การคัดเลือก *Burkholderia pseudomallei* แอนติเจนโดยวิธี Indirect Hemagglutination (IHA)

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์* สุชีพ ขำสวัสดิ์*
วิมล เพชรกาญจนาพงศ์* วสันต์ โคตรพรหม*
พิมพ์ใจ นัยโกวิท* มยุรา กุสุมภ์*

Wangroongsarb P, Kumsawat S, Petkanjanapong W, Kotprom W, Naigowit P, Kusum M. Selection of *Burkholderia pseudomallei* antigens for antibody detection by indirect hemagglutination method. Chula Med J 2000 Aug; 44(8): 631 - 42

Problem : *The diagnosis of melioidosis can be established by isolation and identification of the etiologic agent for confirmation diagnosis but it is time consuming (3 days) and requires experience in recovery and recognition. Immunological methods are available to develop laboratory diagnosis of melioidosis, and correlation with symptoms has been reported in one day.*

Objective : *In this study we attempted to find appropriate antigens that are more sensitive and specific to Burkholderia pseudomallei by indirect hemagglutination test for diagnosis melioidosis. Therefore, the appropriated antigen will prepared to IHA kit and we can distributed to hospital.*

Setting : *National Institute of Health, Department of Medical Sciences.*

Research design : *Comparative study of diagnostic tests.*

Patients : *70 sera samples were obtained from bacteriologically confirmed melioidosis pateints (B.pseudomallei) admitted to Sapprasitiprasong Hospital, Ubonratchatani and 54 sera samples were collected from healthy blood donors as negative serum control. An additional 55 sera that samples were obtained from patients with other bacterial infections as negative serum control.*

* สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข (NIH) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Methods : *All samples were examined by indirect hemagglutination test (IHA) using of 3 types of antigen, melioidin, extracellular protein, and lipopolysaccharide. We used a cut-off point by receiver operating characteristic (ROC). Diagnostic tests calculated sensitivity, specificity, accuracy, and positive and negative predictive values.*

Results : *The suitable cut off values of IHA titer were ≥ 1:160, ≥ 1:80, and ≥ 1:80, respectively. The melioidin statistics were sensitivity 84.28 %, specificity 93.27 %, accuracy 89.65 %, positive predictive value 89.39 %, and negative predictive value 89.81 %. For extracellular proteins they were sensitivity 88.57 %, specificity 93.27 %, accuracy 91.4 %, positive predictive value 89.9 % and negative predictive value 92.4 %. For lipopolysaccharide they were sensitivity 81.43 %, specificity 97.12 %, accuracy 90.80 %, positive predictive value 95.00 % and negative predictive value 88.60 %.*

Conclusions : *In this study, judging from ROC analysis, the suitable cut off values of IHA titer of melioidin, extracellular protein, and lipopolysaccharide were ≥ 1:160, ≥ 1:80, and ≥ 1:80, respectively. The extracellular protein gave more positive results (88.57 %) and higher sensitivity (88.57 %) than the other tests for melioidosis while the lipopolysaccharide showed the highest specificity (97.12 %) and lowest cross reactivity with other infectious diseases. Lipopolysaccharide preparation give low yield and it is not suitable when coated with sheep red blood cells. Therefore, the extracellular protein is more suitable for preparation of IHA kits than the other antigens.*

Key words : *Melioidosis, Indirect heamagglutination test.*

Reprint request : Wangroongsarb P, National Institute of Health (NIH) Department of Medical Sciences, Nontaburi Province 11000, Thailand.

Received for publication. May 12, 2000.

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์, สุชีพ ขำสวัสดิ์, วิมล เพชรกาญจนาพงศ์, วสันต์ โคตรพรหม, พิมพ์ใจ นัยโกวิท, มยุรา กุสุมภ์. การคัดเลือก *Burkholderia pseudomallei* แอนติเจนโดยวิธี Indirect Hemagglutination (IHA). **จุฬาลงกรณ์เวชสาร** 2543 ส.ค; 44(8): 631 - 42

ปัญหา : *เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสทางห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะแยกเชื้อจะให้ผลที่แน่นอน แต่ต้องใช้เวลาในการรายงานผลอย่างน้อย 2-3 วัน โดยทั่วไปผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายใน 48 ชั่วโมง ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางภูมิคุ้มกันวิทยา จะช่วยในการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นร่วมกับอาการของผู้ป่วย ใช้เวลาในการรายงานผลภายใน 1 วัน*

วัตถุประสงค์ : *การศึกษาครั้งนี้เพื่อเลือกแอนติเจนที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ Burkholderia pseudomallei ที่มีความไวและจำเพาะเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสโดยวิธี Indirect hemagglutination test และเพื่อจะนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป*

