

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

การประเมินคุณค่าของ ELISA ในการวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๊ด ในแถบอีสานตอนบน

Evaluation of Enzyme - Linked Immunosorbent Assay in the Diagnosis of Gnathostomiasis in Northeastern Thailand

สุเจตน์ เลิศเอนกวัฒน์* พบ.,ว.อายุรศาสตร์

โอภาส บุญสิทธิ์* พบ.

มาลินี อนันตพฤทธิ** สพ.บ.,D.A.P.& E.,Ph.D.

* โรงพยาบาลหนองคาย จังหวัดหนองคาย

** คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

Sujet Lertanekawattana* M.D., F.R.C.P.(T)

Opas Boonsit* M.D.

Malinee Anantaphruti** D.V.M., D.A.P.& E.,

Ph.D.

* Nong Khai Hospital, Nong Khai Province

** Faculty of Tropical Medicine, Mahidol

University

บทคัดย่อ

การตรวจด้วยวิธี ELISA เป็นการตรวจ แอนติบอดีในซีรัม ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่น่ามาใช้ตรวจเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค รายงานนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีต่อพยาธิตัวจิ๊ดของประชากรสี่กลุ่มที่อยู่แถบอีสานตอนบน โดยวิธี ELISA กลุ่มที่ 1 เป็นผู้ป่วยที่พบพยาธิตัวจิ๊ดแน่นอนจำนวน 7 ราย กลุ่มที่ 2 เป็นผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่เข้าได้กับโรคตัวจิ๊ด แต่ไม่สามารถจับตัวพยาธิยืนยันได้ มีจำนวน 58 ราย กลุ่มที่ 3 เป็นประชากรสุขภาพดี ไม่เคยมีอาการที่สงสัยโรคพยาธิตัวจิ๊ด และไม่เคยกินอาหารที่ไม่สุก รวมทั้งการตรวจอุจจาระไม่พบไข่พยาธิใดๆ จำนวน 51 ราย และกลุ่มที่ 4 เป็นผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของโรคพยาธิตัวจิ๊ดมาก่อน การตรวจอุจจาระพบไข่พยาธิไปไม้ดับเพียงอย่างเดียว จำนวน 52 ราย

ผลการศึกษาพบว่า ค่า optical density (OD) ของกลุ่มที่ 2 แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มที่ 3 ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ 4 cut off point ถ้าอยู่ที่ระดับ OD เท่ากับ $\text{mean} + 2 \text{SD}$ ในกลุ่มที่ 3 แล้ว ค่า sensitivity ของ tset เท่ากับ 42.90% ส่วน specificity เท่ากับ 98.03% mean OD ของกลุ่มที่ 3 ต่างจาก mean OD ของกลุ่มประชากรสุขภาพดีอยู่กรุงเทพฯ มาก

ABSTRACT

The Enzyme - Link Immunosorbent Assay (ELISA) is one of the serologic tests for antibody level detection, it might be useful in the immunodiagnosis. We applied this test to four classified group of subject in upper northeastern part of Thailand. Seven patients whom *Gnathostoma spinigerum* larvae were recovered classified as group I, The rest, 58 patients clinical suspected gnathostomiasis, group II. Fifty-one cases whom faeces revealed no any helminth eggs and who are healthy, no history of consuming raw or insufficient cooked meat were negative group III. Group IV was 52 cases whom faeces only *Opisthorchis* eggs and no history of migratory swelling or similar symptoms like gnathostomiasis. The results of this study are: (1) There is statistical difference of optical density (OD) between group II and group III ($p < 0.05$), but no statistical difference of OD between group III and group IV ($p > 0.05$). (2) Sensitivity of this test is 42.9 % and the specificity is 98.03 % (3) Mean OD of group III (negative control group of northeastern population) is much difference from mean OD of health persons of Bangkok (negative control group of Bangkok)

