอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดของค่าควบคุมนั้นๆ จำนวน 3 หรือ 4 ค่า ของ UCL และ LCL (Crowther et al., 2006)

- การจัดการข้อมูล: ทำการวิเคราะห์ค่า OD โดยการใช้สูตรที่เหมาะสมในโปรแกรม Excel ทำเป็น template สำหรับ i-ELISA เพื่อแปลงเป็นค่า PP ตามสูตรข้างล่าง ดังนี้

$$PP(\%) = \frac{\text{Replicate OD value of test sample}}{\text{Median OD value of C + + control}} \times 100$$

ค่าทางสถิติ

การหาค่า cut-off: นำตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและลบที่ทราบแหล่งที่มาอย่างชัดเจน (ซีรัมควบคุมบวก = 15 ตัวอย่าง ซีรัมควบคุมลบ = 500 ตัวอย่าง) มาทดสอบด้วยวิธี i-ELISA พิจารณาการกระจายของตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม และ Receiver Operator Characteristic (ROC) Curve ซึ่งนำมาช่วยในการกำหนดค่า cut-off ในการทดสอบตัวอย่างซีรัม (Dawson and Trapp, 2004a; Bewick et al., 2004)

ค่าความไวการชันสูตร (Diagnostic Sensitivity; DSe), ความจำเพาะการชันสูตร (Diagnostic Specificity; DSp) ค่าการทำนายการเกิดโรค (Positive Predictive Value; PPV) ค่าการทำนายการไม่เกิดโรค (Negative Predictive Value; NPV) และค่าความถูกต้อง (Accuracy; Ac): โดยคำนวณค่า DSe, DSp และ Ac ของวิธีทดสอบ ได้จากการทดสอบในกลุ่มตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและลบ แล้วทำการประเมินผลโดยโปรแกรม Win Episcopes, version 2.0 ส่วนการประเมินค่า relative Se และ Sp จะไม่มี gold standard (Pouillot et al., 2002) แล้วทำการเปรียบเทียบกับวิธี IHA ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

ค่า Kappa (K): ค่า K เป็นค่าที่แสดงถึงความสอดคล้องของวิธีการทดสอบ 2 วิธี ได้นำมาประเมินวิธี i-ELISA กับวิธีมาตรฐานคือ การเพาะแยกเชื้อและให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาโดยวิธี IHA และเปรียบเทียบ i-ELISA กับ IHA เกณฑ์การพิจารณาค่า K คือ ค่าที่น้อยกว่า 0.20 หมายถึงมีความสอดคล้องน้อยมาก ใช้ไม่ได้, ค่า 0.21-0.40 มีความสอดคล้องระดับพอใช้, ค่า 0.41-0.60 มีความสอดคล้องระดับปานกลาง, ค่า 0.61-0.80 มีความสอดคล้องดี และค่า 0.81-1.00 มีความสอดคล้องระดับดีมาก (Dawson and Trapp, 2004b) สำหรับการวัดค่าความไม่แน่นอน (Uncertainty Measurement; UM) เป็นการวัดค่า PP ของ C+ มาประเมิน (Axel Colling, personal communication)

ผล

จากการทดสอบชุดทดสอบโรคเมลิออยโดสิสซ้ำ 500 ครั้งของซีรัมควบคุม พบว่า LCL และ UCL ของ C++, C+, C- และ Cc มีค่า OD ระหว่าง 0.810-1.182, 0.423-0.607, 0.199-0.307 และ 0.062-0.166 มีค่า PP ที่ 81.325-118.674%, 42.469-60.943%, 19.979-30.823% และ 6.224-16.667% ตามลำดับ (Table 1)

Table 1: Acceptance criteria for lower control limit and upper control limit of i-ELISA test kit for Melioidosis (n = 500)

Control values	Strong positive	Weak positive	Negative control	Conjugate control
No. of test	500	500	500	500
Max OD	1.394	0.611	0.298	0.197
Min OD	0.704	0.405	0.164	0.089
Mean of OD	0.996	0.515	0.253	0.114
SD	0.093	0.046	0.027	0.026
$\bar{X} \pm 2SD$	0.996 $\pm$ 0.186	0.515 $\pm$ 0.092	0.253 $\pm$ 0.054	0.184 $\pm$ 0.052
LCL-UCL: OD	0.810-1.182	0.423-0.607	0.199-0.307	0.062-0.166
LCL-UCL: PP (%)	81.325-118.674	42.469-60.943	19.979-30.823	6.224-16.667

