บทคัดย่อ

T 164813

โครงการนี้มีจุดเริ่มต้นมาจากปัญหาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีสทางห้องปฏิบัติการที่เป็นวิธีมาตรฐาน ได้แก่ วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* spp. จากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย และวิธีทางซีโรโลยีเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ *Leptospira* spp. ได้แก่วิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ซึ่งทั้งสองวิธียังขาดความไวและความจำเพาะรวมทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่สามารถปฏิบัติโดยทั่วไป เพราะมีความยุ่งยากในการทดสอบ ต้องมีห้องปฏิบัติการเฉพาะ ต้องทำโดยผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะ และใช้เวลานานกว่าจะทราบผล ทำให้ไม่สามารถนำผลการทดสอบดังกล่าว ไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการให้การรักษาของแพทย์ได้ จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ง่ายและสะดวกขึ้น แต่วิธีการตรวจเหล่านั้นก็ยังมีปัญหาที่ความไวและความเฉพาะโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะแรกของการป่วย

โครงการวิจัยนี้จึงได้นำวิธีเวสเทอร์นบลอท ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไวและความเฉพาะสูง รวมทั้งสามารถมองเห็นปฏิกิริยาของแอนติเจน-แอนติบอดีได้ชัดเจนโดยการดูแถบปฏิกิริยา (reactive bands) มาศึกษาเพื่อทดสอบหาแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยที่จำเพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. ในการวิจัย ได้เตรียมแอนติเจนคือ whole cell homogenates (WH) ของเชื้อ *Leptospira* 20 serovars จาก 15 serogroups นำไปแยกโดย SDS-PAGE แล้ว blot SDS-PAGE separated-antigens ลงบน nitrocellulose membrane จากนั้นนำไปตัดตามแนวการเคลื่อนที่ของแอนติเจน (แนวตั้ง) เป็น strips ที่สะดวกต่อการใช้งาน เก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ

ได้เก็บตัวอย่างซีรัมจากคน 3 กลุ่มมาทำการศึกษา กลุ่มที่ 1 เป็นผู้ป่วยจำนวน 18 ราย ที่แพทย์วินิจฉัยเบื้องต้นตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซีส และต่อมาพบว่าซีรัมของผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ผลบวกแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* spp. ด้วยวิธี IFA และ MAT ผู้วิจัยได้เก็บซีรัมของผู้ป่วยกลุ่มนี้ในวันที่ 3-19 หลังจากเริ่มมีไข้ และมีผู้ป่วยจำนวน 4 รายที่เก็บตัวอย่างซีรัมได้มากกว่า 1 ตัวอย่าง (follow-up samples)กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ 2 เป็นผู้ป่วยที่มีไข้จากสาเหตุอื่นๆ จำนวน 22 ราย และกลุ่มที่ 3 เป็นคนปกติ จำนวน 22 ราย

จากการทดสอบซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอท โดยให้ทำปฏิกิริยากับ antigen- blotted strips ที่ผลิตจากเชื้อ *Leptospira* serovars และ serogroups ต่างๆกัน พบว่าซีรัมของ กลุ่มที่ 1 ให้ reactive bands ที่เกิดจากปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี ทั้งที่เหมือนและต่างกันอย่างชัดเจนไม่ว่าจะใช้แอนติเจน (WH) จาก pathogenic

