Chulalongkorn Medical Journal

Volume 33
Issue 2 *February 1989*

Article 5

2-1-1989

เปรียบเทียบการตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระ โดยวิธีมินิ-ลาเท็กซ์ แอกกลูติเนชั่น และวิธีอีไลซ่า

วรรณา พรรณรักษา

จินตนา วุฒิยากร

วนิดา มั่งมี

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

พรรณรักษา, วรรณา; วุฒิยากร, จินตนา; and มั่งมี, วนิดา (1989) "เปรียบเทียบการตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระ โดยวิธีมินิ-ลาเท็กซ์ แอกกลูติเนชั่น และวิธีอีไลซ่า," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 33: Iss. 2, Article 5.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol33/iss2/5

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

เปรียบเทียบการตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระ โดยวิธีมินิ-ลาเท็กซ์ แอกกลูติเนชั่น และวิธีอีไลซ่า

วรรณา พรรณรักษา*
จินตนา วุฒฑยากร** วนิดา มั่งมี*

Punnarugsa V, Woodtayakorn J, Mungmee V. Comparative Study in the Detection of Rotavirus in Feces, Using Mini-Latex Agglutination and Enzyme Linked Immunosorbent Assays. Chula Med J 1989 Feb;33(2) : 113-117

A study of Rotavirus in 300 fecal specimens was performed using LA test in which the volume of reagents was reduced to 20 ul., and was compared to ELISA. The Mini-LA yielded results agreed with the ELISA in 97.0 percents(291/300), discordant in 2 percents(6/300). When the recommended volume was tested on the 9 discrepant samples, the results remained the same. The sensitivity and specificity of Mini-LA test as compared to ELISA were 87.5 and 99.6 percents respectively.

Reprint request: Punnarugsa V, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10500, Thailand.
Received for publication. July 27, 1988.

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** นิสิตปริญญาโท สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี 1973 Bishop[1] ได้ใช้กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน ตรวจพบอานุภาคไวรัสในผนังของลำไส้เล็กของผู้ป่วยเด็กที่มีอาการอุจจาระร่วง ไวรัสนี้ได้ชื่อว่าไวรัสโรตาเป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงในเด็ก การแยกเชื้อไวรัสโดยเพาะเลี้ยงในเซลล์คัลเจอร์ทำได้ยาก[2] และไม่แสดงลักษณะ CPE ที่ดี วิธีการตรวจไวรัสนี้ส่วนมากเป็นวิธีการอาศัยปฏิกิริยาของแอนติเจน แอนติบอดีย์ เช่น immunoelectron microscopy (IEM)[3] immunoelectro osmophoresis (IEP)[4], immunofluorescence (IF)[5], radioimmunoassay (RIA)[6], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[7,8], reversed passive hamagglutination (RPHA)[9] และวิธี latex agglutination (LA)[10]

วิธี RIA,ELISA ได้รับการพิสูจน์ว่ามีความไวและความเที่ยงตรงเทียบเท่ากับวิธี EM หรือ IEM[11] และวิธี LA, RPHA และ EM ก็ให้ผลใกล้เคียงกัน[10] วิธี LA นั้นทำง่ายใช้เวลาสั้น ปัจจุบันน้ำยาที่ใช้เป็นน้ำยาสำเร็จรูปที่มีขายตามท้องตลาด ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในสถานที่ไกล ๆ ที่ไม่อาจจะมีบริการตรวจหาไวรัสโรตาโดยวิธีอื่น ๆ แต่มีข้อเสียคือน้ำยานี้มีราคาแพง ประมาณ 70 บาทต่อการตรวจ 1 ครั้ง

การใช้น้ำยาสำเร็จรูปโดยวิธี LA นั้น ตาม direction จะใช้น้ำยา 50 ul ให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างอุจจาระแขวนลอย (suspension) ปริมาตร 50 ul ถ้าหากเราสามารถพิสูจน์ว่าเมื่อลดปริมาณน้ำยาและตัวอย่างอุจจาระลงแล้วให้ผลดีเท่าเดิมก็น่าจะมีประโยชน์ยิ่งขึ้นโดยสามารถลดค่าใช้จ่ายลง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระโดยวิธี LA โดยลดปริมาณน้ำยาของวิธี LA ลงเหลือ 20 ul เรียกว่า Mini-LA เปรียบเทียบผลกับวิธี ELISA

