การเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ non-structural protein ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

Comparison of the sensitivity and specificity of the commercial non-structural protein ELISA kits available in Thailand for detecting the antibodies to the foot and mouth disease virus

กิ่งกานต์ บุญสุยา สีโย* อมรรัตน์ ชุณศาสตร์ จีรนันท์ โชติทิฆัมพร

Kingkarn Boonsuya Seeyo* Amonrat Choonnasard Jeeranant Chottikamporn

Abstract

Backgrounds: For the control and prevention of foot and mouth disease, it is essential to use an appropriate ELISA test kit to detect antibodies to the Non-Structural-Protein (NSP) of foot and mouth disease virus to distinguish between vaccinated animals and naturally infected animals with foot and mouth disease. Currently, various NSP ELISA test kits that can detect the antibodies to the foot and mouth disease virus have been available in Thailand. Therefore, the necessary selection of the efficiency of the appropriated NSP test kit can be tested on various animal serums within the country. That should be a study on the sensitivity and specificity of the NSP ELISA test kit. This information obtained from the study can be used for consideration in selecting the appropriate NSP ELISA test kits and achieving maximum benefits.

Methods: The study was conducted using six ELISA kits sold in Thailand including BioVet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK®, and KUcheck-F. The examination of 800 serum samples which were divided into cattle and buffalo serum samples from the outbreak areas and swine serum from the Vaccine Quality Control Unit of the Bureau of Veterinary Biologics, a total of 400 serum samples of foot and mouth disease virus infected were confirmed by ELISA Typing or RT-PCR as a positive control serum. In addition, the negative control serums were brought from Japan and Australia, which have been certified free of foot and mouth disease from WOAH coordinated, a total of 400 samples for use as a negative control serum. The sera were used to analyze the sensitivity and specificity of the test kits. All serum samples were stored at -20 °C until testing. The determination of the sensitivity and specificity had been studied by the ANOVA at 95% confidence level for concordance with Cohen's kappa analysis and for diagnostic accuracy of the assay.

Results: From studies on the sensitivity, specificity, consistency, and accuracy of the NSP ELISA test kits, found that the sensitivity was 97.50%-99.00%, specificity was 97.25%-100.00%, consistency was 0.96-0.99, and accuracy was 98.12%-99.75%.

Conclusion: This study of all six NSP ELISA test kits found that sensitivity and specificity were statistically similar and significant. In addition, it was found to be consistent, and the accuracy was within the reliable criteria. It showed that they could be used interchangeably. Therefore, the results of this study can be used as information for deciding to use the test kit. This allows the Department of Livestock Development can procure a wider variety of test kits and use them as a guideline to increase alternatives to use more NSP ELISA kits released in the market.

Keywords: foot and mouth disease virus, non–structural protein, sensitivity, specificity

Regional Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease in South-East Asia 1213/1 Moo 11, Pakchong, Nakhon Ratchasima 30130, Thailand
*Corresponding author: Tel. 0979299154 e-mail: kingkarn.bs3244@hotmail.co.th
ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ 1213/1 หมู่ 11 ปากช่อง นครราชสีมา 30130 ประเทศไทย
*ผู้เขียน/ผู้รับผิดชอบ: โทรศัพท์ 0979299154 อีเมล: kingkarn.bs3244@hotmail.co.th

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: ในการควบคุมและป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อย จำเป็นจะต้องใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติบอดีต่อ nonstructural-protein (NSP) ของไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย เพื่อตรวจแยกแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยที่ได้ระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีน และสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ โดยในปัจจุบันมีหลากหลายชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ทั้งนี้ชุดทดสอบที่ใช้จะต้องมีความเหมาะสมกับซีรัมสัตว์หลายชนิดของประเทศ จึงเห็นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ โดยใช้ซีรัมสัตว์ภายในประเทศ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะสามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาเลือกชุดทดสอบให้เหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

วิธีการ: ทำการศึกษาโดยใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่จำหน่ายในประเทศไทยจำนวน 6 ชุดทดสอบได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F สำหรับตรวจตัวอย่างซีรัมจำนวน 800 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ซีรัมควบคุมบวก จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรัมโค กระบือจากพื้นที่ที่เกิดการระบาด และซีรัมสุกรจากงานทดสอบคุณภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ ที่ได้รับการยืนยันว่าติดเชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี ELISA Typing หรือวิธี RT-PCR และซีรัมควบคุมลบ จำนวน 400 ตัวอย่าง ได้แก่ ซีรัมโค แพะ และสุกร ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากประเทศญี่ปุ่นและออสเตรเลีย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้รับการรับรองการปลอดโรคปากและเท้าเปื่อยจาก World Health Organisation for Animal Health (WOAH) โดยตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดสอบ เพื่อใช้ในการหาค่าความไวและความจำเพาะ และนำมาเปรียบเทียบด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ความสอดคล้องโดยการหาค่า Cohen's kappa และความแม่นยำโดยการหาค่า diagnostic accuracy

ผล: จากการศึกษาเกี่ยวกับความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้อง และค่าความแม่นยำของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีค่าความไว 97.50%-99.00% ความจำเพาะ 97.25%-100.00% ความสอดคล้อง 0.96-0.99 และความแม่นยำ 98.12%-99.75%

สรุป: จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าชุดทดสอบ ELISA ที่ในการศึกษา จำนวน 6 ชุดทดสอบได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีความไว ความจำเพาะ มีค่าใกล้เคียงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้พบว่าชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดมีความสอดคล้องกัน และมีค่าความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่เชื่อถือได้ แสดงว่าสามารถใช้ชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดแทนกันได้ ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบ ทำให้กรมปศุสัตว์ทำการจัดซื้อชุดทดสอบได้หลากหลายยิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มทางเลือกในการใช้ชุดทดสอบ ในกรณีที่มี NSP ELISA kits ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ: ไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย non–structural protein ความไว ความจำเพาะ

บทนำ

โรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease, FMD) เกิดจากไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (Foot and Mouth Disease Virus; FMDV) ในสกุล *Aphthovirus* จัดอยู่ในวงศ์ *Picornaviridae* เป็นเชื้อไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยว (Single-stranded RNA) จัดเป็นโรคระบาดที่สำคัญในสัตว์กีบคู่ ได้แก่ โค กระบือ แกะ แพะ สุกร และสัตว์ป่า เป็นต้น นอกจากนี้ยังถือเป็นหนึ่งในโรคสัตว์ข้ามพรมแดน (Transboundary Disease) ที่ร้ายแรงที่สุดโรคหนึ่ง (Geering and Lubroth, 2002) ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในหลายประเทศทั่วโลก โรค FMD เป็นโรคประจำถิ่นในหลายภูมิภาคของทวีปเอเชียรวมทั้งในประเทศไทย ส่วนใหญ่ในแอฟริกาตะวันออกกลางและในละตินอเมริกา (WOAH, 2022) โรค FMD ถือได้ว่าเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับ World Trade Organization (WTO) ที่เป็นข้อบังคับทางการค้าสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ทำให้ประเทศที่มีการระบาดของโรค

FMD ถูกกีดกันทางการค้าเพื่อป้องกันความเสี่ยงที่จะนำเชื้อ FMDV เข้าสู่ประเทศ และทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่ได้รับผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์และการส่งออกสินค้าปศุสัตว์