Max OD = Maximum optical density Min OD = Minimum optical density LCL = Lower control limit

Mean of OD = Mean of optical density SD = Standard deviation UCL = Upper control limit

PP = Percent positivity

ค่า cut-off:

พิจารณาจากค่า PP ที่มีการกระจายตัวในระดับต่างๆ (Table 2) ร่วมกับ ROC curve ของระดับแอนติบอดีของซีรัมบวกและซีรัมนลบ และได้จุด cut-off ของ i-ELISA ที่ PP 40 % (Figure 1 และ Table 2) และมีค่าความไม่แน่นอนอยู่ระหว่าง PP 30-50%

Table 2: Distribution of percent positivity (PP) cut-off value in the i-ELISA in comparison with positive and negative for melioidosis diagnosis in goat.

Cut off value PP (%)	i-ELISA			
	positive*	negative**	Sensitivity (%)	Specificity (%)
10	15	157	100	11.20
20	15	313	100	62.60
30	14	416	93.33	83.20
40	13	457	86.67	91.40
50	11	486	73.33	97.20
60	10	500	66.67	100.00
70	7	500	46.67	100.00
80	4	500	26.67	100.00
90	0	500	0	100.00

**B. pseudomallei* isolation and IHA seropositive

** IHAseronegative

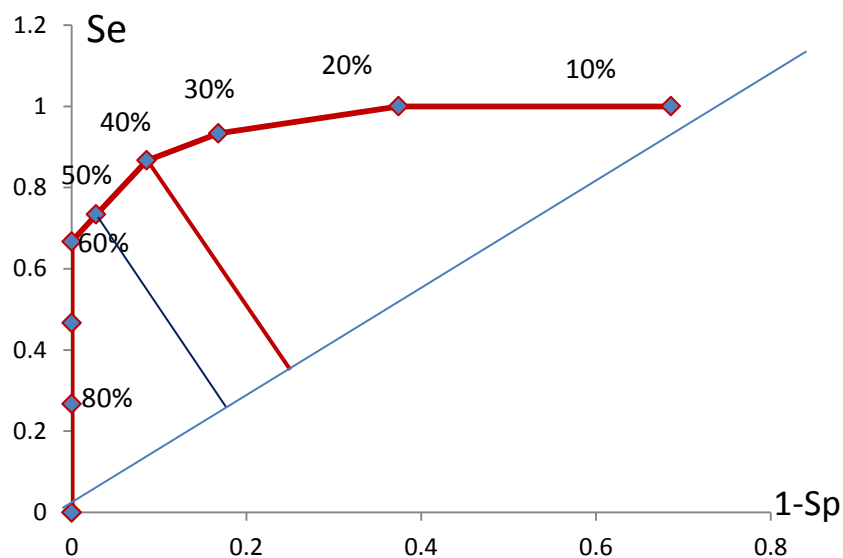


Figure 1: Receiver-Operator Characteristic (ROC) curve of performance of i-ELISA Melioidosis test kit.

การประเมินคุณภาพชุดทดสอบ i-ELISA

การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control: IQC) พบว่าจากการทดสอบซ้ำ C++, C+, C- และ Cc ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ใน range ของค่า LCL and UCL ตามที่ได้กำหนดในระบบ (Figure 2)

