

บทนำ

Japanese encephalitis หรือโรคไข้สมองอักเสบเจอี เป็นโรคที่เกิดจาก Japanese encephalitis virus (JEV) ติดต่อมาสู่คนโดยมียุงในตระกูล Culex เป็นพาหะ (1) โดยทั่วไปแม้ว่าอัตราการเกิด subclinical infection จะพบได้มากกว่าการติดเชื้อโดยปรากฏอาการสมองอักเสบก็ตาม แต่อัตราการป่วยตายจากโรคนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2523-2532 เฉลี่ยสูงถึงร้อยละ 15(2) โรคนี้พบได้ทั่วไปในหลายประเทศ ตั้งแต่คาบสมุทรเกาหลีจนถึงบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน มาเลเซีย อินเดีย พม่า และไทย(3) ในประเทศไทยพบโรคนี้ระบาดมากที่สุดที่ภาคเหนือ รองลงมาได้แก่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยจะพบผู้ป่วยได้ตลอดทั้งปี แต่จำนวนผู้ป่วยจะสูงสุดในฤดูฝน(2)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปมักอาศัยการตรวจหาการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีในเซรัมหรือในน้ำไขสันหลังด้วยวิธี hemagglutination inhibition (HI) test ซึ่งมักจะแปลผลยากเนื่องจากมีปฏิกิริยาข้ามพวกกับโรคไข้เลือดออก(4) Bruke และคณะ(5) จึงได้พัฒนาวิธี JE Mac ELISA ขึ้นมาสำหรับใช้ตรวจหา IgM ในน้ำไขสันหลังและในเลือดผู้ป่วย วิธีนี้สามารถตรวจหา IgM ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยในวันแรกรับเข้ารักษาได้สูงถึงร้อยละ 80 ของผู้ป่วยสมองอักเสบทั้งหมด จึงจัดเป็นวิธีที่มีความจำเพาะและแม่นยำสูงมาก อีกทั้งสามารถทำการทดสอบเสร็จได้ในเวลาอันรวดเร็วภายใน 5 ชั่วโมง แต่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือบางอย่างที่มีราคาแพง อีกทั้งน้ำยาและสารบางอย่างที่ใช้ราคาแพง ห้องปฏิบัติการส่วนภูมิภาคหลาย ๆ แห่งอาจไม่สามารถเปิดบริการการตรวจได้ จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยด้วยวิธี JE Mac ELISA กับวิธี HI ซึ่งเป็นวิธีที่ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคหลายแห่งเปิดบริการอยู่แล้วสำหรับช่วยในการวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกตามกำหนดขีดความสามารถมาตรฐานงานขั้นสูงทางห้องปฏิบัติการของกระทรวงสาธารณสุข

วัตถุประสงค์

เพื่อหาระดับต่ำสุดของ HI antibody titer ในน้ำไขสันหลังที่เจาะเพียงครั้งเดียว สำหรับ
ช่วยยืนยันการวินิจฉัยโรคไข้มองอีกเสบเจอีได้โดยมีความจำเพาะและความไวสูง