วัสดุ

อุจจาระ อุจจาระที่นำมาตรวจเปรียบเทียบ เป็นอุจจาระที่ส่งมาจากภาควิชากุมารเวชศาสตร์จำนวน 300 ราย

น้ำยา LA สำเร็จรูป ใช้ Rotalex ของ ORION DIAGNOSTICA

ELISA เป็นวิธีการตรวจที่ใช้ตรวจประจำในห้องปฏิบัติการไวรัส ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย[12] ซึ่งใช้วิธี double antibody sandwich ELISA และควบคุมการทดสอบ โดยใช้ normal rabbit immunoglobulin fraction เป็นตัวจับปฏิกิริยา nonspecific reaction

วิธีการ

อุจจาระที่นำมาตรวจ ทำเป็น 10% suspension โดยใช้ PBS ผสมให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่นที่ 2500 RPM ที่ 4°C นาน 10 นาที เอาน้ำใสส่วนบนมาตรวจโดยวิธีทั้งสอง โดยเจ้าหน้าที่ 2 คน แยกตรวจคนละวิธี

การตรวจโดยวิธี LA ใช้ตัวอย่างอุจจาระ 20 ul หยดลงบน test slide 2 หลุม ๆ ละ 1 หยด แล้วหยด Rotalex reagent (anti-rotavirus coat latex) ลงในหลุมแรกและหยด Rolatex control (normal rabbit immunoglobulin coat latex) ลงในหลุมที่ 2 โดยใช้ปริมาตรเท่ากันกับตัวอย่างคือ 20 ul ผสมให้เข้ากัน อ่านผลภายใน 2 นาที

การอ่านผลและแปลผล

ต้องอ่านผล agglutination ของทั้งสองหลุมพร้อมกันและแปลผลดังนี้

Rotalex reagent	Rotalex control	Result
−	−	negative
+	−	positive
− or +	+	non specific agglutination

+ = agglutination จะเห็น Latex มาเกาะกลุ่มมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

− = non agglutination จะเห็น Latex ขุ่นขาวเหมือนเดิม

การตรวจโดยวิธี ELISA ใช้วิธีการและการแปลผลตามวิธีที่ใช้ประจำในห้องปฏิบัติการไวรัส[12]

การตรวจและแปลผลของแต่ละวิธีแยกทำโดยเจ้าหน้าที่ 2 คน ซึ่งมีความชำนาญเฉพาะวิธี และไม่ทราบผลของกันและกัน ตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันจะถูกนำมาตรวจโดยวิธี LA มาตรฐาน โดยใช้ปริมาณน้ำยา 50 ul ตาม direction ที่แนะนำมาพร้อม kit

ผลการทดลอง

การตรวจเปรียบเทียบโดยวิธีทั้ง 2 ในตัวอย่างอุจจาระ 300 ราย ได้ผลดังนี้

1. วิธี Mini-LA ให้ผลคล้อยตามวิธี ELISA จำนวน 291 ราย คิดเป็นร้อยละ 97
   - เป็นผลบวกเหมือนกัน 35 ราย
   - เป็นผลลบเหมือนกัน 256 ราย
2. Mini-LA เกิด nonspecific 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 1
3. Mini-LA ให้ผลตรงข้ามกับ ELISA 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 2
   - เป็น False positive 1 ราย
   - False negative 5 ราย

4. อุจจาระที่เกิด nonspectific agglutination และที่ให้ผลแตกต่างจาก ELISA จำนวน 9 รายนี้ได้นำมาตรวจซ้ำและตรวจโดยวิธี LA แต่ใช้จำนวนน้ำยาตามมาตรฐาน คือ 50 ul พบว่าได้ผลเหมือนเดิมทุกตัวอย่าง

