Original Article *นิพนธ์ต้นฉบับ*

การเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Immunoperoxidase (IIP) และวิธี Immunofluorescence (IFA) เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

ศราวุธ สุทธิรัตน์*
ทวีพร พันธุ์พาณิชย์*
นิรุต รถขุนทด*
บุญนิภา สุวรรณกาล**
สุรศักดิ์ หมื่นพล**
**คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ*
***ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี*

บทคัดย่อ การเปรียบเทียบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (IFA) กับวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดส (IIP) จากตัวอย่างซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส 27 ตัวอย่าง ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบ 43 ตัวอย่าง จำแนกเป็นผู้มีสุขภาพดี 10 ตัวอย่าง ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค 20 ตัวอย่าง และผู้ป่วยด้วยโรคอื่น ๆ 13 ตัวอย่าง พบว่าทั้งสองวิธีสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($K = 0.97$, $p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างสองวิธีในกลุ่มตัวอย่างผลบวก พบว่าวิธี IIP ให้ผลบวกในระดับไตเตอร์สูงกว่าวิธี IFA ร้อยละ 57.2 (16/28) ในระดับเท่ากัน ร้อยละ 32.1 (9/28) และให้ผลบวกในระดับต่ำกว่า IFA ร้อยละ 10.7 (3/28) โดยมีผลบวกปลอม 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคซิฟิลิส และผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่การระบาด อย่างไรก็ตาม การศึกษานำร่องนี้เพียงแต่แสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดสมาใช้แทนวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เพราะมีข้อดีเหนือกว่าคือใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาในการอ่านผลและการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม ทั้งนี้ต้องเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา จึงจะสรุปประสิทธิภาพของวิธี IIP ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้

คำสำคัญ: **เลปโตสไปโรซิส, อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์, อิมมูโนเพอร์ออกซิเดส**

บทนำ

โรคไข้ฉี่หนู (leptospirosis) เป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทยในปัจจุบัน จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข พบว่า อัตราป่วยของประชากรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างมากตั้งแต่ พ.ศ.

2538 เป็นต้นมา โดยอัตราป่วยจากเดิมอยู่ในช่วง 0.07-0.5 ต่อแสนประชากร ได้เพิ่มขึ้นเป็น 3.84, 3.57 และ 9.87 ใน พ.ศ. 2540-2542 ตามลำดับ และอัตราป่วยตายใน พ.ศ. 2542 พบว่ามีมากถึงร้อยละ 4.38[1] และคงเดิม ตราบจนถึง พ.ศ. 2548 คือร้อยละ 4.4[2] และเนื่องจากโรคนี้เป็นกลุ่มของโรคที่มีอาการของไข้เฉียบพลันไม่ทราบสาเหตุ การวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกเพียงอย่างเดียวไม่อาจช่วยแยกโรคจากกลุ่มโรคที่มีอาการใกล้เคียงกันได้[3] จึงต้องอาศัยการตรวจกรองทางห้องปฏิบัติการมาใช้ร่วมกัน ดังนั้นการตรวจกรองผู้ป่วยด้วยวิธีการที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วจะช่วยให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงทีซึ่งจะทำให้อัตราการเสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวลดน้อยลงได้

สำหรับวิธีการตรวจกรองผู้ป่วยโรคดังกล่าวจะใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีการตรวจกรอง (screening test) โดยทั่วไปจะใช้ หลักการการเกาะกลุ่ม (agglutination) ได้แก่ latex agglutination[4], micro-capsule agglutination[5] หรือหลักการอื่น ๆ ได้แก่ ELISA[6], dot ELISA[7], chemiluminescent[8] และ immunchromatography[9] เป็นต้น แต่วิธีดังกล่าวยังมีความไวและความจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก ต้องส่งตรวจซ้ำเพื่อป้องกันผลลบปลอม (false negative) ตามรูปแบบแนวทางการตรวจวินิจฉัยที่จัดทำโดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[10] ได้กำหนดให้ส่งตรวจซ้ำด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA) โดยมีวิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบ แต่เนื่องจากข้อจำกัดของวิธี MAT ที่ต้องใช้แอนติเจนของเชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบ การใช้เวลาทดสอบนาน และความยุ่งยากของการเตรียมแอนติเจน จึงนิยมใช้วิธี IFA มาเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบแทน ทั้งนี้เพราะวิธีนี้มีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาและค่าบำรุงรักษาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญงานในการอ่านผล การตรวจโดยวิธีนี้จึงมีเฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เช่นโรงพยาบาลประจำจังหวัด โรงพยาบาลศูนย์หรือเฉพาะที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เท่านั้น