วิธีการวิจัย

1. **ส่งตรวจ** ได้แก่ น้ำไขสันหลังของคนไข้เด็ก และผู้ใหญ่ จำนวน 94 ราย ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแพทย์ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามีอาการสมองอักเสบ
2. **Hemagglutination inhibition (HI) test** โดยใช้วิธีของ Clarke และ Casals (6) กล่าวโดยย่อคือ ตกตะกอนแอนติบอดีและกำจัด nonspecific agglutinator และ inhibitor ในน้ำไขสันหลังก่อนด้วยเม็ดเลือดแดงห่านและด้วยอะซีไคนอตราส่วนน้ำไขสันหลัง : อะซีไคน เท่ากับ 1:10, เจือจางแอนติบอดีด้วย 0.4% borate saline pH 9.0 หลังจากเติม JE-Ag (JarGar # 01 suckling mouse brain antigen -กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข) ประมาณ 8 HA unit เพื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน แล้วจึงเติม 8% เม็ดเลือดแดงห่านที่เจือจาง 1:23 ด้วย bovine albumin borate saline pH 6.6 อบที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมงอ่านผลโดยระดับแอนติบอดีไตเตอร์ หมายถึง dilution ของน้ำไขสันหลังที่เจือจางมากที่สุดที่ยังสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงห่านได้อย่างสมบูรณ์ ในการตรวจแต่ละครั้งใช้ positive control และ negative control ทดสอบควบคู่ไปด้วย
3. **JE Mac ELISA** โดยวิธีของ Burke และคณะ (5) กล่าวโดยย่อคือ specific IgM ในสิ่งส่งตรวจจะจับกับ goat anti-human heavy chain (Behring R) ซึ่งถูก coat อยู่บน polystyrene microtiter flatted-bottom plate แล้วจึงเติม JEV antigen และ anti-JEV globulin conjugated peroxidase (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ) ทำให้เกิดสีด้วยการเติม orthophenylenediamine substrate (Sigma R) หยุดปฏิกิริยาและอ่านผลด้วยตาเปล่าก่อน แล้วจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microtiterplate ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ผลการทดสอบเป็นบวกเมื่อความเข้มของสี, ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับหรือมากกว่า weak positive control
4. **Control Positive และ negative control** สำหรับการทดสอบวิธี HI ได้แก่ น้ำไขสันหลังของคนไข้ที่มีระดับแอนติบอดีเท่ากับ 20 และน้อยกว่า 20 ตามลำดับ สำหรับวิธี JE MacELISA ได้แก่ strong positive, weak positive และ negative control serum (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารฝ่ายสหรัฐ)

ผลการวิจัย

จากการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ HI titer ด้วยวิธี JE Mac ELISA และวิธี HI ในน้ำไขสันหลังของคนที่จำนวน 94 ราย พบว่า 21 ราย (ร้อยละ 22) ให้ผลบวกต่อการตรวจหา specific IgM โดย 6 ใน 21 รายนี้ ให้ผลการตรวจวัดระดับ HI titer น้อยกว่า 20 และคนที่ 73 ราย ที่ให้ผลการตรวจหา IgM เป็นลบนั้น พบว่า 2 ราย มีระดับ HI titer เท่ากับ 20 ส่วนคนที่รายอื่น ๆ ที่มีระดับ HI titer เท่ากับหรือมากกว่า 40 นั้น ให้ผลการตรวจ IgM เป็นบวกทั้งหมด การกระจายของระดับ HI titer ในน้ำไขสันหลังที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการตรวจหา IgM แสดงในตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบผล sensitivity และ specificity ของการวินิจฉัยโรคไข้สมองอักเสบ ด้วยวิธีการตรวจวัดระดับ HI titer ในน้ำไขสันหลังครั้งเดียวเมื่อแรกเริ่ม โดยใช้เกณฑ์การตรวจวัดระดับ IgM ในน้ำไขสันหลังเป็นมาตรฐาน พบว่าเมื่อเลือกใช้ระดับ HI titer เท่ากับ 20 เป็นเกณฑ์ตัดสินโรคแล้ว ความไวและความจำเพาะของการวินิจฉัยเท่ากับ 71% และ 97% ตามลำดับ และหากใช้เกณฑ์ HI titer ที่มากขึ้นกว่านี้ความไวของการวินิจฉัยลดลงเป็น 52%, 43%, 38% และ 24% แต่ความจำเพาะจะเพิ่มเป็น 100% ที่ระดับ HI titer เท่ากับ 40, 80, 160 และ 320 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและประวัติของคนที่อยู่ในรายที่ผลการตรวจระดับ HI titer ไม่สอดคล้องกับผลการตรวจหา IgM แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ผลการตรวจหา HI titer และ IgM ในน้ำไขสันหลังที่เจาะครั้งเดียวเมื่อแรกรับคนไข้ 94 ราย

HI titer	Number of Patients indicated IgM Ab		Total Number
	Positive	Negative	
< 20	6	71	77
20	4	2	6
40	2	0	2
80	1	0	1
160	3	0	3
320	2	0	2
640	1	0	1
1280	1	0	1
2560	0	0	0
5120	1	0	1
Total	21	73	94

ตารางที่ 2 Sensitivity และ Specificity ของการวินิจฉัยโดยใช้ระดับ HI titer ต่าง ๆ

ระดับ HI titer	Sensitivity (%)	Specificity (%)
< 20	100	0
20	71	97
40	52	100
80	43	100
160	38	100
320	24	100