สถานที่ทำการศึกษา : *สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*

รูปแบบการวิจัย : *เปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ*

ผู้ป่วยที่ทำการศึกษา : *ซีรัมที่นำมาทำการทดสอบหาแอนติบอดีเป็นซีรัมจากผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส (Meliodosis) ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ อุบลราชธานี ได้ทำการแยกเชื้อจากผู้ป่วยว่าเป็น Burkholderia pseudomallei จำนวน 70 ราย ซีรัมของคนปกติซึ่งได้จากผู้มาบริจาคโลหิตที่มีภูมิลำเนาในท้องถิ่น (healthy) จำนวน 54 ราย และผู้ป่วยที่มารับการรักษาด้วยโรคอื่นที่ไม่ใช่เมลิออยโดสิสแต่มีอาการคล้ายคลึงกัน (other infectious disease) จำนวน 55 ราย*

วิธีการศึกษา : *ตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) ประกอบด้วยแอนติเจน 3 แบบ คือเป็น melioidin, extracellular protein (EXP) และ lipopolysaccharide (LPS) นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาคำนวณหาค่า cut off point ด้วยวิธี receiver operating characteristic และประเมินผลทางสถิติด้วยการหาค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive และ negative predictive value*

ผลการศึกษา : *พบว่าระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อแอนติเจน 3 แบบคือ melioidin, extracellular protein, และ lipopolysaccharide มีกำหนดค่าแอนติบอดีไตเตอร์ที่ถือเป็น significant cut off titer ที่ ≥ 1:160, ≥ 1:80,และ ≥ 1:80 ตามลำดับ การประเมินผลทางสถิติของ Melioidin พบว่าคำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) 84.28 %, ความจำเพาะ (specificity) 93.27 % ความแม่นยำ (accuracy) 89.65 %, positive predictive value 89.39 % และnegative predictive value 89.81 % การประเมินผลทางสถิติของ extracellular protein พบว่าคำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) 88.57 % ความจำเพาะ (specificity) 93.27 % ความแม่นยำ (accuracy) 91.4 % positive predictive value 89.9 % และ negative predictive value 92.4 % การประเมินผลทางสถิติของ lipopolysaccharide พบว่าคำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) 81.43 % ความจำเพาะ (specificity) 97.12% ความแม่นยำ (accuracy) 90.80 % positive predictive value 95.00 % และ negative predictive value 88.60 %*

วิจารณ์และสรุป : *จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอนติเจนชนิด extracellular protein ให้ผลบวกมากที่สุด (88.57 %) และมีความไวมากที่สุด (88.57 %) แต่มีความจำเพาะน้อยกว่าแอนติเจนชนิด lipopolysaccharide (97.12 %) แอนติเจนชนิด lipopolysaccharide มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคอื่นน้อยมากแต่การเตรียม lipopolysaccharide มีข้อจำกัดที่เตรียมได้ครั้งละน้อยมากซึ่งในการใช้แอนติเจนเคลือบเม็ดเลือดแดงของแกะจะใช้จำนวนมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งานที่ต้องการเตรียมในปริมาณมาก ส่วน melioidin มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคอื่นมาก ดังนั้นการนำ extracellular protein มาเตรียมน้ำยา IHA kit เหมาะสมมากกว่าแอนติเจนชนิดอื่น*

คำสำคัญ : *เมลิออยโดสิส, อินไดเร็ค ฮีมแอกกูลติเนชั่น*

Melioidosis สาเหตุจากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* [1] เชื้อนี้พบทั่วไปในดินและน้ำ มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้เป็นเวลานาน เป็นโรคเฉพาะถิ่นในเขตร้อนแถบเอเชียอาคเนย์ [2] ในประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้มากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การติดต่อเข้าสู่ร่างกายส่วนมากเข้าทางบาดแผลที่ผิวหนัง นอกจากนี้เข้าทางระบบทางเดินหายใจ อาการของโรคจะรุนแรงเมื่อผู้ป่วยมีโรคอื่นร่วมด้วย เช่น เบาหวาน ไต หรือได้รับสาร steroid เป็นเวลานาน ทำให้ภูมิต้านทานของร่างกายต่ำ [3]

การตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ โดยการเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจเช่น เลือด หนอง เสมหะ และปัสสาวะ ซึ่งให้ผลที่แน่นอน แต่ต้องใช้เวลาในการรายงานผลอย่างน้อย 2-3 วันโดยทั่วไปผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายใน 48 ชั่วโมงดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางภูมิคุ้มกันวิทยาจะช่วยในการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นร่วมกับอาการของผู้ป่วยใช้เวลาในการรายงานผลภายใน 1 วัน[4,5] วิธีที่นิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการกันมากที่สุดคือวิธี Indirect hemagglutination test (IHA) โดยใช้antigen มาcoated บนเม็ดเลือดแดง [6,7] ส่วนวิธี indirect immunofluorescent antibody technique (IFA)[7,8] และ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)[9,10] มีความไวและความจำเพาะดีกว่าวิธี IHA และสามารถตรวจหา IgG และ IgM แอนติบอดีต่อ *B.pseudomallei* แต่มีข้อจำกัดในการใช้งานเพราะต้องใช้อุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์ไม่สามารถทำการตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจวินิจฉัยโรค melioidosis โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *B.pseudomallei* โดยใช้แอนติเจน 3 ชนิด ได้แก่ melioidin เป็นheat stable extracellular antigen,[11] extracellular protein (EXP) เป็น partial purified extracellular antigen และ lipopolysaccharide (LPS)[12] เป็น endotoxin นำมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการโดยวิธี IHA เพื่อหาค่า sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value และ negative predictive value เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกแอนติเจนที่เหมาะสม และเพื่อจะนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบที่ใช้วินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการทั่ว ๆ ไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างซีรั่ม

ซีรั่มที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด เก็บซีรัมตั้งแต่มกราคม 2539 ถึง ธันวาคม 2540 แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสที่มีผลการเพาะเชื้อพบ *B. pseudomallei* (Melioidosis) จำนวน 70 ราย

กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น (Other infectious diseases) จำนวน 55 ราย ประกอบด้วยซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยติดเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 20 ราย ผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีจำนวน 15 ราย ผู้ป่วยโรคหนองในจำนวน10 ราย และผู้ป่วยโรคริคเก็ตเซียจำนวน 10 ราย

กลุ่มคนปกติซึ่งได้จากผู้มาบริจาคโลหิตที่มีภูมิลำเนาในท้องถิ่น (Healthy) จำนวน 54 ราย

ซีรัมเหล่านี้เก็บไว้ที่ -70 ^{0}C ก่อนทำการทดสอบ

สายพันธุ์แบคทีเรีย

Burkholderia pseudomallei สายพันธุ์ UB16 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสซึ่งเสียชีวิตด้วยอาการติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างเฉียบพลัน ได้นำ *B.pseudomallei* สายพันธุ์นี้เตรียมแอนติเจน 3 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษานี้คือ Melioidin, Extracellular protein (EXP) และ Lipopolysaccharide (LPS)

การเตรียมแอนติเจน

Melioidin [7, 13,14]

เพาะเลี้ยงเชื้อ *B.pseudomallei* ที่ให้โคโลนีเรียบซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย เมลิออยโดสิส เพาะเลี้ยงเชื้อบน blood agar ที่อุณหภูมิ 37^{0}C นาน 24- 48 ชั่วโมงแล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงใน glycine broth เพื่อเตรียมแอนติเจน โดยอบเชื้อที่เลี้ยงไว้ใน glycine broth ที่ 37^{0}C นาน 2 สัปดาห์แล้วนำไป autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121^{0}C เป็นเวลานาน 15 นาที นำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อ

นาทีนาน 1 ชั่วโมง เพื่อแยกเอา supernatant แล้วเติม phenol ให้มีความเข้มข้น 0.5 % โดยปริมาตรเก็บไว้ที่ 4°C

Extracellular protein (EXP)[15]

เลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* ในอาหารเหลว Modified Proskauer & Beck medium (MPB) 1 ลิตร ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าอย่างต่อเนื่องด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน และ autoclave เพื่อฆ่าเชื้อ ปั่นแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงตกตะกอนโปรตีนที่ 4 °C ด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟตอิ่มตัว 50 % ปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ตะกอนบริสุทธิ์ด้วยการทำ dialysis ใน cellulose tubing (MW. 12000 -14000 dalton) ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 และนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer ก่อนเก็บไว้ที่ -20 °C

Lipopolysaccharide (LPS)[16]

เลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* บนอาหาร Tryptic Soy Agar (Difco ,USA) ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วัน ขูดเชื้อออกและละลายใน 0.9 % โซเดียมคลอไรด์ ซึ่งมีส่วนผสมของ 1 % ฟอร์มัลดีไฮด์ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อฆ่าเชื้อ หลังจากปั่นแยกแบคทีเรียและล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ละลายเชื้อแบคทีเรีย 5 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสกัด LPS ด้วยวิธี Hot phenol water extraction ของ Westphal [14] โดยอุ่นเชื้อ *B. pseudomallei* และ 90% phenol ใน water bath ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 90 % phenol ลงไปในเชื้อในปริมาตรเท่ากัน เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 68 °C ทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำแข็งและปั่นแยกส่วนของ LPS ที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดแยกส่วนของ LPS ซึ่งละลายอยู่ในน้ำชั้นบนสุดออก และทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการทำ dialysis ในน้ำกลั่น ต่อจากนั้นแยก LPS ออกจากสารละลาย ด้วยการปั่นด้วยเครื่อง High speed centrifuge (BECKMAN L765, USA) ความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ LPS เป็นตะกอนใส หลังจากปั่นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำ LPS ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การทดสอบด้วยวิธี IHA

โดยการเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะ (sheep red blood cell, SRBC) เคลือบด้วย glutaraldehyde โดยเจาะเลือดแกะใส่ใน Alsever's solution ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ที่ 4°C ล้างเม็ดเลือดแดงแกะด้วย 0.85% Normal saline โดยปั่น 2000 rpm รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ปั่นล้าง 3 ครั้ง นำเม็ดเลือดแดงแกะที่ล้างแล้วมาละลายใน PBS pH. 7.2 ในอัตราส่วน 1:9 จากนั้นเติม 2.5 % glutaraldehyde ลงในสารละลาย SRBC ในอัตราส่วน 1:5 ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าบนเครื่อง rotator ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง นำมาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS เตรียมเป็น 1 %, 5 %SRBC treated glutaraldehyde ใน PBS ที่มี 0.1 % sodium azide (NaN_3) เก็บไว้ที่ 4°C

การเจือจาง melioidin (1ml / ml), EXP(1g / ml) และ LPS (1g / ml) ด้วย PBS ในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทำ checker broad titrationโดยการเคลือบแอนติเจนผสม 1% SRBC treated glutaraldehyde ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าทุก 15 นาที นำ SRBC ที่เคลือบแอนติเจนแล้วมาปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย PBS นำ glutaraldehyde-treated packed SRBC มาเตรียมเป็น 0.5 % SRBC coated melioidin, EXPและ LPS ใน PBS ที่มี 0.1 % NaN_3 เก็บที่ 4°C การตรวจวัดหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี IHA ทำโดยการ absorb ซีรัมปริมาตร 50ไมโครลิตร กับ 5% SRBC treated glutaraldehyde ปริมาตร 450 ไมโครลิตรตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกเอา supernatant นำมาเจือจางซีรัมด้วย diluent (0.15M PBS pH 7.2, 0.5 % BSA, 0.1 % NaN_3) ใน U type microtiter plate ปริมาตร 25 ไมโครลิตรให้เป็น two-fold serial dilution เริ่มจาก 1: 20, 1:40....1: 10240

ตามลำดับ และเติม 0.5 % SRBC coated melioidin, EXP, LPS. ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่า microtiter plate เพื่อผสมสารให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในการทดสอบทุกครั้งทำ control positive serum และ control negative serum คู่กันไปด้วย อ่านผล titer สูงสุดที่มีการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination)

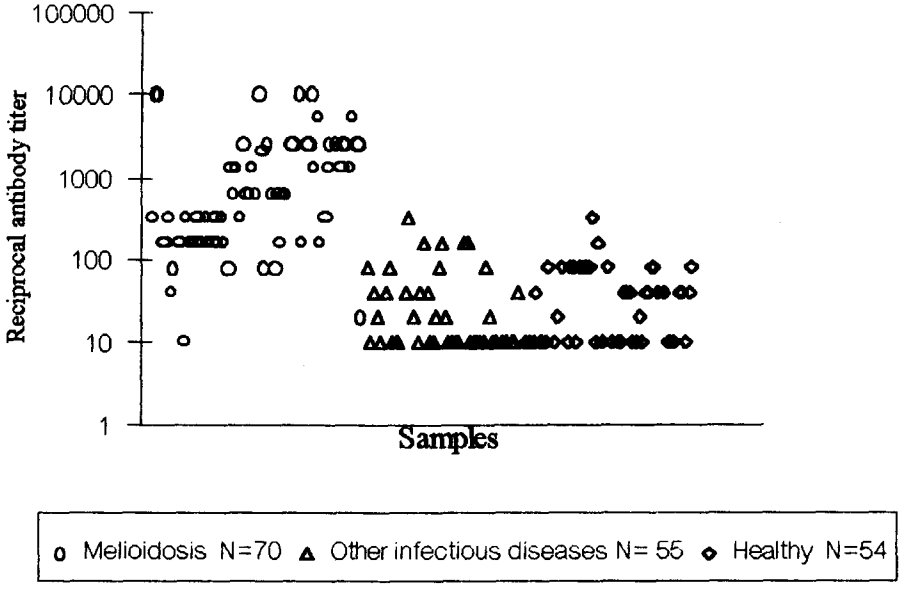
การประเมินผลทางสถิติ[17-19]