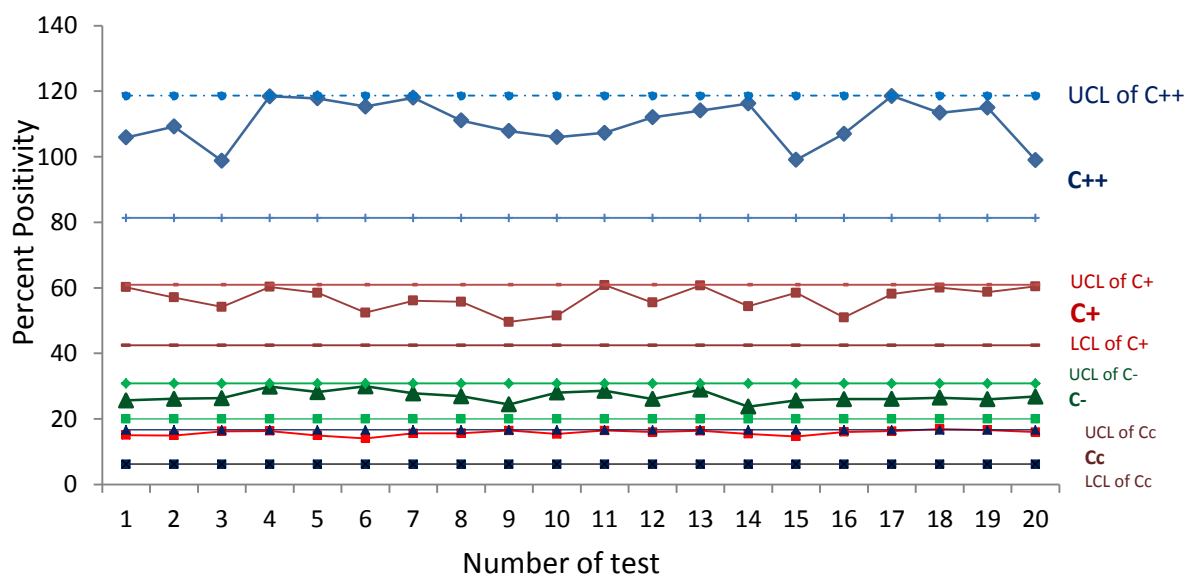


Figure 2: Summary Graph "Shewhart Chart" of Percent Positivity of Lower Control Limit (LCL) and Upper Control Limit (UCL) of i-ELISA Melioidosis test kit.

C++ = Strong Positive Control

C+ = Weak Positive Control

C- = Negative Control

Cc = Conjugate Control

จากการทดสอบโดยใช้ i-ELISA พบว่าค่า DSe เท่ากับ 86.67% ค่า DSp เท่ากับ 91.40% ค่าความแม่นยำ เท่ากับ 91.26% และค่า K เท่ากับ 0.336 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์พอใช้ (Table3) ส่วนค่า relative Se, Sp, Ac และ Kappa ที่ได้จากการเปรียบเทียบการทดสอบโดยใช้ชุด i-ELISA กับวิธี IHA ทำการทดสอบกับซีรัมของแพะในพื้นที่จำนวน 590 ตัวอย่าง เพื่อประเมินการทดสอบของแต่ละวิธีในการตัดสินใจการเป็นโรค ในการศึกษาครั้งนี้มีเกณฑ์การตัดสินใจจากการทดสอบวิธี IHA และ i-ELISA ที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี และ/หรือให้ผลบวกโดยวิธีใดวิธีหนึ่งเป็นการตัดสินใจบวกจากการทดสอบทางซีรัมวิทยา เพื่อเป็นการเพิ่มความไวของการทดสอบ พบว่าวิธี i-ELISA มีค่า relative Se และ Sp เป็น 76.03% และ 100% ส่วน Ac และ K เป็น 94.06% และ 0.827 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบวิธี i-ELISA และ IHA จะมีค่าความสอดคล้องกันระหว่าง 2 วิธี ในระดับพอใช้ คือ 0.235 (Table 4)

Table 3: Antibody detection against *B. pseudomallei* infection by i-ELISA and IHA at 95% confidence interval (Positive Control Sera = 15, Negative Control Sera = 500)

Methods	DSe %	DSp%	PPV%	NPV%	Ac%	K
i-ELISA	86.67 (69.46-100.0)	91.4 (88.94-93.86)	23.21 (12.16-34.27)	99.56 (98.96-100.0)	91.26	0.336
IHA	80.0 (59.76-100.0)	100	100	99.4 (98.73-100.0)	99.42	0.886
i-ELISA = IndirectEnzyme-linked immunosorbent assay				IHA = Indirect hemagglutination		
DSe = Diagnostic sensitivity		DSp = Diagnostic specificity		PPV = Positive predictive value		
NPV = Negative predictive value		Ac = Accuracy		K = Kappa		

Table 4: Antibody detection by i-ELISA and IHA for routine serological diagnosis using 590 field goat sera at 95% confidence interval.

