นิพนธ์ต้นฉบับ

การใช้วิธีเอนซัยม์-ลิงค์ อิมมูโนซอบเบนท์ แอสเส ในการวินิจฉัยโรคไอกรนอย่างรวดเร็ว

พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล*
สมชาย พีระปกรณ์* *
เสาวลักษณ์ ลิมปิวัฒกี***

Luksamijarulkul P, Phirapakorn S, Limpiwattakee S. Enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of whooping cough. Chula Med J 1985 Aug ; 29 (8) : 889-896

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the serum Ig M and Ig G antibodies in the rapid diagnosis of 62 pertussis and 102 healthy children. The validity of the test was evaluated in this study in which the sensitivity, specificity and efficiency were found to be 79.03%, 91.18% and 86.59% respectively. The duration of positive results for Ig M and Ig G ranged from under 2 weeks to 8 weeks after the onset of coughing, with a single serum sample. So, an ELISA may be valuable for the rapid diagnosis of whooping cough.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400
* * แพทย์ในโครงการฝึกอบรมระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพฯ 10200
* * * ภาควิชาพยาบาลสาธารณสุข คณะพยาบาลศาสตร์ วิทยาลัยหัวเฉียว กรุงเทพฯ 10100

การวินิจฉัยโรคไอกรนที่แน่นอน โดยทั่วไปใช้วิธีการแยกเชื้อไอกรน *(Bordetella pertussis)* ได้จากสารคัดหลั่ง nasopharynx แต่มักได้ผลบวกต่ำ และประสบปัญหามาก[1-3] ไม่สามารถแยกเชื้อ *B. pertussis* จากผู้ป่วยที่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคไอกรนมาก่อนหรือมี partial immunity[4] ในประเทศไทยผลการแยกเชื้อให้ผลบวกต่ำเพียง 10.8% จากการศึกษาที่โรงพยาบาลเด็ก[5] และ 6.5% จากการระบาดที่อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา[6] ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการวินิจฉัยยังคงแพร่โรคไปสู่ทารกและเด็กอื่นที่มีภูมิต้านทานต่ำได้[7] จึงได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาและอิมมูโนวิทยามาช่วยในการวินิจฉัย วิธีอิมมูนเรืองแสงมีความไว (sensitivity) สูง แต่มีความจำเพาะ (specificity) ต่ำ พบผลบวกปลอมถึง 40%[8,9] วิธีจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) ไม่สามารถวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว ต้องใช้ซีรั่มผู้ป่วยอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 6-8 สัปดาห์[10] ดังนั้นการปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยโรคให้รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงและทำง่าย จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นหาผู้ป่วยให้ถูกต้องและการควบคุมโรคให้ได้ผลอย่างจริงจัง วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) พึ่งได้รับการพัฒนามาใช้เพื่อการวินิจฉัยโรคไอกรน พบว่าใช้ได้ผลดีในต่างประเทศ[11-13] สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการใช้วิธี ELISA มาช่วยวินิจฉัยโรคไอกรน การวิจัยนี้จึงได้นำวิธีดังกล่าวมาประเมิน Validity ตลอดจนระยะเวลาที่สามารถให้ผลบวกในการวินิจฉัยได้

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มที่ใช้ศึกษา (Subjects)

1. ผู้ป่วยโรคไอกรนที่ได้รับการยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการแล้ว 62 ราย เป็นผู้ป่วยที่แยกเชื้อ *B. pertussis* ได้ 9 ราย และผู้ป่วยที่แสดงความแตกต่างของระดับแอกกลูตินินมากกว่าหรือเท่ากับ 4 เท่า จากการตรวจซีรั่ม 2 ครั้ง ห่างกัน 4-8 สัปดาห์ ด้วยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Micro-agglutination test)[14] จำนวน 53 ราย

2. กลุ่มเด็กปกติ (Healthy children) เป็นเด็กที่ไม่มีอาการทางระบบหายใจส่วนบนขณะตรวจ อายุต่ำกว่า 15 ปี อาศัยอยู่นอกเขตการระบาดของโรคแต่อยู่ในตำบลหรืออำเภอเดียวกันกับผู้ป่วย จำนวน 102 ราย ผู้ป่วยและเด็กกลุ่มปกติทุกรายได้รับการซักประวัติโดยใช้แบบซักประวัติเดียวกัน

สิ่งส่งตรวจ (Specimens)