วิจารณ์

ได้ทดลองตรวจอุจจาระโดยวิธี Mini-LA ซึ่งลดปริมาณของน้ำยาลงจาก 50 ul เหลือ 20 ul แล้วเปรียบเทียบผลกับวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ประจำในห้องปฏิบัติการไวรัส ซึ่งมีความไวร้อยละ 94.7 และความจำเพาะร้อยละ 96.1[12] พบว่าการตรวจโดยวิธี Mini-LA ได้ผลดียิ่ง คือให้ผลเหมือนวิธี ELISA ร้อยละ 97.0 (291/300) ให้ผลต่างกันร้อยละ 2.0 (6/300) และเกิด nonspecific agglutination ร้อยละ 1.0 (3/300)

ตัวอย่างที่ให้ผลต่างกัน ได้นำมาทดสอบโดยวิธี LA ใช้ปริมาณน้ำยาเท่ากับที่บริษัทแนะนำให้ใช้คือ 50 ul ก็ยังคงได้ผลเหมือนกับที่ใช้น้ำยาปริมาณ 20 ul ซึ่งแสดงว่าแม้จะใช้น้ำยา 50 ul ก็ไม่ทำให้ได้ผลดีไปกว่าการใช้น้ำยา 20 ul นั่นคือการลดปริมาณลงไม่ทำให้ผลการตรวจเปลี่ยนไป

การที่เลือกใช้ปริมาณ 20 ul เนื่องจากได้ทดลองใช้น้ำยาสำเร็จรูปปริมาณต่าง ๆ กันคือ 50,40,30,20,15 และ 10 ul ให้ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างอุจจาระปริมาณเท่ากันที่ทราบว่ามีและไม่มีโรตาไวรัส พบว่าเกิด agglutination หรือให้ผลบวกกับตัวอย่างที่มีไวรัสโรตา และไม่เกิดผลบวกกับตัวอย่างที่ไม่มีไวรัส ซึ่งการอ่านผลจะอ่านได้ชัดเจนเท่ากันทุกปริมาณที่ใช้ แต่เลือกใช้ 20 ul เพราะเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด ไม่น้อยเกินไป ในกรณีที่อาจมีการระเหยของน้ำยาขณะทำการตรวจในที่มีลมโกรกแรงก็จะไม่เกิดความเสียหายต่อการอ่านผล และเมื่อทำการทดสอบกับตัวอย่างอุจจาระจำนวน 300 ราย ได้ผลดังที่รายงานนี้

การใช้ LA นั้น เหมาะกับการตรวจวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงจากไวรัสโรตา เนื่องจากในระยะ 1-3 วันแรกของโรค ผู้ป่วยจะขับไวรัสออกมาเป็นจำนวนหลายล้านตัวต่ออุจจาระหนัก 1 กรัม[13,14] ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการนำวิธี LA มาใช้ ถ้านำเอาวิธี LA นี้มาตรวจตัวอย่างที่มีเชื้ออยู่น้อย เช่นในน้ำไขสันหลัง จากโรคสมองอักเสบจะทำให้ได้ผลการตรวจต่ำ การจะนำ LA มาใช้เป็นวิธีตรวจจึงต้องพิจารณาดูธรรมชาติของโรคว่าน่าจะให้ผลการตรวจไวเพียงใด อาจจะเหมาะกับบางโรค และไม่เหมาะกับบางโรค

ข้อเสียของ LA คือต้องการผู้อ่านที่ชำนาญ ซึ่งการทดสอบนี้ถ้าทำโดยเจ้าหน้าที่ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญในด้านปฏิบัติการและการอ่านผล เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับวิธีการและการอ่านผล จะได้ผลต่างกัน แต่เป็นข้อเสียที่แก้ไขได้

ได้มีรายงานการใช้ LA ตามวิธีมาตรฐานตรวจหาไวรัสโรตาในอุจจาระเปรียบเทียบกับวิธี ELISA โดยแพทย์ประจำบ้าน[15] ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีความไว 83.3% และความจำเพาะ 90.3% และอีกหลายรายงานได้ความไวของการตรวจอยู่ระหว่าง 69.4-88.0[16-18] และความจำเพาะ 97.2%[16] และ 100%[17] ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ใช้ LA ที่เป็นของ commercial kit (Rotalex)