Methods	Se%	Sp%	PPV%	NPV%	AC%	K
i-ELISA	76.03 (69.10-82.95)	100	100	92.69 (90.36-95.02)	94.06	0.827
IHA	44.52 (36.46-52.58)	100	100	84.57 (81.48-87.66)	86.27	0.547
Agreement of i-ELISA and IHA						0.235
i-ELISA = IndirectEnzyme-linked immunosorbent assay				IHA = Indirect hemagglutination		
Se = Sensitivity		Sp = Specificity		PPV = Positive predictive value		
NPV = Negative predictive value		Ac = Accuracy		K = Kappa		

วิจารณ์และสรุป

การพัฒนาชุดทดสอบโรคเมลิออยโดสิส i-ELISA ได้พัฒนาการเตรียมแอนติเจนจาก Chantratita และคณะ (2007) และ Mekaprateep และคณะ (2010) โดยปรับปริมาณสารให้เหมาะสม มีการประเมินผลและจัดทำเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปเบื้องต้นพร้อมใช้ ซึ่งในการประเมินได้ใช้เกณฑ์ยืนยัน การติดเชื้อ *B. Pseudomallei* จากการเพาะแยกเชื้อและให้ผลบวกทางซีรัมวิทยาเป็นมาตรฐานการตัดสินว่าเป็นบวก จากการประเมินพบว่า จุด cut-off ที่เหมาะสมคือ ที่ PP 40% (Figure 1 และ Table 2) จะมีค่าความไวชั้นสูง 86.67% (Table 2) ซึ่งค่าที่ได้พบว่ามีใกล้เคียงกับ Sirisinha และคณะ (1996) ได้รายงานค่าความไวอยู่ระหว่าง 81-93% ค่าความไวสามารถแปรผันได้ โดยขึ้นอยู่กับค่า background titer โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่เป็น endemic ของโรค

ส่วนค่าความจำเพาะ 91.40% พบว่าอยู่ใน range ที่ 88.34-93.86% เช่นเดียวกับที่ Sirisinha และคณะ (1996) ได้รายงานไว้ สำหรับค่าความแม่นยำ 91.26% เป็นค่าที่ค่อนข้างสูง และมีค่าความสอดคล้องกับการเพาะแยกเชื้อ 0.336 (Table 3) พบเป็นระดับที่พอใช้ได้ แต่ยังค่อนข้างต่ำ จากการพัฒนาชุดทดสอบในครั้งนี้ เมื่อได้พิจารณาการทำนายการเป็นโรคพบว่า ชุดทดสอบที่เตรียมนั้นมีค่าเพียง 23.21% ซึ่งค่อนข้างต่ำมาก ค่าการทำนายการเป็นโรคเป็นค่าหนึ่งที่น่าคิดว่า สัตว์ที่พบผลบวกจะมีโอกาสเป็นโรคเพียง 23.21% ทั้งนี้ค่าการทำนายการเป็นโรคนี้จะขึ้นกับความชุกของโรคด้วย โดยเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณตามหลักสถิติของชุดทดสอบ (Axel Colling, personel communication)

ซีรัมแพะที่ส่งตรวจโรคเมลิออยโดสิสทางห้องปฏิบัติการ ได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อประเมินค่า relative Se, Sp, Ac และ K พบว่าวิธี IHA และ i-ELISA มีค่าความสอดคล้องระหว่าง 2 วิธีนี้ ในระดับพอใช้ คือ 0.235 (Table 4) ทั้งนี้จะขึ้นกับระยะเวลาของการเป็นโรค ส่วนวิธี IHA จะมีค่าความไวต่ำและให้ผลไม่ชัดเจนในสัตว์สุขภาพดี และแปลผลได้ยากในสัตว์ที่มีระดับ titer ของแอนติบอดีต่อโรคนี้ ซึ่ง Chantratita และคณะ (2007) ได้มีข้อสังเกตในแต่ละวิธีว่า มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกันตามระยะของการเป็นโรค จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า i-ELISA มีค่าความไวและความจำเพาะที่ดีกว่าวิธี IHA ในช่วงที่สัตว์ติดเชื้อแบบ subclinical (Petkanjanapong, 1992; Sirisinha et al., 2000) ในการสรุปผลการตรวจ จึงควรใช้วิธี i-ELISA ร่วมกับ IHA เพื่อให้ได้ผลการตรวจที่น่าเชื่อถือมากขึ้น (Kunakorn, 1990) และจากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อใช้เกณฑ์การตัดสินการทดสอบ โดยตัดสินเป็นผลบวกที่มีผลบวกตรงกันทั้ง 2 วิธี และ/หรือ ผลบวกโดยวิธีใดวิธีหนึ่งเป็นผลบวกของการคัดกรองโรคเบื้องต้นนั้น พบว่าจะเพิ่มความไวในการทดสอบของ i-ELISA สูงกว่า IHA (Table 4) และสำหรับค่า Uncertainty ของชุดทดสอบอยู่ระหว่าง 30-50% เป็นข้อมูลที่ใช้ในการพิจารณาในกรณีที่ค่า PP อยู่ในช่วงค่า Uncertainty ให้ติดตามและเก็บตัวอย่างมาทดสอบซ้ำ (Fletcher et al., 2005) ในการแปลผลของชุดทดสอบ i-ELISA ได้สร้างโปรแกรม excel สำหรับการแปลผล เพื่อให้มีความสะดวก ถูกต้อง แม่นยำ และนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการที่เป็นเครือข่ายได้ทั้งหมด ทำให้ลด