เก็บตัวอย่างซีรั่มครั้งแรก (first serum) จากผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันทางห้องปฏิบัติการแล้ว 62 ตัวอย่าง และจากเด็กปกติ 102 ตัวอย่าง นำมาหาซีรั่ม Ig M และ Ig G แอนติบอดีย์ด้วยวิธี Indirect ELISA ดัดแปลงจากวิธีของ Viljanen และคณะ[11]

วิธีการ

ใช้ sonicated *Bordetella pertussis* strain no. 134+165 Phase I ขนาดความเข้มข้นโปรตีน 5 ug/ml coat polystyrene micro-plate ชนิดก้นแบบ (Nunc) อบ (incubate) 37°C นาน 3 ชั่วโมง ภายใต้ความชื้นล้างด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4 ซึ่งมี 0.05% Tween 20 รวมอยู่ด้วย ลด non-specific ด้วย PBS-Tween-1% normal sheep serum ตรวจหาซีรั่ม Ig G และ Ig M แอนติบอดีย์โดยใช้ซีรั่มขนาดความเจือจาง 1:500 และ 1:50 ตามลำดับ (ได้จาก Chequer-board titration) สำหรับ Anti-Human Ig G หรือ Ig M Alkaline Phosphatase Conjugate และ p-nitrophenyl phosphate substrate ใช้ของ Behring เยอรมัน

เกิดสีเหลืองอมเขียว หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N NaOH วัดความเข้มของสีที่ λ 410 nm. ด้วยเครื่องอ่าน ELISA Minireader II (Dynatech Laboratory)

ในการทดสอบแต่ละ plate จะทำ High positive serum และ Low positive serum ควบคู่ไปด้วยทุกครั้ง

การอ่านผลและการควบคุมคุณภาพ

อ่านค่าความเข้มของสี (Optical Density) แล้วแปลงเป็นค่า Optical Density Index (ODI.) ตามสูตร

$$\text{ODI.} = \frac{\text{OD. of tested serum x Mean OD. of High positive serum}}{\text{OD. of High positive serum on the same day}}$$

โดย High positive serum ที่ใช้ได้จากผู้ป่วยโรคไอกรนที่มีไตเตอร์สูง ๆ ตั้งแต่ 1:1280 ขึ้นไป แบ่งใส่ vial เล็ก ๆ vial ละ 100 ul. แช่แข็งที่ -20° C เอามาใช้วันละ vial ส่วนที่เหลือของแต่ละวันให้ทิ้งไม่นำมาใช้อีก ค่า OD ของ High positive serum มีค่าดังนี้

OD เฉลี่ย ($\overline{X}$)	สำหรับ Ig G = 1.20, Ig M = 0.61
ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)	สำหรับ Ig G = 0.19, Ig M = 0.21
95% confidence interval of $\overline{X}$	สำหรับ Ig G = 1.11-1.29, IgM = 0.51-0.71

ในการทำการทดสอบแต่ละครั้ง หากค่า OD ของ High positive serum อยู่นอกช่วง 95% confidence interval ดังแสดงไว้ ผลในครั้งนั้นใช้ไม่ได้ต้องทำการตรวจหาใหม่

การแปรผล

การศึกษานี้ถือว่าซีรั่มผู้ป่วยให้ผลบวกที่ระดับ ODI. > ค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) + 2เท่าของความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\overline{X}$ + 2SD.) ของค่า ODI ในเด็กกลุ่มปกติ 102 ราย

สำหรับซีรั่มที่ให้ผลบวก Ig M จะนำมาหา Rhumatoid Factor (RF) ถ้าให้ผลบวก RF ซีรั่มรายนี้จะตัดออกจากการศึกษาเนื่องจากอาจให้ผลบวกปลอมได้

ผลการศึกษา

จากการตรวจหาระดับซีรั่ม Ig G และ Ig M แอนติบอดีย์ ในเด็กปกติอายุต่ำกว่า 15 ปี จำนวน 102 ราย พบค่า ODI เฉลี่ย เท่ากับ 0.21 และ 0.17 ตามลำดับ โดยมีค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.19 สำหรับ Ig G และ 0.18 สำหรับ Ig M ดังแสดงใน Table 1

Table 1 The optical density index (ODI) of 102 healthy children for Ig G and Ig M antibodies against *Bordetella pertussis*