ส่วนวิธี Mini-LA ของเราได้ความไว 87.5% ความจำเพาะ 99.6% ซึ่งไม่ด้อยกว่าผลการตรวจโดยวิธี LA มาตรฐาน

ในการเตรียมอุจจาระนั้น ถ้าทำตาม direction ซึ่งแนะนำให้ใช้ขวดเก็บอุจจาระสำเร็จรูป เป็นขวดที่มี filter และน้ำยาละลายอุจจาระ จะได้ผลบวกน้อยลง เนื่องจากการกระจายของอุจจาระไม่เป็นเนื้อเดียวกันอีกทั้งมักจะมีกาก

อุจจาระมาอุดตันบริเวณ filter ทำให้การนำเอา filtrate มาใช้ค่อนข้างลำบาก ทำให้การทดสอบได้ผลต่ำ เมื่อเทียบกับการเขย่าอุจจาระในหลอดแก้วซึ่งการกระจายตัวสม่ำเสมอ และปั่นเอาน้ำใสส่วนบนมาใช้ ซึ่งสะดวกและได้ผลดีมากกว่า เครื่องมือดังกล่าวนี้ก็มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป จึงไม่เป็นปัญหาทางปฏิบัติการ การใช้ขวดที่จำหน่ายโดยบริษัทก็จะสิ้นเปลืองโดยใช่เหตุ และให้ผลการตรวจที่ด้อยกว่า

วิธี LA มีข้อดีคือมีการควบคุมการทดลองโดยใช้ Latex ที่เคลือบด้วย normal rabbit immunoglobulin ปฏิกิริยา agglutination ที่เกิดจาก nonspecific reaction จะไม่ถูกอ่านเป็นผลบวก จะสามารถรู้ว่าเป็น false positive ซึ่งถ้าเกิดกรณีเช่นนี้ ต้องอาศัยการตรวจโดยวิธีอื่น เช่นวิธี ELISA

วิธี Mini-LA ที่ลดปริมาณนี้ ให้ผลการตรวจไม่ด้อยกว่าวิธี LA มาตรฐาน ดังที่ได้รายงานมาแล้ว และค่าความไว ความจำเพาะได้สูงกว่าบางรายงาน ซึ่งอาจจะเกิดจากความชำนาญในการตรวจและการแปลผลที่ต่างกัน ทุกรายงานที่เสนอพบว่าวิธี LA มีความจำเพาะสูง แต่มีความไวต่ำกว่า ELISA การที่มีความจำเพาะสูง ถ้าได้ผลบวก จะเป็นผลที่เชื่อถือได้ จะเป็นผลบวกจริง แต่ถ้าได้ผลลบ ก็ควรจะตรวจโดยวิธีอื่นเพิ่มเติม จึงเป็นวิธีที่เหมาะที่จะใช้ตรวจเบื้องต้นในการวินิจฉัยโรคอุจจาระร่วงของผู้ป่วยเด็กเล็ก ที่ต้องการทราบผลโดยเร็ว หรือใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาที่มีตัวอย่างศึกษาเป็นจำนวนมาก หรือใช้ในโรงพยาบาลที่อยู่ห่างไกลชุมชน ในห้องฉุกเฉินที่ต้องการรู้ผลไว หรือในคลินิกแพทย์ เพราะเป็นการตรวจที่ทำได้ง่าย รู้ผลเร็ว มีความจำเพาะสูง และราคาไม่แพง เมื่อลดปริมาณน้ำยาลงเช่นนี้

สรุป

ได้ทดลองตรวจไวรัสโรตาโดยวิธี Mini-LA โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปในปริมาณที่น้อยกว่าที่กำหนดเปรียบเทียบกับการตรวจโดยวิธี ELISA ทำการตรวจในอุจจาระของเด็กจำนวน 300 ราย พบว่าวิธี Mini-LA นี้ให้ผลเหมือนกับ ELISA ร้อยละ 97.0 (291/300) ให้ผลต่างกันร้อยละ 2 (6/300) และเกิด nonspecific reaction ร้อยละ 1 (3/300)