ความผิดพลาดที่เกิดจากเทคนิคของผู้ปฏิบัติ ชุดทดสอบ i-ELISA สำหรับโรคเมลิออยโดสิสที่ผลิตขึ้นนี้ สามารถจะทดสอบได้ในสัตว์หลายชนิด เนื่องจากใช้คอนจูเกตเป็น recombinant Protein G ในระบบการทดสอบ (Mekaprateep et al., 2010) ชุดทดสอบที่เตรียมได้มีความคุ้มค่าและเหมาะสมสำหรับใช้เฝ้าระวังโรคในประเทศ เนื่องจากมีความไวค่อนข้างสูงและราคาไม่แพง รวมทั้งสามารถทดสอบตัวอย่างซีรัมได้เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก จะต้องตรวจโดยวิธีมาตรฐานคือ การเพาะแยกเชื้อเพื่อยืนยันการเป็นโรค

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้ศึกษาขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มอิมมูนและซีรัมวิทยาที่ช่วยเหลือในการทดสอบทางซีรัมวิทยา ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิมล เพชรกาญจนางค์ พิมพ์ใจ นัยโกวิท ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ สุชีพ ขำสวัสดิ์ และมยุรา กุสุมภ์. 2542. การใช้สารสกัดไลโปโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนของ *Burkholderia pseudomallei* เป็นแอนติเจน สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 41(3): 271-280.
- สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 2549. คู่มือมาตรฐานการชันสูตรโรคเมลิออยโดสิสโดยวิธีทางซีรัมวิทยา. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-11.
- Bewick, V., Cheek, L. and Ball, J. 2004. Statistics review 13: Receiver operating characteristic curves. Critical Care. 8: 508-512.
- Chantratita, N., Wuthiekanun, B., Limmathurotsakul, D., Thanwisai, A., Chantratita, W., Day, N.P.J. and Peacock, S. 2007. Prospective clinical evaluation of the accuracy of 16S rRNA real-time PCR assay for the diagnosis of melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77(5): 814-817.
- Cheng, A.C. and Currie, B.J. 2005. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. Clin. Microbial. Rev. 18: 383 – 416.
- Choy, J.L., Mayo, M., Janmaat, A. and Currie, B.J. 2000. Animal melioidosis in Australia. Acta. Tropica. 74: 153-158.
- Crowter, J.R., Unger, H. and Viljoen, G.J. 2006. Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. Res. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 25: 913-935.