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคำนวณหาค่า Receiver operating characteristic (ROC) ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง sensitivity หรือ true positive rate ต่อ false positive rate ที่เกณฑ์ตัดสินโรคระดับต่าง ๆ กัน เกณฑ์ตัดสินโรคที่ดีที่สุดคือ เกณฑ์ตัดสินโรคที่อยู่ใกล้ 100 % sensitivity มากที่สุดและมีค่า false positive rate น้อยที่สุด[17] และการประเมินประสิทธิภาพการวินิจฉัยโรคประกอบด้วยค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (accuracy) ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value)

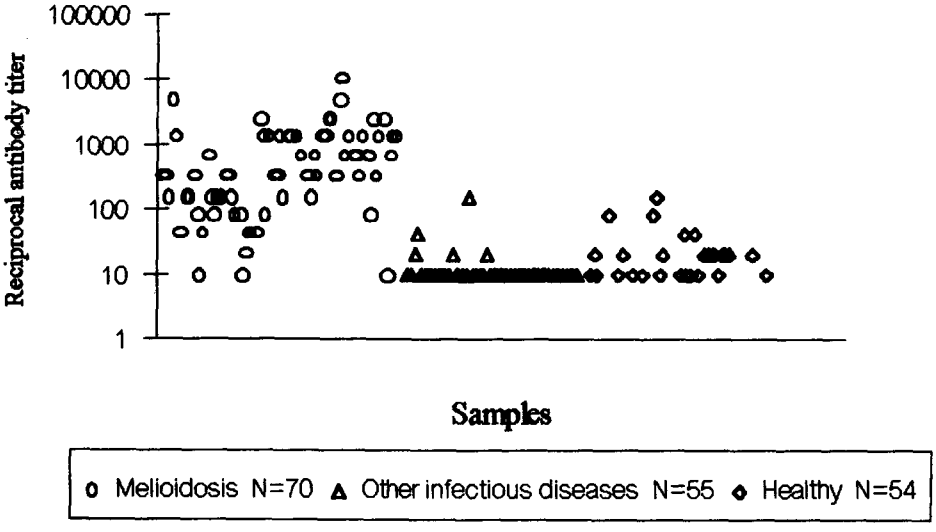
ผลการทดลอง

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ melioidin ด้วย Indirect hemagglutination test ในซีรัมกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:10240 กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่นระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:320 กลุ่มคนปกติระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:320 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 โดยมีเกณฑ์ตัดสินโรคซึ่งคำนวณจาก receiver operating characteristic analysis (ROC) ได้ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ที่ $\geq$ 1:160

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ EXP ด้วย Indirect hemagglutination test ในซีรัมกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:10240 กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่นระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:160 กลุ่มคนปกติระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:160 ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 โดยมีเกณฑ์ตัดสินโรคซึ่งคำนวณจาก receiver operating characteristic analysis (ROC) ได้ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ที่ $\geq$ 1:80

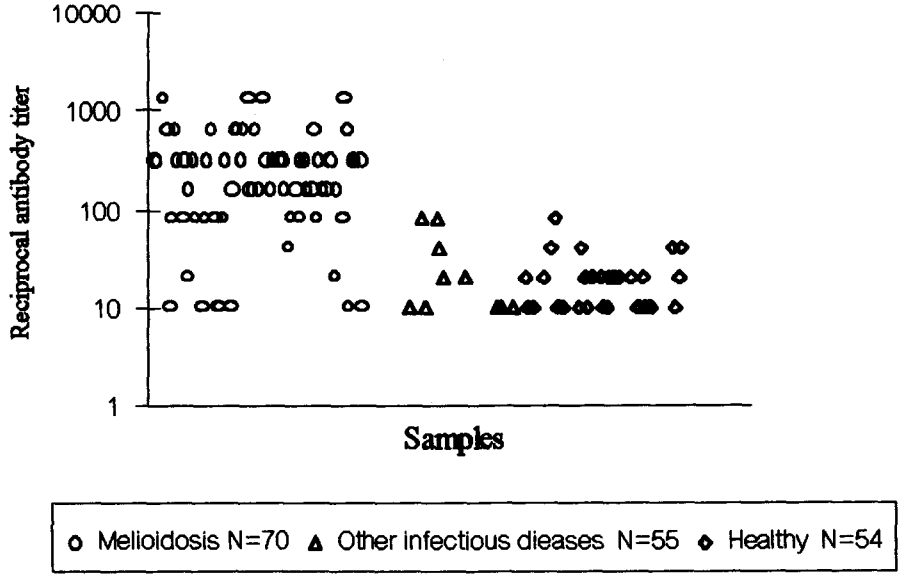


รูปที่ 1. แสดงการกระจายระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *B. pseudomallei* ใน 3 กลุ่มตัวอย่างด้วย melioidin-IHA