Statistics	ODI for Ig G	ODI for Ig M
Mean + Standard Deviation ($\overline{X}$ + SD)	0.21 + 0.19 (= 0.40)	0.17 + 0.18 (= 0.35)
Mean + 2 Standard Deviation ($\overline{X}$ + 2SD)	0.21 + 0.38 (= 0.59)	0.17 + 0.36 (= 0.53)

ถ้าใช้ระดับการวินิจฉัยที่ ODI > $\overline{X}$ + 2SD ของค่าปกติแล้ว ซีรั่มใดให้ค่า ODI ตั้งแต่ 0.60 ขึ้นไปสำหรับ Ig G และตั้งแต่ 0.54 ขึ้นไป สำหรับ Ig M ถือว่าให้ผลบวก การศึกษานี้พบว่า วิธี ELISA มีความไว (sensitivity) 79.03% ความจำเพาะ (specificity) 91.18% และประสิทธิภาพ (efficiency) 86.59% จากการตรวจซีรั่มครั้งแรก (ซีรั่มเดียว) ดังแสดงใน Table 2

Table 2 The validity of an ELISA measuring serum Ig M and Ig G antibodies for pertussis diagnosis

Results for ELISA*	Disease		Total
	positive	negative	
positive	49	9	58
negative	13	93	106
Total	62	102	164

Sensitivity of test	= 79.03 %
Specitivity of test	= 91.18 %
Predictive value of positive	= 84.48 %
Predictive value of negative	= 87.74 %
False positive	= 8.82 %
False negative	= 20.97 %
Efficiency of test	= 86.59 %

* Cut-off levels of positive results for Ig M $\geq$ 0.54
Ig G $\geq$ 0.60

เมื่อเปรียบเทียบผลการวินิจฉัยระหว่างวิธี ELISA กับวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) โดยใช้ซีรั่มที่เจาะครั้งแรกเป็นหลัก (ซีรั่มเดียว) พบว่า จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี เท่ากับ 33 ราย (53.22%) ในขณะที่วิธี ELISA ให้ผลบวกแต่วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลลบจำนวน 16 ราย (25.81%) และวิธี ELISA ให้ผลลบแต่วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลบวกเพียง 6 ราย (9.68%) ดังแสดงใน Table 3 เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี X^2(Mc Nemar's test) พบว่าวิธี ELISA ให้ผลบวกสูงกว่าวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < .005$)

Table 3 Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial agglutination (BA) for diagnosis of pertussis from the first serum of patients with pertussis

Laboratory Results	No.	% of total
ELISA* positive, BA** positive	33	53.22
ELISA positive, BA negative	16	25.81
ELISA negative, BA positive	6	9.68
ELISA negative, BA negative	7	11.29
Total	62	100.00

* Cut-off levels of positive results for Ig M $\geqslant$ 0.54 and Ig G $\geqslant$ 0.60

* * Cut-off titers of positive results for BA $\geqslant$ 1:320

X^2 (McNemar's test) = 16.9 at df = 1, P-value $< .005$

ความสามารถในการวินิจฉัยโรคไอกรนอย่างรวดเร็วโดยวิธี ELISA พบว่า Ig M แอนติบอดีย์ให้ผลบวกได้ตั้งแต่ระดับแอกกลูตินินต่ำ ๆ 1:10 ขึ้นไปในขณะที่ Ig G ให้ผลบวกตั้งแต่ 1:80 ขึ้นไป ดังนั้นผู้ป่วยในระยะแรก ๆ ซึ่งมีระดับแอกกลูตินินแอนติบอดีย์ต่ำ ๆ ก็สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธี ELISA แต่ไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (เกณฑ์การวินิจฉัยโดยวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย จากการตรวจซีรั่มที่เจาะครั้งแรกในผู้ป่วยที่มีอาการไอนานกว่า 2 สัปดาห์ โดยทั่วไปถือว่า ให้ผลบวกการวินิจฉัยที่ระดับแอกกลูตินิน $\geqslant$ 1:320) ดังแสดงใน Table 4 ซึ่งจะเห็นชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาหลังผู้ป่วยมีอาการไอกับผลการตรวจหาซีรั่ม Ig M และ Ig G แอนติบอดีย์ใน Table 5 พบว่า Ig M แอนติบอดีย์ให้ผลบวกสูงสุดก่อนสัปดาห์ที่ 2 สูงถึง 62.5% แล้วลดลงเป็น 50% และ 28.0% ในสัปดาห์ที่ 2-4 และ 4-6 ตามลำดับ ในขณะที่ Ig G จะให้ผลบวกสูงขึ้นจาก 12.5% เป็น 56.25% และ 84.0% ในสัปดาห์ที่ 0-2, 2-4 และ 4-6 ตามลำดับ แล้วจะลดลงเป็น 40% ในสัปดาห์ที่ 6-8 ถ้าคิดผลบวกรวมกันจะพบว่าวิธี ELISA สามารถให้ผลบวกในการวินิจฉัย