บทนำ

โรคพยาธิตัวจืดในคนไทยเกิดจากพยาธิ *Gnathostoma spinigerum* โดยการบริโภคอาหารที่เป็นสัตว์น้ำจืดทำไม่สุก ได้แก่ ปลาเช่นปลาไหล⁽¹⁾ พยาธิทำให้เกิดอาการได้หลายรูปแบบ แล้วแต่ว่าพยาธิจะเข้าไปที่ ไทน์ การวินิจฉัยโรคที่แน่นอน คือ การสามารถพบตัวหรือการผ่าเอาตัวพยาธิได้ ซึ่งโอกาสเช่นนี้มีน้อย⁽²⁾ ในทางคลินิก การวินิจฉัยมักจะอาศัยอาการสงสัย เช่น อาการบวมเคลื่อนที่ หรือบวมๆยุบๆ ร่วมกับการพบภาวะ eosinophilia ในเลือด ซึ่งอาจจะถูกหรือผิดก็ได้ เพราะอาการดังกล่าวเกิดจากการแพ้สารหรือจากการอักเสบติดเชื้ออื่นได้

เคยมีผู้หาวิธีชันสูตรโรคโดยการสกัดสารโปรตีนจากตัวแก่ของ *Gnathostoma spinigerum* มาเป็น antigen เพื่อการทดสอบฉีดเข้าผิวหนังแล้วดูปฏิกิริยา⁽³⁾ (skin test) ซึ่งผลไม่น่าเชื่อถือ

ในปัจจุบันมีการตรวจซีรัมด้วยวิธี ELISA ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือเฉพาะ มีรายงานหลายรายงานว่าให้ผลการตรวจเป็นที่น่าพอใจ⁽⁴⁻⁶⁾ แต่รายงานเหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นการทดสอบในคนที่อยู่ภาคกลาง ซึ่งอุบัติการณ์การพบพยาธิตัวจืดหรือ

พยาธิอื่น ๆ จะแตกต่างจากการพบในแถบอีสาน

ผู้รายงานและคณะต้องการทราบว่า ถ้าใช้ ELISA เพื่อการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่สงสัยเป็นตัวจืดในแถบอีสานตอนบน จะให้คุณค่าการวินิจฉัยเท่าไร การใช้ค่ามาตรฐานของคนกรุงเทพฯ มาเป็นตัวตัดสินถูกต้องหรือไม่ และพยาธิใบไม้ตับซึ่งพบมากในประชากรอีสานมีผลต่อการตรวจสอบโดยวิธีนี้หรือไม่

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาไปข้างหน้า เริ่มจากมิถุนายน 2528 ถึง ธันวาคม 2533 โดยการรวบรวมค้นหาผู้ป่วยที่มารับบริการที่โรงพยาบาลหนองคาย ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในที่มีอาการทางคลินิกที่สงสัยตัวจืด และผู้ป่วยที่สามารถจับตัวพยาธิได้โดยการกรีดเอาตัวออก กับผู้ที่มีตัวไข่ออกมาให้พบเห็น ซึ่งทุกรายมีถิ่นฐานอยู่ใน 3 จังหวัด คือ อุดรธานี หนองคาย และเลย ทุกรายจะเจาะเลือดไว้ประมาณ 8 ซีซี รวมทั้งตรวจนับเม็ดเลือด (CBC) และนัดมาตรวจอุจจาระเพื่อหาการติดเชื้อพยาธิตัวอื่น ๆ เลือดที่เจาะได้นำมาปั่นแยกเอาซีรัมแช่ตู้เย็นไว้รวบรวมส่ง

ภาควิชาปรสิตหนอนวิทยา คณะเวชศาสตร์เขตร้อน เพื่อตรวจ ELISA การส่งรีซั่มตรวจ โดยการแช่ ภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้งบรรจุอยู่ ส่งโดยรถยนต์ใช้เวลา เดินทาง 8 - 9 ชั่วโมง และปลายทางรับทันที ไม่เกิน 3 ชั่วโมง หลังจากถึงปลายทาง

ผู้ป่วยทุกรายจะถูกเก็บข้อมูล โดยมีแบบฟอร์ม บันทึกรายละเอียด เพศ อายุ ที่อยู่ site of affected การรับประทานอาหารในอดีต ในบางรายมีการตรวจ น้ำไขสันหลัง ในกรณีที่สงสัยเยื่อหุ้มสมองอักเสบจาก พยาธิตัวจิ๊ด