รูปที่ 2. แสดงการกระจายระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *B. pseudomallei* ใน 3 กลุ่มตัวอย่างด้วย EXP-IHA

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ LPS ด้วย Indirect hemagglutination test ในซีรัมกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:1280 กลุ่มผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่นระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:80 กลุ่มคนปกติระดับแอนติบอดีไตเตอร์ตั้งแต่ <1:20-1:80 ดังมีระดับแอนติบอดีแสดงไว้ในรูปที่ 3 โดยมีเกณฑ์ตัดสินโรคซึ่งคำนวณจาก receiver operating characteristic analysis (ROC) ได้ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิสที่ $\geq$ 1:80



รูปที่ 3. แสดงการกระจายระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อ *B. pseudomallei* ใน 3 กลุ่มตัวอย่างด้วย LPS-IHA

ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ด้วยวิธี meloidin IHA ที่ ≥ 1:160 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิสให้ผลบวก มีจำนวน 59 ราย (84.2 %) ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ ให้ผลบวกมีจำนวน 5 ราย (10.0 %) และในกลุ่มของคนปกติให้ผลบวกมีจำนวน 2 ราย (3.7 %) ดังแสดงในตารางที่ 1

ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ด้วยวิธี EXP-IHA ที่ ≥ 1:80 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส มีผลบวกจำนวน 62 ราย (88.57 %) ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ มีผลบวกจำนวน 2 ราย (4.0 %) และในกลุ่มของคนปกติให้ผลบวกมีจำนวน 5 ราย (9.26 %) ดังแสดงในตารางที่ 1

ค่าเกณฑ์ตัดสินโรคที่เหมาะสมของการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ด้วยวิธี LPS-IHA ที่ ≥ 1:80 พบว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส มีผลบวกจำนวน 57 ราย (81.43 %) ในกลุ่มของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ มีผลบวกจำนวน 2 ราย (4.0 %) และในกลุ่มของคนปกติให้ผลบวกมีจำนวน 1 ราย (1.85%) ดังแสดงในตารางที่ 1

การประเมินผลทางสถิติของ Melioidin-IHA พบว่าคำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) ได้ 84.28 % ความจำเพาะ (specificity) ได้ 93.27 % ความแม่นยำ (accuracy) ได้ 89.65 % ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ได้ 89.39% และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ได้ 89.81 % ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1. แสดงจำนวนและเปอร์เซนต์ของแอนติบอดีต่อแอนติเจน 3 ชนิดของกลุ่มของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส, กลุ่มของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ และกลุ่มคนปกติ

ตัวอย่างซีรัม	จำนวน (ราย)	วิธี IHA		
		Melioidin - IHA ≥ 1:160	EXP - IHA ≥ 1:80	LPS - IHA ≥ 1:80
กลุ่มของผู้ป่วยโรคเมลิออยโดสิส	70	59 (84.29 %)	62 (88.57 %)	57 (81.43 %)
กลุ่มของผู้ป่วยโรคติดเชื้ออื่น ๆ	50	5 (10.00 %)	2 (4.00 %)	2 (4.00 %)
กลุ่มคนปกติ	54	2 (3.7 %)	5 (9.26 %)	1 (1.85 %)

ตารางที่ 2. การประเมินผลทางสถิติของแอนติเจน 3 ชนิด ด้วย Melioidin-IHA, EXP-IHA, LPS-IHA.

การประเมินผล	Melioidin-IHA	EXP-IHA	LPS-IHA
ค่าเกณฑ์ตัดสินโรค	≥ 1:160	≥ 1:80	≥ 1:80
ความไว (Sensitivity)	84.28 %	88.57 %	81.43 %
ความจำเพาะ(Specificity)	93.27 %	93.27 %	97.12 %
ความแม่นยำ(Accuracy)	89.65 %	91.4 %	90.80 %
ค่าพยากรณ์บวก (Positive predictive value)	89.39 %	89.9 %	95.00 %
ค่าพยากรณ์ลบ (Negative predictive value)	89.81 %	92.4 %	88.60 %