ด้วยสภาพปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธี immunoperoxidase (IIP) ขึ้น โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chimsumang S และคณะ[11] ซึ่งได้ใช้วิธีดังกล่าวในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสและริคเกตเซีย วิธี IIP เป็นวิธีที่สะดวกและมีความไวสูงเนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้การติดฉลากด้วยเอนไซม์และสามารถอ่านผลได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ รวมถึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจกรองภาคสนามได้อีกด้วย การประเมินวิธีดังกล่าวได้ศึกษาเปรียบเทียบกับวิธี IFA เพื่อที่จะศึกษาความสอดคล้องระหว่างสองวิธีซึ่งมีการเตรียมแอนติเจนในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นถ้าวิธี IIP ที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องร่วมกันกับวิธี IFA ก็จะสามารถนำวิธีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้แทนกันได้ในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไปรวมถึงโรงพยาบาลชุมชน ซึ่งจะมีประโยชน์ในการช่วยตรวจกรองโรคเลปโตสไปโรซิส

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 70 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มตัวอย่างควบคุมผลบวก จำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จังหวัดอุดรธานี

2. กลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบ จำนวน 43 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

2.1 กลุ่มตัวอย่างน้ำเหลืองของผู้ที่มีสุขภาพดีในจังหวัดสมุทรปราการที่มารับบริการการตรวจสุขภาพของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 10 ตัวอย่าง

2.2 กลุ่มตัวอย่างน้ำเหลืองของผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคตามข้อมูลของกระทรวง

สาธารณสุข[12] ประกอบด้วยจังหวัดบุรีรัมย์ อุบลราชธานี อำนาจเจริญ เลย ชัยภูมิ นครพนม ร้อยเอ็ด ขอนแก่น สกลนคร อุดรธานี และมหาสารคาม จำนวน 20 ตัวอย่าง

2.3 กลุ่มตัวอย่างน้ำเหลืองของผู้ป่วยด้วยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่เลปโตสไปโรซิสจำนวน 13 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับการทดสอบต่อไปนี้ คือ VDRL, TPHA, FTA-ABS, RF, ASO, Widal test, Weil-Felix test, Heterophile และ Dengue IgG จำนวน 13 ตัวอย่าง จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จังหวัดอุดรธานี และบริษัทเอกชนแห่งหนึ่ง

ระยะเวลาที่ศึกษา

ในระหว่าง เดือนกุมภาพันธ์ - มิถุนายน พ.ศ. 2551

วิธีการตรวจ

นำตัวอย่างทดสอบทั้งหมดมาตรวจด้วยวิธี IFA ตามวิธีการศึกษาของศราวุธ และคณะ[13] เปรียบเทียบกับวิธี IIP ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chimsumang S และคณะ[11]

วิธี IFA

ใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราเคลือบบนสไลด์หลุม แล้วหยดตัวอย่างซีรัมทดสอบลงไป ในกรณีผลบวก แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรัมผู้ป่วยจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อที่เคลือบบนสไลด์หลุม ล้างด้วย PBS แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสง fluorescein labeled anti-human IgM หรือ IgG ดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) จะเห็นตัวเชื้อเรืองแสงสีเขียวบนพื้นสีดำ

วิธี IIP

ใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราเคลือบบนสไลด์หลุม แล้วหยดตัวอย่างซีรัมทดสอบลงไป ในกรณีผลบวก แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อที่เคลือบบนสไลด์หลุมเช่นเดียวกับวิธี IFA จากนั้นล้างด้วย PBS เติม enzyme labeled anti-human IgM หรือ IgG แล้วตรวจวัดปฏิกิริยาทดสอบด้วย insoluble sustrate คือ AEC อ่านผลโดยดูสีที่เกิดขึ้นด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) จะเห็นตัวเชื้อติดสีแดงบนสไลด์

สถิติ

วิเคราะห์ความสอดคล้องระหว่างทั้งสองวิธีด้วยสถิติ Kappa analysis และ McNemar's chi square