ในกลุ่มที่เป็น negative control ได้จากผู้ที่มา รับบริการโครงการรณรงค์ตรวจหาโรคพยาธิ ที่โรงพยาบาลหนองคายจัดขึ้น โดยการคัดเลือกผู้ที่ไม่ มีประวัติการกินอาหารไม่สุก ไม่มีประวัติการมีอาการ คล้ายโรคพยาธิตัวจิ๊ด รวมทั้งการตรวจอุจจาระโดยวิธี Kato thick smear ไม่พบพยาธิใดๆ และกลุ่มที่พบ ไข่พยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini* หรือ OV) ได้จากการรณรงค์ตรวจหาพยาธิเช่นเดียวกัน และคัดเลือก เฉพาะผู้ที่ไม่ มีประวัติการเกิดโรคที่สงสัยตัวจิ๊ด และพบเฉพาะไข่พยาธิใบไม้ตับทั้ง 2 กลุ่ม หลังได้ เจาะเลือดเช่นเดียวกับผู้ป่วย 2 กลุ่มแรก

การตรวจทางรีซั่ม

antigen เตรียมจาก third stage larval ซึ่งได้จาก ด้ับและกล้ามเนื้อของหนูที่ถูกเพาะเลี้ยงเชื้อตัวจิ๊ด ส่วนของ protein ของ antigen นี้ใช้วัดโดยวิธีของ Lowry et al⁽⁷⁾ และเก็บ antigen ไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้การตรวจ ELISA โดยใช้ serum dilution 1:800 และ antigen concentration 10 ไมโคร กรัมของ protein ต่อ มิลลิลิตรใน microtiter plate (Greiner) อ่านค่าด้วยเครื่องตรวจ ELISA ที่ wave length 492 นาโนเมตร (Titertex multiscan plus Mk II)

ผลการศึกษา

จำนวนประชากรที่ศึกษาทั้ง 4 กลุ่ม คือ
 กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยที่พบพยาธิตัวจิ๊ด จำนวน 7 ราย
 กลุ่มที่ 2 ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิก ซึ่งเข้าได้ กับโรคพยาธิตัวจิ๊ด แต่ไม่พบตัวพยาธิ จำนวน 58 ราย
 กลุ่มที่ 3 ผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่เคยมีอาการสงสัย โรคพยาธิตัวจิ๊ด และไม่เคยกินอาหารที่ไม่สุก รวมทั้ง ตรวจอุจจาระไม่พบไข่พยาธิใดๆ จำนวน 51 ราย

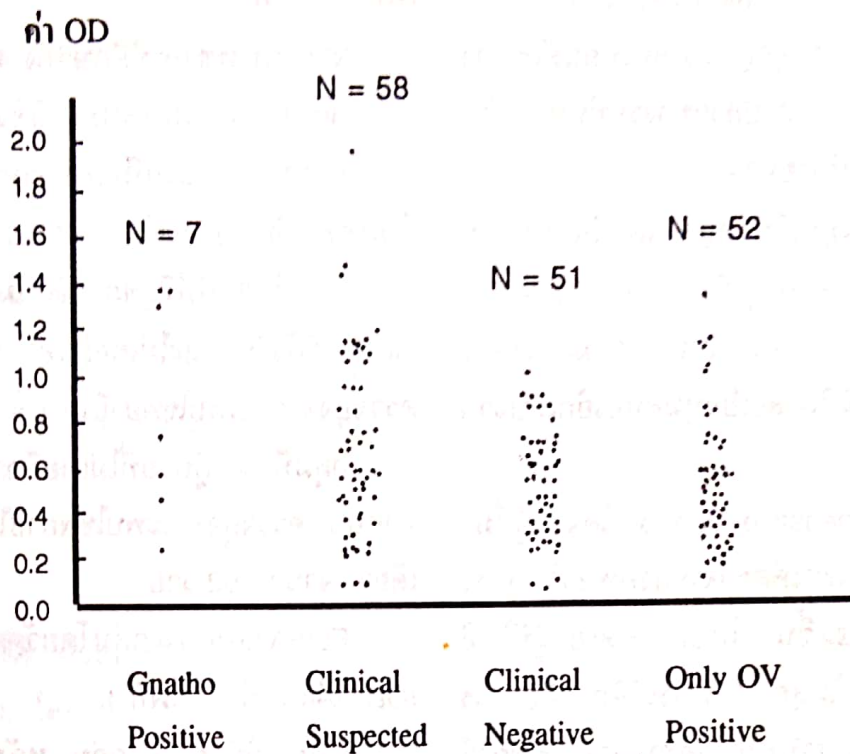
กลุ่มที่ 4 ผู้ป่วยที่ไม่เคยมีอาการของโรคตัวจิ๊ด มาก่อน ตรวจอุจจาระพบไข่พยาธิใบไม้ตับเพียงอย่าง เดียว จำนวน 52 ราย