โรคได้ก่อน 2 สัปดาห์ หลังผู้ป่วยมีอาการไอ โดยให้ผลบวกสูงขึ้นตามระยะเวลาแล้วจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4-6 จึงค่อยลดลง ในขณะที่วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียให้ผลบวกต่ำกว่าวิธี ELISA ในสัปดาห์แรก ๆ (สัปดาห์ที่ 0-2 และ 2-4) ตามที่แสดงไว้ใน Table 5 ดังนั้นวิธี BLISA จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคไอกรนในระยะแรกของโรค

Table 4 The comparison of pertussis agglutinin titers and positive results for ELISA Ig M and Ig G from the first serum sample of pertussis patients

Agglutinin titers	No.of tested	No. of positive results for Ig M	Ig G	Ig M and/or Ig G*
1 : 10	5	2	0	2
1 : 20	3	2	0	2
1 : 40	6	4	0	4
1 : 80	5	4	1	4
1 : 160	4	4	1	4
1 : 320	7	1	5	5
1 : 640	17	4	15	15
1 : 1280	8	3	6	7
⩾1 : 2560	7	1	6	6
Total	**62* ***	**25**	**34**	**49**

* Cut-off levels of positive results for Ig M ⩾ 0.54 and Ig G ⩾ 0.60

* * Only 39 cases were positive for bacterial agglutination method. (criteria diagnosis ⩾ 1 : 320 from the single serum sample)

Table 5 The relation of weeks after onset of cough and positive results for ELISA Ig M and Ig G antibodies in pertussis patients

Weeks after onset of cough	No. of tested	Positive for Agglutination**		Positive for ELISA*					
				Ig M		Ig G		Ig M and/or Ig G	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0-2	16	2	12.5	10	62.5	2	12.5	10	62.5
2-4	16	11	68.75	8	50.0	9	56.25	14	87.5
4-6	25	23	92.0	7	28.0	21	84.0	23	92.0
6-8	5	3	60.0	0	0	2	40.0	2	40.0
Total	**62**	**39**	**62.9**	**25**	**40.32**	**34**	**54.84**	**49**	**79.03**

* Cut-off levels of positive results for Ig M $\geqslant$ 0.54 and Ig G $\geqslant$ 0.60

* * Cut-off titer of positive results for bacterial agglutination $\geqslant$ 1 : 320 from the single serum

วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ประเมินการใช้วิธี ELISA ในการช่วยวินิจฉัยโรคไอกรนซึ่งพบว่าวิธีดังกล่าวให้ค่าความไวและความจำเพาะสูง และสามารถวินิจฉัยได้รวดเร็วกว่าวิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาวิธีอื่น เช่น วิธีการจับกลุ่มแบคทีเรีย (Bacterial Agglutination) ให้ผลบวกค่อนข้างต่ำ[6] และต้องใช้ซีรั่มอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 6-8 สัปดาห์[10] จึงจะให้ผลบวกสูงขึ้น วิธีอิมมูนเรืองแสง ให้ผลบวกปลอมถึง 40%[8,9] ตลอดจนวิธีการแยกเชื้อก็ให้ผลบวกเพียง 6.5%[6] และ 10.8%[5] การศึกษาในต่างประเทศพบว่าวิธี ELISA ให้ความไวสูงและใช้วินิจฉัยได้ดี แต่ใช้ Filamentous hemagglutinin เป็นแอนติเจนแทน[12,13] การศึกษาของ Viljanen และคณะ[11] ใช้ sonicated antigen ซึ่งเป็น crude แอนติเจน เพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคไอกรนเช่นกันและได้ศึกษาถึง specific properties ของวิธี ELISA นี้โดยใช้ inhibition technique กับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่พบได้ในทางเดินหายใจ เช่น *Bordetella parapertussis, Staphylococcue aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae type b* และ *Haemophilus influenzae* (non typable) เป็นต้น พบว่า มีเพียงเชื้อ *B. parapertussis* เท่านั้นที่อาจให้ผลบวกได้