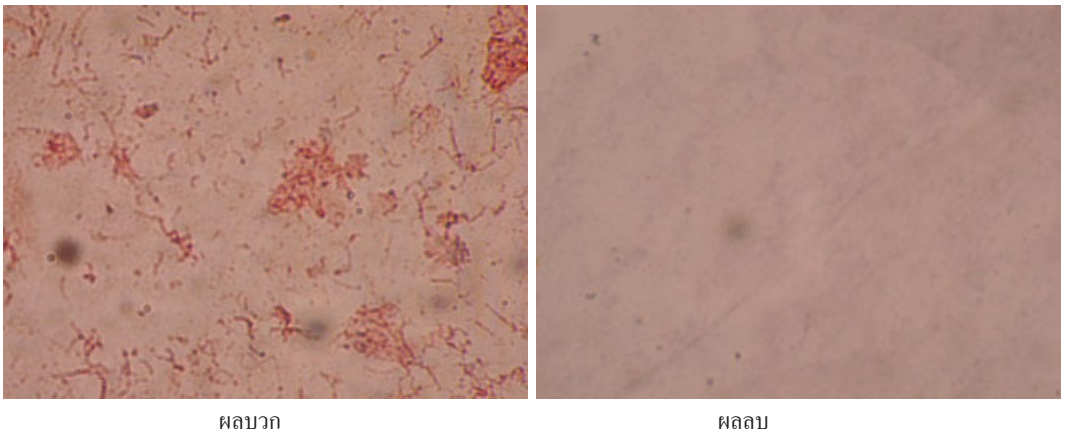
เกณฑ์การตัดสินโรค

วิธี IFA titer ≥ 1:100

วิธี IIP titer ≥ 1:100

ผลการศึกษา

วิธี IIP เมื่อนำมาทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุมให้ผลบวกและลบแสดงดังรูปที่ 1



ผลบวก ผลลบ

รูปที่ 1 ตัวอย่างผลบวกและลบโดยวิธี IIP

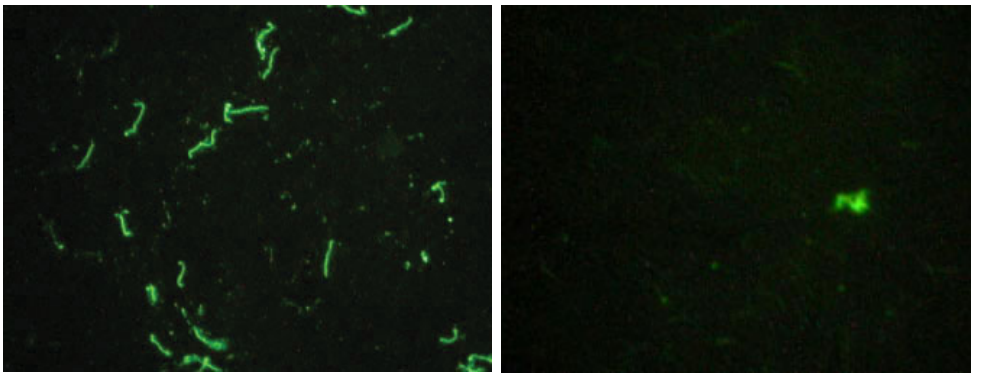
วิธี IFA เมื่อนำมาทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุมให้ผลบวกและลบแสดงดังรูปที่ 2

ผลการทดสอบตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 70 ตัวอย่าง ด้วยวิธี IFA และวิธี IIP แสดงในตารางที่ 1

พบว่า กลุ่มตัวอย่างผลบวกให้ผลบวกทั้งวิธี IFA และ IIP ทั้งหมด ในขณะที่กลุ่มตัวอย่างผลลบให้ผลบวกด้วยวิธี IFA 1 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นซีรัมของผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาดจากจังหวัดมหาสารคาม และให้ผลบวกด้วยวิธี IIP 2 ตัวอย่าง โดยที่ 1 ตัวอย่างนั้นเป็นตัวอย่างเดียวกับ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี IFA ส่วนอีก 1 ตัวอย่าง เป็นซีรัมของผู้ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ VDRL และ TPHA ดังนั้นเมื่อนำผลการทดสอบของทั้งสองวิธีมาคำนวณเพื่อหาความสอดคล้อง พบว่ามีค่าความสอดคล้องในระดับสูงมากด้วยสถิติ Kappa = 0.97 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ (ตารางที่ 2)