ELISA ของคน 4 กลุ่ม โดยวัดค่า optical density (OD) ได้แสดงไว้ที่ภาพที่ 1

จำนวนผู้ป่วย 3 กลุ่ม หลังมีจำนวนมากใกล้เคียงกัน วัดเปรียบเทียบกับ เพศ อายุ เปอร์เซ็นต์ของ eosinophils ในกระแสเลือดไว้ในตารางที่ 1 จะเห็นว่า 3 กลุ่มหลังนี้ ค่า ODs จะเกาะกลุ่มกันแต่เมื่อใช้หลักสถิติ T - test ตรวจสอบความแตกต่างของ 3 กลุ่มหลัง พบว่ากลุ่มที่ 2 กับกลุ่มที่ 3 มีความแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่กลุ่มที่ 3 กับกลุ่มที่ 4 ไม่พบความแตกต่างกัน

ค่า OD เฉลี่ย (mean) ของ 4 กลุ่มได้แสดงไว้ ในภาพที่ 2 ซึ่งเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของกลุ่ม ตัวอย่างซึ่งเป็นชาวกรุงเทพฯที่มีสุขภาพดี จะเห็นได้ว่า ค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่ 3 ซึ่งถือว่าเป็น negative control ของคนแถบอีสานตอนบนแตกต่างจากค่าเฉลี่ยของกลุ่ม healthy persons ซึ่งถือเป็น negative control ของคนกรุงเทพฯ เมื่อคิดว่า mean + 2 SD เป็น cut off point แล้ว cut off point ของกลุ่มที่ 3 นี้อยู่ที่ค่า OD เท่ากับ 0.8466 ส่วน cut off point ของกลุ่ม negative control กรุงเทพฯ เท่ากับ 0.2336