ในการควบคุม เฝ้าระวัง และป้องกันโรค FMD จะต้องมีการวินิจฉัยและการทดสอบโรค FMD ด้วยวิธี ELISA เพื่อตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ (Mackay *et al*., 1998) โดยใช้หลักการทดสอบ differentiating infected from vaccinated animals (DIVA) ซึ่งจะสามารถตรวจแยกระหว่างแอนติบอดีที่เกิดจากวัคซีน ออกจากแอนติบอดีที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค โดยในขั้นตอนของการผลิตวัคซีนป้องกันโรค FMD จะมีการกำจัด Non Structural Protein (NSP) โดยวัคซีนจะกระตุ้นให้สัตว์ผลิตแอนติบอดีต่อต้านโปรตีนโครงสร้างของไวรัส (Structural protein, SP) เพียงอย่างเดียว ดังนั้นสัตว์ที่ฉีดวัคซีนจะพบเพียง SP แต่ถ้ามีการติดเชื้อด้วยจะพบว่าสัตว์มีแอนติบอดีต่อทั้ง SP และ NSP ดังนั้นสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติที่จะพบได้ทั้ง SP และ NSP (Doel, 2003)

ดังนั้นการหาแนวทางเพื่อใช้ในการพิจารณาเลือกชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบให้เหมาะกับชนิดสัตว์ สถานการณ์ พื้นที่ รวมถึงการพิจารณาเรื่องของราคาชุดทดสอบที่เหมาะต่อการนำมาใช้งานจึงมีความจำเป็น เพื่อประกอบการพิจารณาเลือกใช้ชุดทดสอบที่เหมาะสมและเกิดประโยชน์สูงสุดตามวัตถุประสงค์ของผู้ใช้ ทั้งนี้ยังใช้เป็นข้อมูลประกอบการจัดทำรายละเอียดคุณลักษณะเฉพาะในการจัดซื้อชุดทดสอบในแต่ละปีงบประมาณที่ต้องการข้อมูลเกี่ยวกับความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP เพื่อให้การดำเนินการสอดคล้องกับข้อกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 10400-2555 ว่าด้วยการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปต้องได้รับการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบโดยศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อยภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ หรือหน่วยงานที่องค์การสุขภาพสัตว์โลก (World Organisation for Animal Health, WOAH) ยอมรับก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่ามีชุดทดสอบหลายชุดที่มีจำหน่ายในประเทศไทย มีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบชุดทดสอบเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP จำนวน 4 ชุดทดสอบ พบว่ามีความไวใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงระหว่าง 84.60%-98.30% ในโค และ 73.33%-80.00% ในสุกร และมีความจำเพาะสูงทั้งในโคและสุกร ในช่วงระหว่าง 99.00%–100.00% (Linchongsubongkoch *et al*., 2004) ซึ่งมีบางชุดทดสอบที่นำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ แต่ปัจจุบันมีชุดทดสอบที่ผลิตและจำหน่ายในท้องตลาดมากขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องที่การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบที่มีอยู่เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิชาการที่มากเพิ่มขึ้นด้วย วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีจำหน่ายในปัจจุบัน เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสปากและเท้าเปื่อยในการตรวจจำแนกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ สำหรับใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบ และเพิ่มตัวเลือกให้หน่วยงานทำการจัดซื้อชุดทดสอบได้หลากหลายยี่ห้อยิ่งขึ้น ไม่เกิดการผูกขาดการตลาด

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างซีรัม

จำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ คำนวณตามวิธีของ OIE (2009) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และความคลาดเคลื่อน 2% โดยแบ่งเป็น ตัวอย่างซีรัมบวก (positive serum) เป็นซีรัมซึ่งมีระดับแอนติบอดีแตกต่างกันจากการตรวจด้วยวิธี Liquid Phase Blocking ELISA (LP-ELISA) จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรัมโค กระบือ 386 ตัวอย่าง จากพื้นที่ที่เกิดการระบาดในปีพ.ศ. 2562 และซีรัมสุกร 14 ตัวอย่าง จากงานทดสอบคุณภาพวัคซีนของสำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดนี้ นำมาจากสัตว์ที่ติดเชื้อตามธรรมชาติหลังการตรวจพบเชื้อ FMDV นาน 21-28 วัน โดยได้รับการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี ELISA Typing และวิธี RT-PCR จากตัวอย่างเมือกบริเวณหลอดอาหารส่วนต้น และ/หรือคอหอย โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า Probang cup (ตัวอย่าง Probang) หรือเนื้อเยื่อ สำหรับตัวอย่างซีรัมลบ (negative