เมื่อนำผลการศึกษาในระดับ titer ของกลุ่มตัวอย่างผลบวกทั้ง 28 ตัวอย่าง และตัวอย่างผลลบ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบทั้งวิธี IIP และ IFA เป็นบวกมาเปรียบเทียบในเชิงกึ่งปริมาณ (semi quantitative) เพื่อประเมินความไวของการทดสอบระหว่างสองวิธี ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3 4 และ 5

จากตารางที่ 3 4 และ 5 ซึ่งใช้ตัวอย่างทดสอบจำนวน 28 ตัวอย่าง พบว่า ให้ผลการตรวจในระดับไตเตอร์เท่ากันจำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 32.1 (9/28) วิธี IIP ให้ผลการตรวจในระดับไตเตอร์ที่สูงกว่าวิธี IFA เป็นจำนวน 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 57.2 และ



ผลบวก ผลลบ

รูปที่ 2 ตัวอย่างผลบวกและลบโดยวิธี IFA

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบด้วยวิธี IFA และ IIP ในกลุ่มตัวอย่างประเภทต่าง ๆ

กลุ่มตัวอย่าง/จำนวนตัวอย่าง	รายละเอียด/จำนวนตัวอย่าง	วิธี IFA		วิธี IIP	
		+	-	+	-
1. กลุ่มตัวอย่างผลบวก (27)	ซีรัมผู้ที่ให้ผลบวกโดยวิธี IFA	27	0	27	0
2. กลุ่มตัวอย่างผลลบ (43)	- ซีรัมผู้ที่มีสุขภาพดี (10)	0	10	0	10
	- ซีรัมผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด (20)	1	19	1	19
	- ซีรัมผู้ที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยโรคอื่น ๆ (13)	0	13	1	12
	รวมทั้งสิ้น 70 ตัวอย่าง	28	42	29	41

ตารางที่ 2 ความสอดคล้องระหว่างวิธี Indirect Immunoperoxidase (IIP) และวิธี Indirect Immunofluorescence (IFA)

IIP	IFA		รวม
	Positive	Negative	
Positive	28	1	29
Negative	0	41	41
รวม	**28**	**42**	**70**

ตารางที่ 3 ผลของการทดสอบโดยวิธี IIP และ IFA ที่มีไตเตอร์เท่ากันจำนวน 9 ตัวอย่าง

ระดับไตเตอร์	จำนวน (ตัวอย่าง)
1 : 100	3
1 : 800	1
1 : 1600	2
> 1 : 1600	3

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP มากกว่า วิธี IFA จำนวน 16 ตัวอย่าง

IIP	IFA	จำนวน (ตัวอย่าง)
1:200	1:100	8
1:400	1:100	1
1:400	1:200	4
1:800	1:400	2
1:1600	1:800	1

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP น้อยกว่า วิธี IFA จำนวน 3 ตัวอย่าง

IIP	IFA	จำนวน (ตัวอย่าง)
1:100	1:200	1
1:100	1:400	1
1:400	1:1600	1

ให้ผลการตรวจในระดับไตเตอร์น้อยกว่าวิธี IFA จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.7

วิจารณ์

จากรายงานการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส ตั้งแต่ พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา แสดงให้เห็นว่ามีจำนวน ผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นทุกปี โดยมากกว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยทั้งหมดอาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดบุรีรัมย์ สุรินทร์ ขอนแก่น มหาสารคาม ชัยภูมิ นครราชสีมา กาฬสินธ์ เลย และร้อยเอ็ด[12] ซึ่งเป็นพื้นที่การเกษตร ประชากรส่วนใหญ่เป็นเกษตรกร อาศัยอยู่ในท้องถิ่นทุรกันดาร การตรวจวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ระยะเบื้องต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญในการให้การรักษาและควบคุมโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แนวทางการชันสูตรโรคนี้ของกระทรวงสาธารณสุข[10] กำหนดให้ตรวจกรองโดยหลักการที่ทำได้ง่าย สะดวก มีความไวที่เหมาะสมและเมื่อให้ผลลบจากการทดสอบโดยที่ผู้ป่วยมีอาการน่าสงสัยให้ส่งตรวจยืนยันด้วยหลักการ IFA ที่มีความจำเพาะสูง แต่ในปัจจุบันหลักการ ดังกล่าวมีให้บริการตรวจเฉพาะที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เท่านั้น เพราะต้องใช้อุปกรณ์ในการอ่านผลเฉพาะคือกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และต้องใช้ผู้ชำนาญเฉพาะในการอ่านผล ทำให้การยืนยันผลดังกล่าวต้องเสียเวลาในการนำส่งและรอผลการตรวจ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการตัดสินใจของแพทย์ในการรักษาผู้ป่วย หลักการ IIP จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้สำหรับตรวจร่วมกับหลักการตรวจกรองอื่นในการจำแนกผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสเบื้องต้นแทนหลักการ IFA เนื่องจากการอ่านผลการทดสอบด้วยหลักการ IIP ใช้กับกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) ที่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลชุมชนและโรงพยาบาลทั่วไป