ตารางที่ 3 ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและประวัติของไข้ในรายที่ผลการตรวจหาระดับ
HI titer ไม่สอดคล้องกับผลการตรวจหา IgM *

patient NO.	Age (yrs)	Clinical diagnosis	onset (day)	admission Date	ผลการตรวจ CSF **						IgM	HI titer
					Protein (mg/dL)	Sugar	PMN	L	M	R		
D 58	5	Encephalitis	3	Aug	20.0	63.0	-	3	-	-	P	< 20
D 46	16	Encephalitis	4	Jul	73.0	72.0	-	7	-	120	P	< 20 [#]
D 21	9	Encephalitis	5	Jul	45.0	80.0	-	56	-	10	P	< 20
D 52	18	Viral encephalitis	5	Aug	94.0	72.0	7	280	-	-	P	< 20
D 456	32	Viral encephalitis	14	Jul	152.0	32.5	5	594	-	-	N	20 ^{\$}

* ค่าปกติของโปรตีนในน้ำไขสันหลัง = 15-45 mg/dL, น้ำตาล = 60-75 mg/dL

HI titer ครั้งที่ 2 = 80 (เจาะห่างจากครั้งแรก 5 วัน)

\$ ถึงแก่กรรมในวันที่ 19 ของการป่วย

** PMN = Polymorphonuclear leukocytes, L=Lymphocytes, M=Monocytes,
R=Red blood cells



บทวิจารณ์

ในประเทศไทย โรคไข้สมองอักเสบมีอัตราป่วยตายประมาณร้อยละ 10-20 โดยคนไข้มักจะเสียชีวิตภายในสัปดาห์แรกของการป่วย (7) การแยกเชื้อไวรัสจากน้ำไขสันหลังมีโอกาสดตรวจพบได้น้อยมาก ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธีที่รวดเร็วและเชื่อถือได้จึงมีความสำคัญและสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ดีกว่า วิธีการดังกล่าว เช่น การตรวจหา specific IgM antibodies ในเลือดหรือ ในน้ำไขสันหลังของคนไข้ ซึ่งวิธีการนี้แม้จะมีความไวของการทดสอบ (sensitivity) ต่ำมาก แต่ก็ยังมีข้อจำกัดของการตรวจอยู่บ้าง กล่าวคือ ในวันแรกรับคนไข้เข้ารักษาในโรงพยาบาลนั้น สามารถตรวจพบ specific IgM ในน้ำไขสันหลังของคนไข้เพียงร้อยละ 68 และเพิ่มเป็นร้อยละ 100 ในวันที่ 7 แล้วจึงลดลงเหลือร้อยละ 95 และ 72 ในวันที่ 30 และ 180 ตามลำดับ (8) นอกจากนี้วิธีการตรวจชนิดนี้ต้องใช้เครื่องมือบางอย่างที่ราคาแพง ห้องปฏิบัติการขนาดเล็กบางแห่งอาจไม่สามารถให้บริการตรวจได้

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบ การตรวจหาแอนติบอดีด้วยวิธี HI กับวิธี JE Mac ELISA พบว่าหากใช้เกณฑ์การพบ HI titer เท่ากับ 20 ในน้ำไขสันหลังที่เจาะครั้งเดียวเมื่อแรกรับคนไข้เพื่อวินิจฉัยโรคแล้วความไวและความจำเพาะของการทดสอบเท่ากับ 71% และ 97% ตามลำดับ ค่าความไวของการทดสอบจะลดลงโดยลำดับ ส่วนค่าความจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 100% เมื่อใช้การตรวจพบ HI titer มากกว่า 20 เป็นเกณฑ์การวินิจฉัยแยกโรค ดังนั้นเกณฑ์ที่เหมาะสมที่สุดเมื่อพิจารณาจากตารางแล้วจึงเท่ากับ 20