การวินิจฉัยโรคไอกรนด้วยวิธี ELISA โดยหา Ig M และ Ig G แอนติบอดีย์ จากซีรั่มที่เจาะครั้งแรก สามารถวินิจฉัยได้ตั้งแต่ผู้ป่วยเริ่มมีอาการไอใน 2 สัปดาห์แรก (62.5%) ซึ่งวิธีการจับกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันไม่ค่อยให้ผลบวก ต้องรอเจาะเลือดครั้งที่ 2 ในสัปดาห์ที่ 4-6 ซึ่งผู้ป่วยกลับบ้านแล้ว ดังนั้นวิธี ELISA จึงสามารถช่วยให้การวินิจฉัยโรคไอกรนเป็นไปได้รวดเร็วยิ่งขึ้นโดยไม่ต้องรอเจาะเลือดครั้งที่ 2 (แต่ถ้าสามารถเจาะเลือดครั้งที่ 2 ได้จะช่วยให้การวินิจฉัยสูงมากยิ่งขึ้น)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์ระบาดวิทยาภาคเหนือ และ ศูนย์ระบาดวิทยาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่ได้ให้ความร่วมมือและอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง

อ้างอิง

1. Preston NW. Technical problems in the laboratory diagnosis and prevention of whooping cough. Lab Pract 1970; 19 : 480-486
2. Linnemann CC. Host-Parasite Interactions in Pertussis. International Symposium on Pertussis, U.S. Department of Health, Education was Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1978. 3-18
3. Ross FW, Cumming CG. Isolation of *bordetella pertussis* from Swabs Br Med J 1981 Aug 8; 283(6288) : 403-404
4. Cruickshank R. Public Health Laboratory Services. Diagnosis of whooping cough : comparison of serological tests with isolation of *bordetella pertussis* : a combined scottish study. Br Med J 1970 Dec 12; 4 (5736) : 637-639
5. เพชรไสว เลียงจินดาถาวร. การศึกษาโรคไอกรนในทารกอายุต่ำกว่า 6 เดือน ที่โรงพยาบาลเด็ก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2523. 1-102
6. ไพยรัตน์ คุณะเกษม, สมชาย พีระปกรณ์, พิพัฒน์ ลักษมีจรัลกุล. การเฝ้าระวังโรคไอกรนและศึกษาทางระบาดวิทยาในต่างจังหวัด ปี พ.ศ. 2526. รายงานฉบับสมบูรณ์ เสนอต่อ China Medical Board และคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2527, 1-37
7. Nelson JD. The changing epidemiology of pertussis in young infants : the role of adults as reservoirs of infection. Am J Dis Child 1978 Apr; 132(4) : 371-373
8. Broome CW, Fraser DW, English WJ. Pertussis diagnostic methods and surveillance. International Symposium on Pertussis, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, 1978. 19-22
9. Linnemann CC, Partein PH, Englender GS. Pertussis : persistent problems. J Pediatr 1974; 85(4) : 589-591
10. Lautrop H. Laboratory diagnosis of Whooping cough or bordetella in fections. Bull WHO 1960; 23 : 15-35
11. Viljanen MK, Ruuskanen O, Granberg C, Salmi TT. Serological Diagnosis of pertussis : IgM, IgA and IgG antibodies against *Bordetella pertussis* measured by enzyme-linled immunosorbent assay (ELISA). Scand Infect Dis 1982; 14 : 117-122
12. Granstrom M, Granstrom G, Lindfors A, Askelof P. Serologic diagnosis of whooping cough by an enzyme-linked immuno-sorbent assay using fimbrial hemagglutinin as antigen. J Infect Dis 1982 Dec; 146 (6) : 741-745
13. Mertsola J, Ruuskanen O, Kuronen T, Viljanen MK. Serologic diagnosis of pertussis : comparison of enzyme-linked immuno-sorbent assay and bacterial agglutination. J Infect Dis 1983 Feb; 147 (2) : 252-257
14. Manclark CR, Meade BE. Serological response to *Bordetella pertussis* In : Rose NR, Friedman H. eds. Manual of Clinical Immunology, 2ed American Society for Microbiology, Washington DC. 1980 : 496-499

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 20 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2528