183231

การประเมินผลการใช้ *Leptospiral* immunoglobulin-like protein A (LigA) ในการตรวจวินิจฉัยทางซีโรโลยีของโรค leptospiroisis

พจนีย์ ศรีมาโนชญ[1] ชนิยา ลี้ปิยะสกุลชัย[1] ธารีรัตน์ กะลัมพะเหติ[2] วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล[1]

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2 ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

เนื่องจากสามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ LigA ในซีรัมผู้ป่วยที่ให้ผล MAT ลบแต่อาการทางคลินิคยืนยันว่าเป็นโรคฉี่หนูโรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนู เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่บางครั้งเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต การวินิจฉัยโรค Leptospirosis ให้รวดเร็วและแม่นยำจะนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิภาพและลดอัตราตายได้มาก ปัจจุบันได้มีความพยายามในการพัฒนาการวินิจฉัยโรคนี้ให้มีประสิทธิภาพสูงหลายชนิด เช่น การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการตรวจหา DNA ของเชื้อ *leptospira* ซึ่งแต่ละวิธีพยายามเน้นที่จะวินิจฉัยโรคให้ได้ตั้งแต่ระยะแรกเพื่อประโยชน์ในการทำการรักษา แต่วิธีการตรวจวินิจฉัยเหล่านี้มักใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ที่ซับซ้อน ตลอดจนต้องการผู้ชำนาญเฉพาะทาง ส่วนการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการที่นิยมใช้ในขณะนี้คือ การเพาะเชื้อ และ microagglutination test (MAT) ซึ่ง MAT นี้นอกจากจะให้ผลช้าแล้วยังให้ผลความไวและความแม่นยำไม่เป็นที่น่าพอใจ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยที่ง่ายไม่ซับซ้อนให้ผลรวดเร็ว แม่นยำ ครอบคลุมทุก serovar ของเชื้อ *leptospira* ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในคน และประหยัดค่าใช้จ่ายจึงเป็นสิ่งจำเป็น การศึกษานี้ได้นำ *Leptospira* outer membrane protein คือ *Leptospiral* immunoglobulin-like protein A (LigA) มาใช้เป็นแอนติเจนในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางทางห้องปฏิบัติการซีโรโลยี จากการทดสอบหา *ligA* โดยวิธี PCR กับ เชื้อ *leptospira* สายพันธุ์ก่อโรคและไม่ก่อโรค 50 serovars พบว่า เชื้อ *leptospira* สายพันธุ์ก่อโรค คือ *L. interrogans, L. kirschneri, L. noguchii, L. santorasii, L. meyeri* and *L. weillii* มียีน *ligA* และไม่พบยีนนี้ในเชื้อ *leptospira* สายพันธุ์ไม่ก่อโรค คือ *L. biflexa* และเชื้อ *leptospira* สายพันธุ์ก่อโรค *L. borgpetersenii* และ *L. santarosai.* นอกจากนี้พบว่า เชื้อ *leptospira* สายพันธุ์ที่มียีน *ligA* จะสังเคราะห์โปรตีน LigA ได้ นอกจากนี้พบว่าเมื่อนำ recombinant LigA ที่เกิดจากการโคลนยีน *ligA* จากเชื้อ *L. interrogans,* serogroup Icterohemorrhagiae, serovar icterohemorrhagiae ไปใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดีจากซีรัมผู้ป่วยโดยวิธี indirect ELISA โดยใช้ซีรัมที่ให้ผล MAT บวก ซีรัมที่ให้ผล MAT ลบแต่อาการทางคลินิคยืนยันว่าเป็นโรคฉี่หนู ซีรัมคนปกติในและนอกพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค พบว่า 92% (76 จาก 82 ซีรัม) ของผู้ป่วยที่ให้ผลที่อาการทางคลินิคยืนยันว่าเป็น Leptospirosis (ทั้งผล MAT บวก และลบ) ให้ผล IgM และ/หรือ IgG antibodies เป็นบวก ผลที่ได้นี้นอกจากบ่งชี้ว่า LigA IgM/IgG ELISA ของการศึกษานี้สามารถนำไปใช้แทนที่ MAT เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนูได้แล้วยังมีข้อได้เปรียบเหนือ MAT คือมีความไวและความจำเพาะมากกว่าได้

183231

Evaluation of leptospiral immunoglobulin-like protein A (LigA) and lipoprotein LipL21 in serodiagnosis of human leptospirosis

Potjanee Srimanote[a*], Chaniya Leepiyasakulchai[a], Thareerat Kalambaheti[b], and Virapong Prachayasittikul[a]

[a] *Department of Clinical Microbiology, Faculty of Medical Technology, Mahidol University, Bangkok 10700*

[b] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

Abstract- Human leptospirosis often results in a fatal outcome due mainly to pulmonary hemorrhage and the failure of vital organs. Adequate and prompt treatment implemented early in the course of the illness greatly reduces the mortality. Laboratory methods are needed to confirm the clinical diagnosis; nevertheless, most of the currently available means, i.e., the *Leptospira* culture of the clinical specimens, and the microscopic agglutination test (MAT) which is the most widely used serological method , are not sensitive, specific and/or rapid enough to assist treatment indication. In this study, we have investigated *Leptospira* OMP, the immunoglobulin-like protein A (LigA). *ligA* genes or their homologues were found, by DNA amplification using PCR, in 6 genomespecies of both pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp., i.e. *L. interrogans, L. kirschneri, L. noguchii, L. santorasii, L. meyeri* and *L. weillii,* but not in *L. biflexa, L. borgpetersenii* and *L. santarosai.* recombinant LigA protein was produced from *L. interrogans,* serogroup Icterohemorrhagiae, serovar icterohemorrhagiae, and has been used in an indirect ELISA for detecting specific antibodies in sera of MAT-positive, clinically diagnosed leptospirosis patients, using sera of patients with other diseases and healthy individuals as patient and normal controls, respectively. 92% (76 of 82 sera) of the clinically diagnosed leptospirosis patient sera (both MAT negative and positive) were positive for either IgM or IgG antibodies specific to recombinant LigA. Moreover, LigA IgM/IgG ELISA can be use inplace of MAT for diagnostic purpose. Moreover, this ELISA system offers anadvantage over MAT as they provided higher sensitivity and specificity. In addition, this ELISA is more rapid and cost efficiency than that of MAT. Our results, thus, indicate an early diagnostic potential of the recombinant *Leptospira* LigA protein.

*Correspondence author. Tel: 0 2419 7172; Fax: 0 2441 4380; email: mtpsm@mahidol.ac.th