- Dawson, B. and Trapp, R.G. 2004a. ROC curves. In: Basic & Clinical Biostatistics. 4th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York. p. 314-315.
- Dawson, B. and Trapp, R.G. 2004b. Measuring agreement between two people or methods. In: Basic & Clinical Biostatistics. 4th ed. McGraw-Hill Companies, Inc., New York. p. 118-119.
- Fletcher, R., Fletcher, H. and Suzanne, W. 2005. Clinical epidemiology: the essentials. 4th ed. Baltimore, Md: Lippincott Williams and Wilkins. p. 45.
- Ileri, S.Z. 1965. The indirect haemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. Br. Vet. J. 121: 164-170.
- Ketterer, P.J., Webster, W.R., Shield, J., Arthur, R.J., Blackall, P.J. and Thomas, A.D. 1986. Melioidosis in Intensive piggeries in south eastern Queensland. Aust. Vet. J. 63: 146-149.
- Kunakorn, M., Boonma, P., Khupulsup, K. and Petchclai, B. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 28: 1249-1253.
- Leelarasmee, A. and Bovomkitti, S. 1989. Melioidosis: review and update. Rev. Infect. Dis. 11: 413-425.
- Limmathurotsakul, D., Thammasart, S., Warrasuth, N., Thapanagulsak, P., Jatapai, A., Pengreungrojanachai, V., Anun, S., Joraka, W., Thongkamkoon, P., Saiyen, P., Wongratanacheewin, S., Day, N.P.J. and Peacock, S.J. 2012. Melioidosis in animals, Thailand, 2006-2010. Emerg. Infect. Dis. 18: 325-327.
- Limmathurotsakul, D., Wongratanacheewin, S., Teerawattanasook, N., Wongsuvan, G., Chaisuksant, S., Chetchotisakd, P., Chaowagul, W., Day, N.P. and Peacock, S.J. 2010. Increasing incidence of human melioidosis in Northeast Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82(6): 1113-1117.
- Mekaprateep, M., Tharavichitkul, P. and Srikitjakarn, L. 2010. Application of a non-species dependent ELISA for the detection of antibodies in sera of *Burkholderia pseudomallei* immunized goats. J. Microbiol. Methods. 83: 266-269.
- Nielsen, K., Gall, D., Kelly, W., Viglicco, A., Henning, D. and Garcia, M. 1996. Immuno-assay development application to enzyme immunoassay for the diagnosis for brucellosis. Agriculture and Agri-Food Canada, monograph. Nepean. 216 p.

- Petkanjanapong, V., Naigowit, P., Kondo, E. and Kanai, K. 1992. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). Asian Pacific J. Allergy and Immunol. 10(2): 145-150.
- Pouillot, R., Gerbier, G. and Gardner, I.A. 2002. "TAGS" a program for the evaluation of test accuracy in the absence of gold standard. Prev. Vet. Med. 53(1-2): 67-81.
- Serm Swan, R.W., Wongratanacheewin, S., Anuntagool, N. and Sirisinha, S. 2000. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63: 146-149.
- Sirisinha, S., Anuntagool, N. and Dharakul, T. 2000. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. Acta. Trop. 74: 235-245.
- Sirisinha, S., Anuntagool, N. and Intachote, P. 1996. Improved methods for diagnosis of melioidosis. J. Sci. Soc. Thailand. 22: 131-142.

Preliminary assessment of prototype test kit for Melioidosis in Livestock by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Surapong Wongkasemjit*, Reka Kanitpun, Nittaya Srikaewkeaw

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development,
Kasetklang, Jatujak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: 0-2579-8908-14, ext. 232; e-mail: surapongw@dld.go.th

Abstract

A prototype Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (i-ELISA) test kit is developed by National Institute of Animal Health using extracellular antigen of *Bukholderia pseudomallei* isolated from human and animals (swine and goat). From quality assessment of the test kit, optical density (OD) of lower control limit (LCL) and upper control limit (UCL) of strong positive controls (C++), weak positive controls (C+), negative control (C-) and conjugate control (Cc) are 0.810–1.182, 0.423–0.607, 0.199–0.307 and 0.062–0.166, respectively whereas percent positivity (PP) of those values are 81.325–118.674, 42.469–60.943, 19.979–30.823 and 6.224–16.667, respectively (from 500 repeated tests). Considering from the PP values together with the Receiver-Operator Characteristic (ROC) curve of antibody level of positive and negative controls, the cut-off and uncertainty of PP are at 40% and 30–50%, respectively. From 20 repeated test with 5 plates per time in each group of C++, C+, C- and Cc, the results are within the LCL and UCL range as recommended for the test system. Moreover, testing with positive and negative control sera confirmed by isolation, the diagnosis sensitivity (DSe), diagnosis specificity (DSp), and accuracy (Ac) are 86.67, 91.40 and 91.26%, respectively. Compared with routine serology diagnosis methods as Indirect Hemagglutination (IHA) and i-ELISA with 590 goat serum samples, relative Se, Sp, Ac and Kappa of i-ELISA are 76.03%, 100%, 94.06% and 0.827, respectively. From this study, IHA show low DSe and its result is fair correlated to i-ELISA. In conclusion, the developed i-ELISA containing the high sensitivity that it could be used as the effective screening test for surveillance and control of Melioidosis particularly in late subclinical and clinical infection in livestock in Thailand.

Key word: preliminary assessment, prototype i-ELISA test kit, melioidosis, livestock