serum) จำนวน 400 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ซีรัมโค 97 ตัวอย่าง ซีรัมแพะ 3 ตัวอย่าง และซีรัมสุกร 300 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากประเทศที่ปลอดโรค FMD ที่ได้รับการรับรองจาก WOAH ได้แก่ หน่วยงาน Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) ประเทศออสเตรเลีย และ หน่วยงาน KODAIRA Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization ประเทศญี่ปุ่น โดยตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาทดสอบ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อ non-structural protein (NSP)

ในการศึกษาได้นำชุดทดสอบ NSP ELISA kits จำนวน 6 ชุดที่มีตัวแทนจำหน่ายหรือผลิตขึ้นในประเทศไทย ประกอบด้วย 1. Biovet® Foot-and-Mouth Disease Virus Antibody Test Kit, ELISA FMDV NSP-3Bb ELISA (multi-species) (Biovet Inc., Canada), 2. ID Screen® FMD NSP Competition (IDvet., France), 3. VDPro® FMDV NSP AB ELISA (MEDIAN Diagnostics Inc., South Korea), 4. IDEXX® Foot-and-Mouth-Disease FMD, Multispecies Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc., USA), 5. PrioCHECK® FMDV NS (PRIONICS LELYSTAD B.V., the Netherlands) และ 6. KUcheck-F FMDV-NSP ELISA จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย มาทำการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด แบบ single well (1 ตัวอย่าง/ well) ดำเนินการทดสอบตามคู่มือของบริษัทผู้ผลิต รายละเอียดคุณลักษณะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits แต่ละชุดทดสอบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

การหาค่าความไว (sensitivity) และการหาค่าความจำเพาะ (specificity) ของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

นำตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและซีรัมควบคุมลบมาทำการทดสอบด้วยชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่มีการจำหน่ายในประเทศไทย ได้แก่ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F โดยดำเนินการทดสอบตามวิธีทดสอบที่แต่ละยี่ห้อการค้ากำหนดไว้ ทำการหาค่าความไวของแต่ละชุดทดสอบ โดย

ตารางที่ 1 รายละเอียดคุณลักษณะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits ที่ใช้ในการศึกษา

ชุดทดสอบ	บริษัทผู้ผลิต	รูปแบบการทดสอบ	ชนิดสัตว์ที่สามารถตรวจได้	เกณฑ์การแปลผล positive
Biovet®	Biovet Inc., Canada	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	ค่า PI โดยเกณฑ์ขึ้นอยู่กับสถานะ และชนิดของสัตว์
ID Screen®	IDvet, France	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	S/N% ≤ 50.00%
VDPro®	MEDIAN Diagnostics Inc., South Korea	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	S/N value ≤ 0.60
IDEXX®	IDEXX Laboratories, Inc., USA	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	โค-กระบือ, แพะ, แกะ % S/P ≥ 35.00 สุกร % S/P ≥ 55.00
PrioCHECK®	Prionics Lelystad B.V., Netherlands	Blocking ELISA	โค-กระบือ, แพะ, แกะ และสุกร	PI ≥ 50.00%
KUcheck-F	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย	Indirect ELISA	โค-กระบือ แพะ และสุกร	COD ≥ 0.20

หมายเหตุ

1. % S/N ratio [Mean of test sample (S) / Mean of negative control (N)] * 100 คือ การนำค่า OD ของตัวอย่างที่ทดสอบหารด้วย ค่า OD ของค่า Negative Control แล้วคูณด้วย 100

$$\%S/N = (OD\ sample/OD\ negative\ control) \times 100$$

2. Percent Inhibition; % PI =

$$\frac{(OD_{450}\ test\ sample)\ X\ 100}{OD_{450}\ Max}$$

3. COD (corrected optical density) คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสง

4. S/P ratio (sample to positive ratio) =

$$\frac{(ค่า\ OD\ ตัวอย่าง) - ค่า\ OD\ เฉลี่ยตัวควบคุมลบ}{(ค่า\ OD\ เฉลี่ยตัวควบคุมบวก - ค่า\ OD\ เฉลี่ยตัวควบคุมลบ)}$$

นำชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดสอบกับซีรัมควบคุมบวก วิเคราะห์ผลโดยใช้ตาราง two by two และหาค่าความจำเพาะของแต่ละชุดทดสอบ โดยนำชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดสอบกับซีรัมควบคุมลบ โดยเป็นตัวอย่างควบคุมลบที่แท้จริงจากสัตว์ที่ไม่มีการติดเชื้อหรือการสัมผัสเชื้อจากประเทศที่ได้รับการรับรองปลอดโรคปากและเท้าเปื่อย (WOAH,2019) จากนั้นเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของชุดทดสอบที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

นำผลการทดสอบหาค่าความไวและค่าความจำเพาะของแต่ละชุดทดสอบที่ใช้ในการศึกษา มาวิเคราะห์หาค่า Cohen's kappa ด้วยโปรแกรม InStat® 3.00

(https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/) โดยเกณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ Cohen's kappa ≥ 0.75 แปลว่าผลการตรวจสอบมีความสอดคล้องกัน และในกรณีที่ค่าสถิติ Cohen's kappa ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.81–1.00 ถือว่าเป็นระดับความสอดคล้องที่ดีมาก (Landis and Koch, 1977)

ค่าความแม่นยำของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยบ่งชี้ด้วยค่า diagnostic accuracy โดยคำนวณจากจำนวนตัวอย่างที่ได้ผลถูกต้องต่อตัวอย่างทั้งหมด (Liu *et al*., 2021) ด้วยโปรแกรม MEDCALC® (MedCalc Software Ltd, Belgium)

ผลและวิจารณ์

ความไวของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ความไวของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดสอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 97.50%-99.50% ดังรายละเอียด คือ ชุดทดสอบ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีค่าความไวเท่ากับ 99.25%, 99.50%, 97.50%, 98.00%, 98.50% และ 99.00% ตามลำดับ โดยเมื่อแจกแจงความไวแยกตามชนิดของสัตว์พบว่า ซีรัมโคและกระบือมีค่าความไวอยู่ระหว่าง 97.67%–99.48% ในขณะที่ซีรัมสุกรมีค่าความไวอยู่ระหว่าง 92.86%–100.00% โดยในกรณีของผลการทดสอบในสุกรพบว่ามี 5 ชุดทดสอบที่ให้ผลความไว 100.00% และมี 1 ชุดทดสอบ ได้แก่ VDPro® ที่ให้ค่าความไวอยู่ที่ 92.86% ค่า 95% CI ของผลการทดสอบ (ตารางที่ 2) และจากการศึกษาด้วยการทดสอบสมมติฐานด้วย ANOVA โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ระดับ 0.05 พบว่าการเปรียบเทียบในแต่ละชุดทดสอบมีค่าเฉลี่ยความไวไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 แสดงค่าความไวของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	ชนิดสัตว์	ค่าความไว	95% CI
Biovet®	โค-กระบือ	99.22% (383/386)	97.75–99.84
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.25% (397/400)	97.82–99.85
ID Screen®	โค-กระบือ	99.48% (384/386)	98.14–99.94
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.50% (398/400)	98.21–99.94
VDPro®	โค-กระบือ	97.67% (377/386)	95.62–98.93
	สุกร	92.86% (13/14)	66.13–99.82
	รวม	97.50% (390/400)	94.45–98.79
IDEXX®	โค-กระบือ	97.93% (378/386)	95.96–99.10
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	98.00% (392/400)	96.10–99.13
PrioCHECK®	โค-กระบือ	98.45% (380/386)	96.65–99.43
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	98.50% (394/400)	96.76–99.45
KUcheck-F	โค-กระบือ	98.96% (382/386)	97.37–99.72
	สุกร	100.00% (14/14)	76.84–100.00
	รวม	99.00% (396/400)	97.46–99.73