เมื่อตรวจตัวอย่างที่ให้ผลต่างกัน 9 รายนั้นด้วยวิธี LA ที่ใช้จำนวนน้ำยา 50 ul ตามมาตรฐาน ก็ได้ผลเหมือนเดิม การตรวจโดยวิธีนี้ เมื่อคำนวนทางสถิติ เปรียบเทียบกับวิธี ELISA จะมีความไวร้อยละ 87.5 ความเที่ยงตรงร้อยละ 99.6

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์นายแพทย์กวี ภู่ไพบูลย์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ที่ได้จัดส่งอุจจาระของเด็กอ่อนที่ใช้ในการศึกษานี้

อ้างอิง

1. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis, Lancet 1973 Dec 8; 2(7841) : 1281-1283
2. Ryder RW, McGowan JE, Hatch MH, Palmer EL. Reoviruslike agent as a cause of nosocomial diarrhea in infants. J Pediatr 1977 May; 90(5) : 698-702
3. Steinhoff MC, Gerber MA. Rotavirus infections of neonates. Lancet 1978 Apr 8; 1(8067) : 775
4. Spence L, Fauvel M, Petro R. Comparison of counter immunoelectrophoresis and electron microscopy for laboratory diagnosis of human reovirus-like agent-associated infantile gastroenteritis. J Clin Microbiol 1977 Feb; 5(2) : 248-249
5. Yolken RH, Wyatt RG, Kalica AR, Kim HW, Brandt CD, Parrott RH, Kapikian AZ, Chanock RM. Use of a free viral immunofluorescence assay to detect human reovirus-like agent in human stools. Infect Immun 1977 May; 16(2) : 467-470
6. Middleton PJ, Holdaway MD, Petric M, Szymanski MT, Tam JS. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. Infect Immun 1977 May; 16(2) : 439-444
7. Ellens DJ, de Leeuw PW. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. J Clin Microbiol 1977 Nov; 6(5) : 530-532
8. Banatvala JE, Tottlerdell B, Chrystie IL, Woode GN. In-vitro detection of human rotaviruses. Lancet 1975 Oct 25; 2(7939) : 821

9. Sanekata T, Yoshida Y, Oda K. Detection of rotavirus from faeces by reserved passive haemagglutination method. J Clin Pathol 1979 Sep; 32(9) : 963
10. Sanekata T, Yoshida Y, OKada H. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. J Immunol Methods 1981; 41(3) : 377-385
11. Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A, Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools : comparison with electron-microscopy, immunoelectro-osmophoresis, and fluorescent antibody techniques. J Med Virol 1981; 7(1) : 29-40
12. วรรณา พรรณรักษา, จินตนา วุฑฒยากร. การตรวจไวรัสโรตาในอุจจาระโดยวิธีรวดเร็ว จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2531 ตุลาคม; 32(10) : 873-878
13. Steinhoff MC. Rotavirus; the first five year. J Pediatr 1980 Apr; 96(4) : 611-622
14. Banatvata JE. Viruses and diarrhea. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979; 73(5) : 503-508
15. กัณฐากรณ์ สุรเบ็ญจวงศ์, วรรณา พรรณรักษา. การวินิจฉัยโรคท้องเสียจากโรตาไวรัสด้วยวิธี Latex agglutination test ผลงานเสนอในที่ประชุมวิชาการประจำปี 2531, คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 14-18 มีนาคม 2531.
16. Sambourg M, Goudeau A, Courant C, Pinon G, Denis F. Direct appraisal of latex agglutination testing, a convenient alternative to enzyme Immunoassay for detection of rotavirus in childhood gastroenteritis, by comparison of two enzyme immunoassays and two latex tests. J Clin Microbiol 1985 Apr; 21(4) : 622-625
17. Brandt CD, Arndt CW, Evans GL, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, Parrott RH. Evalvation of a latex test for rotavirus detection. J Clin Microbiol 1987 Sep; 25(9) : 1800-1802
18. Morinet F, Ferchal F, Colimon R, Perol Y. Comparison of six methods for detecting human rotavirus in stools. Eur J Clin Microbiol 1984 Apr; 3(2) : 136-140