ภาพที่ 1 แสดงค่า OD ของ 4 กลุ่ม

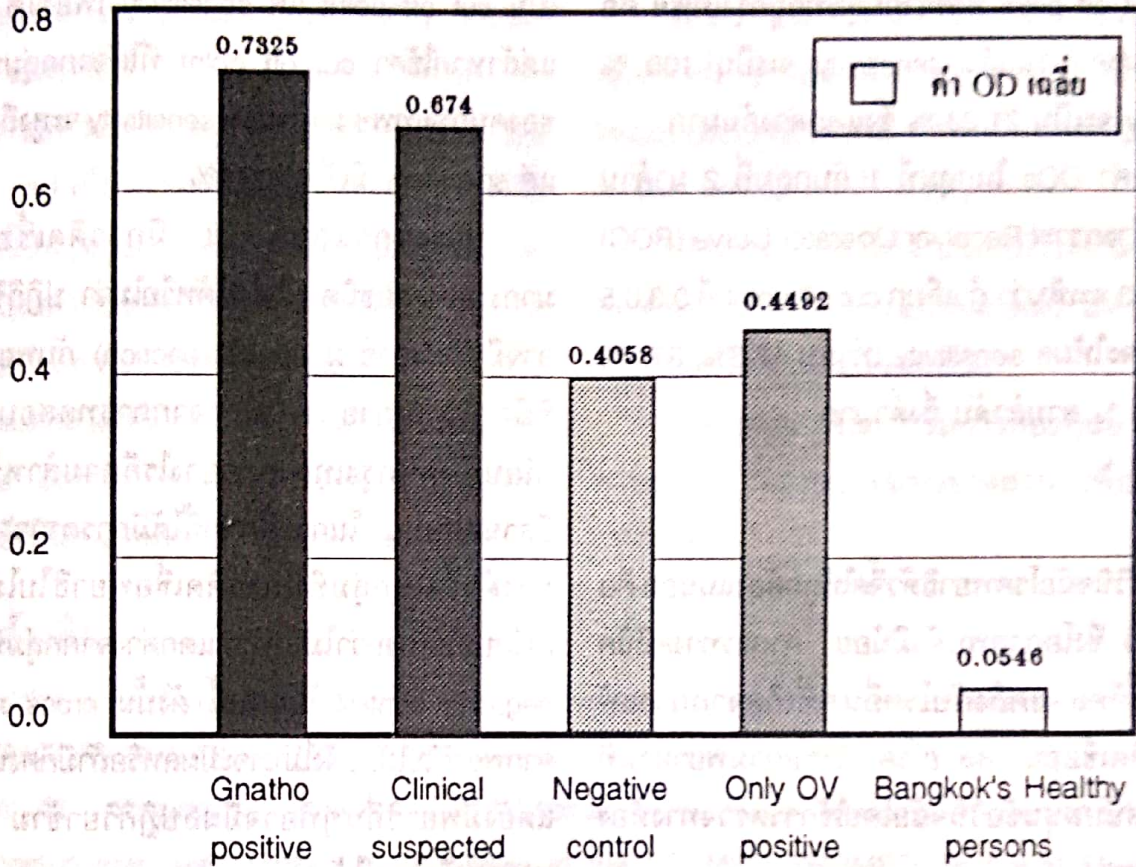


ตารางที่ 1 เปรียบเทียบอายุเฉลี่ย เพศ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของ eosinophils ของคน 3 กลุ่ม

Characteristics	Clinical suspected group N = 58	Negative control group N = 51	Only OV positive group N = 52
Mean age (year)	34	44.5	40.5
Sex male:female	1:1	1:0.83	1:0.8
Mean Eosinophils (%)	15%	4.08%	3.05%
Maximum Eosinophils (%)	50%	13%	18%

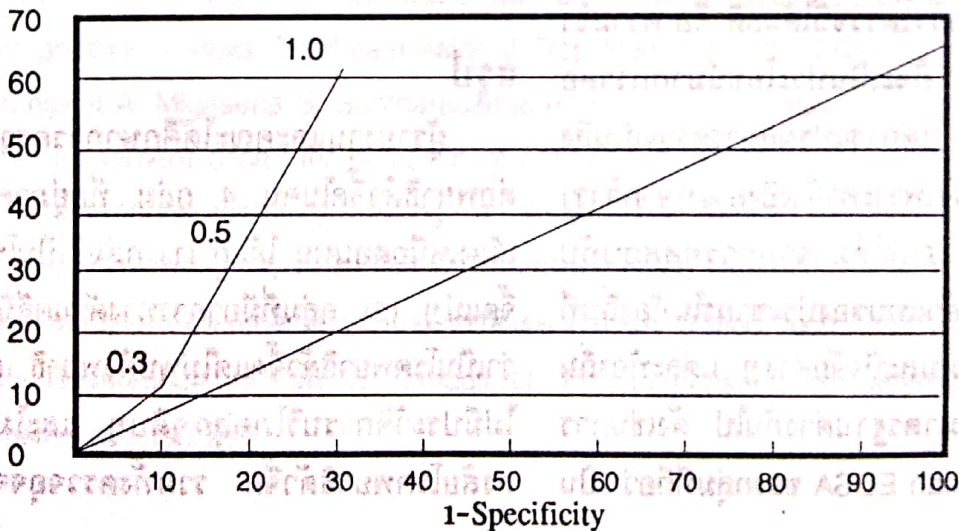
ภาพที่ 2 แสดงค่า OD เฉลี่ย กลุ่มพบพยาธิ กลุ่มสงสัยตัวอืด กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่พบพยาธิใบไม้ตับ ของประชากร 4 กลุ่ม ที่อีสาน กับควบคุมจากกรุงเทพฯ