Leptospira spp. serovars หรือ serogroups ใด ซีรัมของผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 นี้จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนใน WH ที่มีมวลของโมเลกุล 37, 48, 54, 59, 70 และ 81 kDa แอนติเจนใดแอนติเจนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแอนติเจน ทำให้เห็น reactive band อย่างน้อยหนึ่ง band หรือมากกว่าหนึ่ง ในจำนวน 6 reactive bands (100% sensitivity) ซีรัมของผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 จำนวน 15 รายจาก 18 ราย (83.33 %) ให้ reactive bands อย่างน้อย 2 bands ผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 จำนวน 4 ราย ที่สามารถเก็บตัวอย่างซีรัมได้หลายครั้ง (follow-up samples) พบว่าจำนวน reactive bands และ/หรือความเข้มของ band เดิม เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อทดสอบ follow-up serum samples ด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอท ซึ่งแสดงว่าร่างกายของผู้ป่วยตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่เชื้อ *Leptospira* ผลิตออกมาขณะอยู่ในร่างกายของผู้ป่วย (*in vivo* expression antigens) ด้วยการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าผู้ป่วยกำลังติดเชื้อ *Leptospira* spp. ซีรัมของผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 (เป็นไข้จากสาเหตุอื่น) และ คนปกติ (กลุ่มที่ 3) ไม่ทำให้เกิด reactive bands ต่อ แอนติเจนทั้ง 6 แอนติเจน (100% specificity) แต่ให้ reactive bands ต่อแอนติเจนอื่นบ้างในบางราย การใช้ WH ของ non-pathogenic *Leptospira* spp. เป็นแอนติเจนในวิธีเวสเทอร์นบลอทพบว่ามีความไวต่ำ

วิธีเวสเทอร์นบลอทใช้เวลาไม่นาน เพราะสามารถเตรียม antigen–blotted strips ไว้ล่วงหน้าได้ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ได้นานกว่า 18 เดือนโดยมีคุณภาพเหมือนเดิม ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ หรือความชำนาญพิเศษ มีความไวและความเฉพาะสูง ดังนั้นวิธีเวสเทอร์นบลอทที่ใช้ WH ของ pathogenic *Leptospira* spp. เป็นแอนติเจน (serovar หรือ serogroup ใดก็ได้) จึงน่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่เป็นทางเลือก สำหรับการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีส ทั้งเพื่อตรวจคัดกรองและยืนยันการเป็นโรคได้ในคราวเดียวกัน

แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่สามารถสรุปความแตกต่างของ reactive bands ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างซีรัมของผู้ป่วยกับแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* เพื่อแยก serovars หรือ serogroups ของเชื้อได้ เนื่องจากมีข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธีเวสเทอร์นบลอท แต่ก็มีแนวทางในการศึกษาเพื่อแยก Leptospira serogroups และ serovars ได้ด้วยเทคนิค proteomics และ immunomics

Abstract

TE164813

Existing serological methods for the diagnosis of leptospirosis are still unsatisfying, mainly due to their low accuracy. In this study, serum samples of 18 clinically diagnosed, IgM dipstick positive, MAT positive leptospirosis patients were analyzed by Western blotting against SDS-PAGE separated whole cell homogenates of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* spp., belonging to 20 serovars of 15 serogroups. The serum samples were collected from the patients at days 3 to 10 after the onset of fever. Serum samples of 22 patients with other febrile illnesses and 22 healthy counterparts were used as patient and normal controls, respectively. Irrespective of the serovar or serogroup of the pathogenic *Leptospira* spp. used as antigen in the SDS-PAGE, all of the 18 serum samples of the patients with leptospirosis gave at least one antigen-antibody reactive band in the Western blot against the following six components of the pathogenic *Leptospira* antigen, i.e., 37, 48, 54, 59, 70 and 81 kDa (100 % sensitivity). Fifteen of the 18 serum samples (83.33 % sensitivity) reacted to at least two of the six components. None of the serum samples of the 22 patients with other febrile illnesses or the 22 normal control counterparts reacted to any of the six components (100 % specificity). Only 9 of 18 serum samples of the patients with leptospirosis (50%) reacted to the 70 kDa-component, but not to any other component, of the antigens prepared from non-pathogenic *Leptospira* spp., i.e., serogroup Semaranga, serovar patoc and serogroup Andamana, serovar andamana. Thus, Western blot analysis of serum samples using antigen prepared from pathogenic *Leptospira* spp. may be a useful tool for the serodiagnosis of leptospirosis.