การประเมินผลทางสถิติของ EXP-IHA พบว่า คำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) ได้ 88.57% ความจำเพาะ (specificity) ได้ 93.27 % ความแม่นยำ (accuracy) ได้ 91.4 % ค่าพยากรณ์บวก (positive predictive value) ได้ 89.9 % และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ได้ 92.4 % ดังแสดงในตารางที่ 2

การประเมินผลทางสถิติของ LPS-IHA พบว่า คำนวณวัดผลของความไว (sensitivity) ได้ 81.43 %, ความจำเพาะ (specificity) ได้ 97.12 % ความแม่นยำ (accuracy) ได้ 90.80 % ค่าพยากรณ์บวก (positive predic-tive value) ได้ 95.00 % และค่าพยากรณ์ลบ (negative predictive value) ได้ 88.60%ดังแสดงในตารางที่ 2

สรุปและวิจารณ์

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคที่พบมานานแล้ว แต่ได้รับความสนใจจากวงการแพทย์น้อยมาก เพิ่งมาเริ่มมีบทบาทและให้ความสำคัญในระยะเวลาไม่กี่ปีมานี้ เนื่องจากมีผู้ป่วยที่พบว่าเป็นโรคนี้มีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การวินิจฉัยโรคนี้เป็นไปด้วยความยากลำบาก เนื่องจากอาการของโรคมีได้หลายแบบเช่น ปอดอักเสบ ตับอักเสบ เชื้อเข้าสู่กระแสโลหิตไปตามอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายของผู้ป่วยและยังเข้าสู่ระบบประสาท ทำให้บางครั้งอาจมีอาการคล้ายกับโรคติดเชื้ออื่น ๆ จนได้ฉายาว่าเป็นยอดนักเลียนแบบ ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการจึงเข้ามามีบทบาทค่อนข้างมาก วิธีที่ถือเป็นมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคนี้คือการตรวจพบเชื้อในสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด หนอง เสมหะ และปัสสาวะ แต่ต้องใช้เวลาในการรายงานผลนานอย่างน้อย 4 วัน โดยทั่วไปผู้ป่วยมักจะเสียชีวิตภายใน 48 ชม.[20] นอกจากนี้อาการของโรคเมลิออยโดสิสมีตั้งแต่ไม่ปรากฏอาการเลยจนอาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิต เคยมีรายงานผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อนี้ที่ไตและปอดไม่ปรากฏอาการนานถึง 19ปี[21] แต่การตรวจหาแอนติบอดีสามารถตรวจพบแอนติบอดีได้หลังได้รับเชื้อ 7-14 วัน ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อจึงมีความสำคัญ วิธีที่นิยมและง่ายคือ Indirect hemagglutination test [22,23] จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแอนติเจนชนิด melioidin ซึ่งเป็น heat stable extracellular antigen [11] ได้ผลความไวและความจำเพาะใกล้เคียงกับการศึกษาของ Khupulsup และ Petchclai[24] ส่วน lipopolysaccharide (LPS)[12] เป็น endotoxin ซึ่งมีการศึกษาของ Pitt [12] ทดสอบกับ rabbit antiserum ที่มีการ immunize เชื้อ *B. pseudomallei* และซีรัมผู้ป่วยที่มีผลบวกการเพาะเชื้อ *B. pseudomallei* เท่านั้น สำหรับการศึกษาครั้งนี้ extracellular protein (EXP) ซึ่งเป็น partial purified extracellular antigen ให้ผลความไวมากที่สุด (88.57 %) แต่มีความจำเพาะน้อยกว่าแอนติเจนชนิด lipopolysaccharide (97.12 %) แอนติเจนชนิด lipopoly-saccharide มีปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวกับโรคอื่นน้อยมากแต่การเตรียม lipopolysaccharide มีข้อจำกัดที่เตรียมได้ครั้งละน้อยมาก ขั้นตอนยุ่งยากและต้องใช้อุปกรณ์ที่ราคาแพงในการเตรียมแอนติเจน lipopolysaccharide เคลือบเม็ดเลือดแดงและจะใช้จำนวนมากจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งานที่ต้องการเตรียมน้ำยาปริมาณมาก ส่วน melioidin มีปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวกับโรคอื่นมาก ดังนั้นการเตรียมแอนติเจนของ extracellular protein จะสามารถนำมาพัฒนาการเตรียมน้ำยา IHA kit ต่อไป และต้องนำมาทดสอบหา Shelf life ของน้ำยา จำนวนตัวอย่างในการทดสอบเพื่อดูความ Stableของน้ำยา ส่วน lipopolysac-charide อาจนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ใน immuno-logical test อื่นเช่น ELISA ที่ใช้ปริมาณแอนติเจนน้อยๆ เนื่องจากเป็นแอนติเจนที่มีความจำเพาะสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เก็บตัวอย่างซีรัมที่ใช้งานวิจัยนี้