Optical Density



ภาพที่ 3 Receiver Operator Curve ของ ELISA

Sensitivity



เมื่อใช้ตัวเลขที่ได้ในกลุ่มที่ 3 โดยมีกลุ่มที่ 1 เป็น positive control และคำนวณหา sensitivity และ specificity ของ test จะได้ 42.9 % ตามลำดับ แต่ถ้าหากใช้ cut off point ที่ได้จากกลุ่มที่อยู่กรุงเทพฯ คือ 0.2336 มาคำนวณแล้ว sensitivity จะเป็น 100 % specificity จะเป็น 21.23 % ซึ่งแตกต่างกันมาก

จากค่า ODs ในกลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 มาคำนวณและสร้างกราฟ Receiver Operator Curve (ROC) ดังภาพที่ 3 จะเห็นว่า ถ้าเลือก cut off point ที่ 0.3, 0.5 และ 1.0 จะให้ผล sensitivity เท่ากับ 12.3%, 37.5% และ 23.3 % ตามลำดับ ซึ่งต่ำมาก

วิจารณ์

การวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิตรให้ถูกต้องแน่นอน คือ การพบตัว ซึ่งโอกาสพบตัวมีน้อย อาการทางคลินิกของโรคนี้ก็คล้ายคลึงกับโรคอื่น ๆ ที่เกิดจากการแพ้หรือโรคติดเชื้ออื่น ๆ หลายโรค จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีสนับสนุนข้อวินิจฉัยโดยใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจซีรัมของผู้ป่วยโดยใช้วิธี ELISA ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะใช้สนับสนุนการวินิจฉัยทางคลินิก ประกอบกับในปัจจุบัน เครื่องมืออ่าน ELISA ก็มีใช้ อยู่แล้วในโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป เกือบทุกแห่ง ถ้าหากการตรวจนี้ได้ผลดี คือ ความจำเพาะสูง ความไวสูง ก็จะเป็นประโยชน์มากกว่าต่อการรักษาของแพทย์ แต่การแปรผลการตรวจเป็นสิ่งที่แพทย์ต้องระมัดระวังเพราะค่าอ้างอิงต่าง ๆ จากตำราหรือรายงานก่อน ๆ อาจได้มาจากการทดสอบกับประชากรที่ไม่ได้เป็นตัวแทนของประชากรในท้องถิ่นที่ต้องการตรวจ สภาวะและปัจจัยต่าง ๆ แต่ละท้องถิ่น ต่างกันไป ทำให้ค่ามาตรฐานต่างกันไป ดังเช่นการศึกษาที่ พบว่าค่า mean ELISA ของกลุ่มที่ถือว่าเป็น

negative control ต่างจากกลุ่มที่เป็น negative control (health persons) ของคนกรุงเทพฯ มาก ค่า specificity ที่ทำได้สูงถึง 98.03% โดยคิดจากค่า mean - 2 SD เป็น cut off point แต่ sensitivity เพียงแค่ 42.9% แต่ถ้าหากใช้ค่า cut off point ที่ได้จากกลุ่มทดสอบของคนกรุงเทพฯ มาคำนวณ sensitivity จะสูงถึง 100% แต่ specificity มีเพียง 23.9%

ประชากรแถบอีสาน มีการติดเชื้อพยาธิ มากมายหลายชนิด เป็นไปได้หรือไม่ว่า ปฏิกริยาซีรัม อาจมีปฏิกริยาข้าม (cross reaction) กับพยาธิอื่น ๆ ที่มีอยู่ในร่างกาย ทำให้ค่าจากการทดสอบมากขึ้น เทียบกับคนกรุงเทพฯ อย่างไรก็ตามสำหรับแถบ อีสานตอนบน ในการศึกษาได้มีการตรวจ ELISA ของตัวจิตรในกลุ่มที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมา เปรียบเทียบพบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ถือเป็น negative control ในแถบนี้ ดังนั้น cross reaction จากพยาธิใบไม้ตับจึงไม่น่าจะมีผลหรือถ้ามีก็น้อยมาก แต่ยังมีพยาธิอื่น ๆ ที่อาจมีผลปฏิกริยาข้าม ซึ่งไม่สามารถวิจารณ์ได้