สำหรับคนไข้ 4 ราย ที่ผลการตรวจ specific IgM เป็นบวก แต่ตรวจไม่พบระดับ HI titer ในน้ำไขสันหลังนั้น มี 1 ราย ที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีเป็น 4 เท่าในช่วงเวลาที่ห่างจากการเจาะครั้งแรก 5 วัน ส่วน 3 ราย ที่เหลือแพทย์ไม่เจาะไขสันหลังส่งตรวจซ้ำอีก แต่อย่างไรก็ตามคนไข้ทั้ง 4 รายมีระยะเวลาเริ่มป่วยไม่เกิน 1 สัปดาห์ทั้งสิ้น ซึ่งจากการศึกษาของ Burke และคณะ (8) ได้รายงานไว้ว่า ไม่สามารถตรวจพบ HI titer ในน้ำไขสันหลังของคนไข้สมองอักเสบเจอีได้เลยในวันแรกรับเข้ารักษา แต่อัตราการตรวจพบเพิ่มเป็น 33% ในวันที่ 30 และลดลงจนตรวจไม่พบอีกเลยในวันที่ 180 ซึ่งตามประวัติคนไข้ทั้ง 4 รายมีระยะเวลากการเริ่มป่วยภายใน 1 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่สามารถตรวจพบ specific IgM ได้ แต่ยังตรวจไม่พบด้วยวิธี HI นั้น เป็นเพราะวิธี HI มีความไวของการทดสอบต่ำกว่าและคนไข้ทั้ง 4 รายมีอาการป่วยอยู่ในช่วงเดือนที่พบโรคนี้ได้ชุกชุม คือ เดือนกรกฎาคม และสิงหาคม มีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี และร้อยเอ็ด ซึ่งตามรายงานของกระทรวงสาธารณสุข (2) พบว่าจังหวัดเหล่านี้เป็นเขตที่สามารถพบโรคนี้ได้ชุกชุม ดังนั้นเพื่อเพิ่มความไวของการวินิจฉัยแยกโรค ในกรณีที่ไม่พบ HI titer ในน้ำไขสันหลังเมื่อแรกรับ แต่คนไข้มีอาการป่วยในช่วงเดือนที่เป็นฤดูชุกชุมของโรค จึงน่าจะได้เจาะไขสันหลังตรวจซ้ำอีกครั้ง เพื่อการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดี

จากการศึกษาของ Burke และคณะ (7) ในคนไข้สมองอักเสบเจอี พบว่าในรายที่แยกเชื้อได้จากน้ำไขสันหลังและถึงแก่กรรมนั้น ทั้งหมดมี specific IgM ทั้งในเลือดและน้ำไขสันหลังอยู่ในระดับต่ำกว่าเกณฑ์ที่ตัดสินว่าให้ผลบวก และจากการศึกษาของ Calisher และคณะ (9) ในโรค eastern equine encephalitis (EEC) และ western equine encephalitis (WEE) พบว่า คนไข้ 2 ราย จากจำนวน 3 ราย ที่ผลการตรวจด้วยวิธี HI, การตรวจหาระดับ IgG และการตรวจอื่น ๆ ยืนยันว่ามีการติดเชื้อ WEE นั้นตรวจไม่พบระดับ specific IgM เลยในช่วงวันที่ 4-วันที่ 55 ของการป่วย จากการศึกษารังนี้พบว่าคนไข้ 1 ราย ที่ตรวจไม่พบ specific IgM ในน้ำไขสันหลังเมื่อแรกรับ แต่ตรวจพบระดับ HI titer เท่ากับ 20 ผลเคมีวิเคราะห์และการนับแยกชนิดเซลล์ในน้ำไขสันหลังเข้าได้กับการติดเชื้อไวรัส ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่พบเชื้อสาเหตุอื่นทั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา คนไข้รายนี้มีระยะเวลาเริ่มป่วยมานาน 14 วัน ซึ่งอาจเป็นช่วงระยะเวลาที่ระดับ specific IgM ลดลงจนตรวจไม่พบ หรือคนไข้อาจสร้างแอนติบอดีได้ไม่ดี ระดับ specific IgM จึงต่ำ ต่อมาเมื่อเข้าสู่ระยะ late infection จึงเริ่มตรวจพบ HI titer ระดับต่ำเท่ากับ 20 ซึ่งในที่สุดคนไข้รายนี้ก็ถึงแก่กรรม สันนิษฐานว่าแอนติบอดีซึ่งมีบทบาทช่วยกำจัดไวรัสจากน้ำไขสันหลังนั้นมีระดับต่ำจนไม่สามารถกำจัดไวรัสได้หมด ดังการศึกษาของ Hammon (10) พบว่าหากให้ passive immunity แก่หนูก่อน แล้วจึงฉีด JEV เข้าสู่ช่องท้อง จะช่วยทำให้หนูรอดชีวิตได้