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสองวิธี พบว่า มีความสอดคล้องกันในระดับสูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($K = 0.97$, $p < 0.05$) รวมถึงเมื่อ

พิจารณาระดับการเจือจางของตัวอย่างส่งตรวจในตารางที่ 3, 4 และ 5 ซึ่งพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ต่างกัน วิธี IIP สามารถตรวจพบได้ในระดับที่สูงกว่าถึงร้อยละ 57.2 อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้พบว่าวิธี IIP ให้ผลบวกปลอมเกิดขึ้นมากกว่าวิธี IFA โดย 1 ตัวอย่างจาก 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก เป็นตัวอย่างของผู้ป่วยโรคซิฟิลิสซึ่ง จากการศึกษาของ Appassakij H[14] รายงานว่าเกิดผลบวกข้ามกลุ่มระหว่างผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสกับผู้ป่วยซิฟิลิสเมื่อทดสอบด้วยวิธีทางซีโรโลยีได้ เนื่องจากโครงสร้างของเชื้อมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยซิฟิลิสเป็นบวกถึงหกตัวอย่าง แต่ให้ผลบวกเกิดขึ้นเพียงหนึ่งตัวอย่างเท่านั้น ในขณะที่งานวิจัยของ Chimsumang S และคณะ[11] ก็พบตัวอย่างผลบวกปลอมเกิดขึ้นจากโรคซิฟิลิสเช่นเดียวกันจำนวน 2 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่างทดสอบ และพบว่าเกิดผลบวกปลอมขึ้นกับตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส มาลาเรีย และไทฟอยด์อีกด้วย

ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอมอีก 1 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากผู้ที่ไม่มีอาการของโรคเลปโตสไปโรซิส จากข้อมูลประวัติพบว่ามีอาชีพเกษตรกรและอาศัยอยู่ในจังหวัดมหาสารคามซึ่งเป็นพื้นที่การระบาด โดยให้ผลบวกปลอมทั้งวิธี IFA และ IIP และเป็นผลบวกที่ระดับไตเตอร์ต่ำ (weak positive) ทั้งสองวิธีคือ 1:100 ซึ่งในกรณีนี้อาจจะเป็นผู้ที่เคยสัมผัสเชื้อและสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อในระดับต่ำ ๆ จึงทำให้ผลการตรวจเป็นบวกเมื่อใช้ผลจุดตัด (cut off) ของการทดสอบนี้เป็น 1 :100

จากการศึกษาของ Chimsumang S และคณะ[11] ได้ใช้แอนติเจนที่เตรียมขึ้นจากเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar Patoc โดยการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG, IgM และ IgA เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างสองวิธีโดยใช้จุดตัดต่างกันที่ระดับ 1:100, 1:200 และ 1:400 ซึ่งพบว่าเมื่อเลือกใช้จุดตัดที่สูงขึ้นก็จะทำให้ค่าความจำเพาะของการทดสอบสูงขึ้นแต่ในขณะเดียวกัน ความไวของการทดสอบก็จะลดต่ำลงด้วย สำหรับวิธี IIP พบว่าค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ ต่ำกว่าวิธี IFA เล็กน้อย โดยสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (Kappa coefficient) เมื่อเทียบกับวิธี MAT มีค่าเท่ากับ 0.77 และ 0.76 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเปรียบเทียบหลักการสำคัญในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสสองวิธี ซึ่งการที่จะนำวิธี IIP มาใช้แทนวิธี IFA จำเป็นที่จะต้องทำ validation กับวิธี MAT แต่เนื่องจากตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีผลการทดสอบด้วยวิธี MAT เพียงไม่กี่ตัวอย่างและแทบไม่มีการส่งตรวจในปัจจุบัน จึงไม่ได้นำผลของวิธี MAT มาคำนวณร่วมด้วย และควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างทั้งผลบวกและลบให้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติประจำปี พ.ศ. 2550