ดังนั้น การใช้ ELISA test สำหรับตรวจผู้ป่วย อีสานตอนบน อาจได้ประโยชน์บ้าง แต่ไม่ตีมาก ตัว แปรที่ทำให้ค่าตรวจได้ยังมีอยู่ ในทางปฏิบัติจึงยังไม่ ใช้วิธีหลักในการตรวจสอบโรคพยาธิตัวจิตร

สรุป

ผู้รายงานและคณะได้ศึกษาการตรวจ ELISA ต่อพยาธิตัวจิตรในคน 4 กลุ่ม ที่อยู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ได้แก่ (1) กลุ่มที่เป็นโรคพยาธิตัวจิตรแน่ ๆ (2) กลุ่มที่มีอาการทางด้านคลินิกที่วินิจฉัยว่าเป็นโรคพยาธิตัวจิตรแต่ไม่พบตัวพยาธิ (3) กลุ่มที่ไม่มีประวัติการบริโภคสุก ๆ ดิบ ๆ และไม่มีอาการที่สงสัยโรคพยาธิตัวจิตร รวมทั้งตรวจอุจจาระไม่พบ

พยาธิใดๆ และ (4) กลุ่มที่ไม่มีประวัติเป็นโรคหรืออาการตัวจี๊ด แต่การตรวจอุจจาระพบไข่พยาธิใบไม้ดิบเพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาพบว่าเมื่อกลุ่มที่ 1 เป็น positive control และกลุ่มที่ 3 เป็น negative control ค่า sensitivity ของ test 42.9% ค่า specificity ของ test 98.03% กลุ่มที่อาการทางคลินิกที่สงสัยพยาธิตัวจี๊ด กับกลุ่มที่เป็น negative control ระดับ optical density มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่ม negative control กับกลุ่มที่พบแต่พยาธิใบไม้ดิบ ไม่มีความแตกต่างที่เป็นนัยสำคัญทางสถิติค่าเฉลี่ยกลุ่ม negative control ของคนอีสานตอนบนแตกต่างจากคนที่เป็นคนสุขภาพดี (negative control)

เอกสารอ้างอิง

1. Daengsvang S. Monograph on the genus *Gnathostoma* and gathostomiassis in Thailand. South-east Asian Medical Information Center, International Medical Foundation of Tokyo, Japan. 1980:21.
2. Cross JH. Diagnostic methods in other tissue helminthiasis including angiostrongyloidiasis, gnathostomiasis and trichinosis. A review in the SEAMEO TROMED Technical Meeting on Diagnostic Methods for Important Helminthiasis and Amoebiasis in Southeast Asia and the Far-East, Tokyo, 5 - 8 February 1974.
3. Punyagupta S, Pacheco G. Serological studies of experimental gnathostomiasis. Am J Trop Med Hyg 1961;10:515.
4. Suntharasamai P, Desakorn V, Migasena S, Bunnag D, Harinasuta T. ELISA for immunodiagnosis of human gnathostomiasis. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1985;16:274.
5. Dharmkrong-at A, Migasena S, Suntharasamai P, Bunnag D, Priwan R, Sirisingha S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Gnathostoma* antigen in patients with intermittent cutaneous migratory swelling. J Clin Microbiol 1986;23:847-851.
6. Morakote N, Maleewong W, Sukhavat K, Thamasonthi W, Charuchinda K, Khamboonruang C. Serological study of experimental gnathostomiasis in mice. J Med Tech Asso Thai 1987;15:19-23.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Foilin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265.

ของคนกรุงเทพฯ มาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลหนองคาย เจ้าหน้าที่สาธารณสุขจังหวัดหนองคาย ที่ร่วมมือในโครงการตรวจหาพยาธิ รวมทั้งบางท่านยินดีเป็น subject ในการตรวจเลือดและอุจจาระ

ขอขอบคุณ อาจารย์นายแพทย์วีรชัย โค้วสุวรรณ หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ช่วยเหลือด้านสถิติ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการกองทุนอายุรพัฒน์หนองคาย ที่ให้งบประมาณบางส่วน เพื่อใช้จ่ายในการศึกษา