หมายเหตุ
"รวม" คิดจากจำนวนรวมของตัวอย่างซีรัมทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 3 แสดงค่าความจำเพาะ ของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	ชนิดสัตว์	ค่าความจำเพาะ	95% CI
Biovet®	โคและแพะ	99.00% (99/100)	94.55–99.97
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	99.75% (399/400)	98.62–99.99
ID Screen®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
VDPro®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
IDEXX®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
PrioCHECK®	โคและแพะ	100.00% (100/100)	96.38–100.00
	สุกร	100.00% (300/300)	98.78–100.00
	รวม	100.00% (400/400)	99.08–100.00
KUcheck-F	โคและแพะ	92.00% (92/100)	84.84–96.48
	สุกร	99.00% (297/300)	97.11–99.79
	รวม	97.25% (389/400)	95.13–98.62

หมายเหตุ
"รวม" คิดจากจำนวนรวมของตัวอย่างซีรัมทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ

ตารางที่ 4 แสดงค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Anova: Two-Factor Without Replication

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Sensitivity	0.142011	2	0.071006	0.034927	0.965793	4.102821
Specificity	5.777778	2	2.888889	1.355932	0.301269	4.102821

ตารางที่ 5 แสดงค่าสถิติ Cohen's kappa ของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	Cohen's kappa	95% CI
Biovet®	0.99	0.98–1.00
ID Screen®	0.995	0.99–1.00
VDPro®	0.98	0.96–0.99
IDEXX®	0.98	0.97–0.99
PrioCHECK®	0.99	0.97–1.00
KUcheck-F	0.96	0.94–0.98

ตารางที่ 6 ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยของ 6 ชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ชุดทดสอบ	Diagnostic accuracy (%)	95% CI
Biovet®	99.50	98.72–99.86
ID Screen®	99.75	99.10-99.97
VDPro®	98.75	97.71–99.40
IDEXX®	99.00	98.04–99.57
PrioCHECK®	99.25	98.37–99.72
KUcheck-F	98.12	96.93–98.95

ความจำเพาะของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความจำเพาะของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุดทดสอบ มีค่าอยู่ระหว่าง 97.25%–100.00% โดยชุดทดสอบ Biovet®, ID Screen®, VDPro®, IDEXX®, PrioCHECK® และ KUcheck-F มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 99.75%, 100.00%, 100.00%, 100.00%, 100.00% และ 97.25% ตามลำดับ เมื่อแจกแจงความจำเพาะแยกตามชนิดของสัตว์พบว่าโคและแพะมีค่าความจำเพาะอยู่ที่ 92.00%–100.00% ในขณะที่สุกรมีค่าความจำเพาะอยู่ที่ 99.00%–100.00% เมื่อแยกพิจารณาในกลุ่มโคและแพะจะพบว่ามีชุดทดสอบถึง 4 ชุดทดสอบที่ให้ผลความจำเพาะ 100.00% พบว่ามี 1 ชุดทดสอบ คือ Biovet® ให้ผลความจำเพาะ 99.00% และสำหรับชุดทดสอบของ KUcheck-F ที่ให้ผลความจำเพาะ 92.00% (ตารางที่ 3) จากการศึกษาด้วยการทดสอบสมมติฐานด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าแต่ละชุดทดสอบมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (p>0.05) ดัง ตารางที่ 4