อ้างอิง

1. Kani K, Kondo E. Recent advances in biomedical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (basonym: *Pseudomonas pseudomallei*) Jpn J Med Sci Biol 1994; 47 : 1 - 45
2. Leelarasam A,Bovornkitti S. Melioidosis: review and update. Rev Infect Dis 1989 May – Jun; 11(3): 413 - 25
3. Mays EE, Ricketts EA. Melioidosis : Recrudescence associated with bronchogenic Cacinoma twenty six years following initial geographic exposure. Chest 1975 Aug; 68(2): 261 - 3
4. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Nagowit P, Davis TM, Looarecsuwan S, Melioidosis: a major came of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Inflect Dis 1989 May; 159(5): 890 - 9
5. Dance DA. Melioidosis : the tip of the iceberg. Clin Microbiol 1991 Jan; 4(1): 52 - 60
6. Ashdown LR. Indirect haemagglutination test for melioidosis. Med J Aust 1987 Oct 5; 147(7): 364 - 5
7. Khupukup K, Petchclai B. Application of indirect hemagglutination test and indirect fluorescent antibody test for IgM antibody for diagnosis of Melioidosis in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1986 Mar; 35(2): 366 - 9
8. Naigowit P, Kurata T, Wangroongsub P, Petkanjanapong V, Kondo E, Kanai K. Application of indirect immunofluorescence microscopy to colony identification of Pseudomonas pseudomallei. Asian Paciffic J Allergy Immunol 1993 Dec; 11(2): 149 - 54
9. Kunakorn M, Boonma P, Khupulsup K, Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidsis. J Clin Microbiol 1990 Jun; 28(6):1249 - 53
10. Wongratanacheewin S, Amornpunt S, Sermswan RW, Tattawasart U, Wongwajana S. Use of culture filtrated antigen in an ELISA and a dot immunoassay for the diagnosis of melioidosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1995 Jun; 26(2): 329 - 34
11. Appassakij H, Silpapojakul KR, Wansit R and Pornpatkul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area Am J Trop Med HYG 1990; 42(3): 248 - 53
12. Pitt TL, Aucken H, and Dance DAB. Homogeneity of lipopolysaccharide antigens in *Pseudomonas pseudomallei* J Infect 1992; 25: 139 - 46
13. Iteri SZ. The indirect hemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. Br Vet J 1965; 121: 164 - 70
14. พิมพ์ใจ นัยโกวิท, วิมล เพชรกาญจนาพงศ์, วรรณชัย มณีบุญยัง, นวลฉวี เวชประสิทธิ์, ดำรง เชี่ยวศิลป์ การตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Pseudomonas pseudomallei* ด้วยวิธี Indirect Hemagglutination, สารคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2532;13(1): 17 - 26
15. Kondo E, Petkanchanpong V, Naigowit P, Kurata T, Kanai K. Demonstration of acid phosphatase activity in antigenic glycoprotein fractions obtained from the culture filtrate of *Pseudomonas pseudomallei* Jpn J Med Sci Biol 1991; 44 (5-6): 215 - 24
16. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extract with phenol-water and further application

of the procedure. Methods Carbohydr Chem 1965; 5: 83

17. Leelarasamee A. Laboratory Method for Disease Diagnosis: Principle Interpretation and Evaluation (in Thai) J Infect Dis Antimicrob Agent 1989; 6(1):31 - 50
18. Beck JR, Schulz EK. The use of relative operating characteristics (RPC) curves in test performance evaluation. Arch Patho Lab Med 1986 Jan; 110(1): 13 - 20
19. Weinstein MC, Fineberg HV. Clinical Decision Analysis Philadelphia: WB. Sauders, 1980
20. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. การวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส ทางห้องปฏิบัติการ ฯ : แนวทางการพัฒนาจากอดีตถึงปัจจุบันสู่อนาคต J Med Tech Assoc Thailand 1989; 17(2): 137 - 41
21. หวานจิตต์ เกรันพงษ์ เมลิออยโดสิส รายงานผู้ป่วย 17 รายที่พบในโรงพยาบาลศิริราช สารศิริราช 1981; 33(11): 767 - 72
22. Ashdown LR. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory J Clin Pathol 1979; 32: 500 - 4
23. Nigg C. Serological studies on subclinical melioidosis J Immun 1963 Jul; 91(1): 18 - 28
24. Khupulsup K, Petchclai B. Application of indirect hemagglutination test and indirect fluorescent antibody test for IgM antibody for diagnosis of Meliodosis in Thailand Am J Trop Med Hyg 1986 Mar; 35(2): 366 - 9