เอกสารอ้างอิง

1. สำนักระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2542. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข; 2542.
2. Tangkanakul W, Smits HL, Jatanasen S, Ashford DA. Leptospirosis : an emerging health problem in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36(2):281-8.
3. สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางเวชปฏิบัติโรคเลปโตสไปโรซิส ปี 2547. กรุงเทพมหานคร : องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์; 2547.
4. Ramadass P, Samuel B, Nachimuthu K. A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies. Vet Microbiol 1999; 70(1-2):137-40.
5. Suputtamongkol Y, Sarawish S, Silpasakorn S, Potha U, Silpapojakul K, Naigowit P. Microcapsule agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in Thailand. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92(7):797-801.

6. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gen Microbiol 1985; 131 (Pt 2):377-85.
7. ศันสนีย์ ตันติ์จธัม, ทวีพร พันธุ์พาณิชย์, ศราวุธ สุทธิรัตน์. การพัฒนาวิธี dot-ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2550; 35(2):1955-67.
8. Waitkins SA, Hookey JV. The detection of leptospires by a chemiluminescent immunoassay. J Med Microbiol 1986; 21(4):353-6.
9. Hatta M, Smits HL, Gussenhoven GC, Gooskens J. Introduction of a rapid dipstick assay for the detection of leptospira-specific immunoglobulin m antibodies in the laboratory diagnosis of leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2000; 31(3):515-20.
10. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. การฝึกอบรมการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข; 2543.
11. Chimsumang S, Chettanadee S, Jitrathai S, Wongchotigul V. Indirect immunoperoxidase test for the diagnosis of leptospirosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36(2):296-301.
12. ยุพิน ศุพุทธมงคล. โรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทย : โรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นใหม่และโรคติดเชื้อที่ปรากฏขึ้นอีก. กรุงเทพมหานคร: สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย; 2539.
13. ศราวุธ สุทธิรัตน์, เกษราภรณ์ เลื่อมสำราญ, ณัฐมน ตั้งตรงวัฒนา, ธัญพร อุนณรงค์รัตน์, จีรนันท์ อารีรอบ, ศันสนีย์ ตันติ์จธัม. การเปรียบเทียบวิธีอินไดเร็คอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และลาเทกซ์แอกกลูติเนชั่นสำหรับตรวจหาแอนติบอดีย์ต่อเชื้อเลปโตสไปรา. วารสารวิชาการสาธารณสุข 2545; 11(6):893-8.
14. Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. Am J Trop Med Hyg 1995; 52(4):340-3.

Abstract **Comparison of Antibody Detection between Immunoperoxidase (IIP) and Immunofluorescence (IFA) for Diagnosis of Leptospirosis**

Sarawut Suttirat*, Taweeporn Phunpanich*, Nirut Rodkhunthod*, Boonnipa Suwannakan and Surasak Muenphon ****

*Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, **Reginal Medical Sciences Center Udon Thani

Journal of Health Science **2009; 18:455-61.**

A comparison of leptospiral antibody detection between IIP and IFA was performed on samples of serum collected from 27 leptospirosis patients and 43 negative controls consisting of 10 healthy controls, 20 individuals in endemic areas and 13 non-leptospirosis. The agreement rate when two methods were compared, was 0.97 by Kappa analysis and indicated a very good agreement. Antibody titer of positive samples resulting from IIP and IFA were compared. IIP gave more titer than IFA in 16 from 28 (57.2%), equivalent titer in 9 from 28 (32.1%) and less titer than IFA in 3 from 28 (10.7%). False positive was found in two samples, one sample of VDRL and TPHA positive case and another from individual in endemic area. This preliminary study showed that IIP might be an alternative method to IFA for antibody detection. The benefit of IIP over IFA was light microscope used and its possible application for field trial study. However, more sera should be tested before its effectiveness for serodiagnosis of leptospirosis can be concluded.

Key words: **leptospirosis, immunofluorescence, immunoperoxidase**