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความสอดคล้องของชุดทดสอบเพื่อพิจารณาดูว่า ชุดทดสอบที่นำมาใช้ในการศึกษาให้ผลการวัดได้สอดคล้องกันหรือไม่ โดยการนำค่าสถิติ Cohen's kappa มาใช้ในการวิเคราะห์ จากการศึกษาพบว่าค่าสถิติ Cohen's kappa ของชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.96–1.00 แสดงว่าชุดทดสอบทั้งหมดมีค่าความสอดคล้องอยู่ระหว่าง 0.81–1.00 บ่งชี้ว่ามีระดับความสอดคล้องของการวัดที่ดีมาก (Landis and Koch, 1977) ซึ่งจากข้อมูลผลการศึกษาชุดทดสอบทั้งหมดที่มีความสอดคล้องกันดีมาก ซึ่งเป็นข้อมูลสนับสนุนในพิจารณาเกี่ยวกับการเลือกใช้ชุดทดสอบเพื่อทดแทนกันได้ (ตารางที่ 5)

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยของชุดทดสอบ NSP ELISA kits

ค่าความแม่นยำในการวินิจฉัยบ่งชี้ด้วยค่า diagnostic accuracy ซึ่งพบว่าชุดทดสอบทั้งหมดมีค่า diagnostic accuracy มากกว่า 98.00% ขึ้นไป เมื่อนำค่าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Liu *et al*. (2021) ที่หาค่าความแม่นยำของชุดทดสอบที่ใช้เชิงพาณิชย์ กับตัวอย่างที่ฉีดวัคซีน ในจำนวนรอบการทำวัคซีนที่แตกต่างกัน พบว่าให้ผลความแม่นยำระหว่าง 88.37%-100% ซึ่งข้อมูลดังกล่าวใช้ในการพิจารณาและสนับสนุนการประกันคุณภาพในด้านความถูกต้องของการทดสอบด้วย ผลการศึกษาความแม่นยำในครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 6

จากข้อมูลการศึกษาทั้งในอดีตและปัจจุบันเกี่ยวกับการพิจารณาเลือกชุดทดสอบที่เหมาะสม มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการควบคุมและป้องกันโรค FMD ภายในประเทศ โดยในปัจจุบันพบว่ามีชุดทดสอบที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP (NSP-ELISA) ทั้งในเชิงพาณิชย์และชุดทดสอบที่ผลิตเพื่อใช้ภายในหน่วยงานเพิ่มจำนวนมากขึ้น ดังนั้นเพื่อการสนับสนุนนโยบายการฉีดวัคซีนโรค FMD ในสัตว์มีชีวิต และสามารถดำเนินการเคลื่อนย้ายอย่างปลอดภัย จึงมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการตรวจสอบและการประเมินประสิทธิภาพของชุดทดสอบก่อนการพิจารณาเลือกใช้อย่างเหมาะสมในแต่ละประเทศ

ต่อไป ซึ่งตรงกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในประเทศไทยเมื่อปีพ.ศ.2547 ของ Linchogsubongkoch *et al.* ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบ NSP ELISA kits จำนวนสี่ชุดทดสอบ พบว่ามีความไวใกล้เคียงกัน คือ 84.60%-98.30% ในโค และ 73.33%-80.00% ในสุกร และมีความจำเพาะสูงทั้งในโคและสุกร มากกว่า 99.00%–100.00% และจากการศึกษาในปี 2006 ของ Brocchi *et al.* ที่ทำการทดสอบความถูกต้องทางซีรัมวิทยาหลังการระบาดของโรค โดยใช้ชุดทดสอบจำนวนหกชุดเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ NSP ของเชื้อ FMDV พบว่าชุดทดสอบทั้ง 3 มีความไวและความจำเพาะเกินกว่า 90% และ 99% ตามลำดับ ทั้งนี้ในทางปฏิบัติควรเลือกใช้การตรวจที่มีค่า Sensitivity สูง ๆ ในการตรวจคัดกรองสัตว์ในกรณีของโรคที่มีความสำคัญและรุนแรงมาก แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาเกี่ยวกับการควบคุมและคัดกรองได้นั้นจำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการตรวจเบื้องต้นเพื่อลดความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของโรคต่อไป ซึ่งจะสอดคล้องกับแนวทางและแนวคิดในการแยกระหว่างกรณีสัตว์ที่ได้รับวัคซีน FMD มาแล้วและไม่มีการสัมผัสเชื้อเมื่อนำมาทดสอบด้วยชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด จะแสดงผลเป็นลบ ส่วนกรณีที่ตัวอย่างมีการติดเชื้อตามธรรมชาติหรือสัมผัสเชื้อเท่านั้นจะให้ผลบวก ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการเลือกมาตรการควบคุมที่เหมาะสมสำหรับการระบาดของโรค FMD ต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด มีค่า ความไว 97.50%-99.00% ความจำเพาะ 97.25%-100.00% ความสอดคล้อง 0.96-0.99 และความแม่นยำ 98.12%-99.75% ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจแยกระหว่างสัตว์ที่ได้รับวัคซีนและสัตว์ที่ติดเชื้อ สามารถใช้ชุดทดสอบทั้ง 6 ชุด ทดแทนกันได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้ชุดทดสอบที่เหมาะสม สำหรับกรมปศุสัตว์ในการพิจารณาการจัดซื้อชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพหลากหลายยิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มทางเลือกในการใช้ชุดทดสอบในกรณีที่มี NSP ELISA kit ออกมาจำหน่ายในท้องตลาดเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ หน่วยงาน Australian Centre for Disease Preparedness (ACDP) ประเทศออสเตรเลีย, หน่วยงาน KODAIRA Research Station, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization ประเทศญี่ปุ่น, สำนักเทคโนโลยีชีวภัณฑ์สัตว์, เจ้าหน้าที่ในพื้นที่ของสำนักงานปศุสัตว์จังหวัด, เจ้าหน้าที่ศูนย์อ้างอิงโรคปากและเท้าเปื่อย ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมปศุสัตว์ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2555. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 10400-2555 เรื่องการชันสูตรโรคปากและเท้าเปื่อย. 42 หน้า.

Brocchi, E., Bergmann, I.E., Dekker, A., Paton, D.J., Sammin, D.J., Greiner, M., *et al*. 2006. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 24: 6966–6979.

Doel, T.R. 2003. FMD vaccines. *Virus Res.* 91: 81- 99. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00261-7.

Geering, W.A. and Lubroth, J. 2002. Preparation of foot-and-mouth disease contingency plans. Emergency Prevention System. FAO, Rome.

Landis, J.R. and Koch, G.G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 33: 159-174.

Linchongsubongkoch, W., Aunpomma, D. and Thongtha, T. 2004. The use of various non structural protein kits to differentiate between vaccinated and infected animals with foot and mouth disease virus. *J. Thai Vet. Med. Assoc.* 55: 21-28.

Liu, W., Zhang, G., Yang, S., Li, j., Gao, Z., Ge, S., Yang, H., Shao, J. and Chang, H. 2021. Development of a competitive chemiluminescence immunoassay using a monoclonal antibody recognizing 3B of foot-and-mouth disease

virus for the rapid detection of antibodies induced by FMDV infection. *Virol. J.* 18: 193. doi: 10.1186/s12985-021-01663-4.

Mackay, D.K.J., Forsyth, M.A., Davies, P.R., Berlinzanit, A., Belsham, G.J., Flint, M. and Ryan, M.D. 1998. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using by panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*. 16 (5): 446-459.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2018. "Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases." In : Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals. [Online]. Available: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf. Accessed September 30, 2021.

World Organisation for Animal Health (OIE). 2019. "Chapter 1.1.6 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases." In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris, France, 72–87. [Online]. Available : www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf Accessed November 19, 2022.

World Organisation for Animal Health (WOAH). 2022. "CHAPTER 3.1.8. FOOT AND MOUTH DISEASE (Infection with foot and mouth disease."[Online]. Available: https://www.woah.org/en/disease/foot-and-mouth-disease/. Accessed November 19, 2022.