

รายงานโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ 50164

การพัฒนาและการประเมินชุดทดสอบสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ Dengue
/Leptospirosis/Scrub typhus IgM/IgG ในชุดทดสอบเดียวกัน

**Development and Evaluation of Diagnostic Test for Dengue
/Leptospirosis/Scrub typhus IgM/IgG Multiplex Antibody Detection**

หัวหน้าโครงการ: รองศาสตราจารย์ ดร.อุไรวรรณ โฆษิตานนท์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ผู้ร่วมวิจัย:

- | | |
|---|--|
| 1. รองศาสตราจารย์ กัลลยานี ดวงฉวี | ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงธารารัตน์ ธารากุล | ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. พันเอก วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ | แผนกพยาธิวิทยา กองวิจัย
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร |
| 4. นางสาว นภัสวรรณ บุญสาธ | ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| 5. รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สุธี ยกสำน | สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล |

ทุนวิจัยมุ่งเป้าด้านสุขภาพ และชีวเวชศาสตร์ ประจำปี 2556

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญตาราง	4
สารบัญภาพ	6
บทนำ	8
ผลงานวิจัยของโครงการ	12
หลักการของ immunochromatographic test	12
การผลิตชุดทดสอบของโรคสครับไทฟัส/โรคเลปโตสไปโรสิส/โรคแดงก่ำ	13
1. การผลิตชุดทดสอบของโรคสครับไทฟัส	
1.1 ขั้นตอนการผลิตแอนติเจนจากเชื้อ <i>Orientia tsutsugamushi</i> (โรคสครับไทฟัส)	13
1.2 การทดสอบ immunoreactivity ของ recombinant 56 kDa proteins	16
1.3 การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G)	19
การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 1	19
การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 2	23
การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 3	25
2. การผลิตชุดทดสอบของโรคเลปโตสไปโรสิส	31
2.1 ขั้นตอนการผลิตแอนติเจน <i>Leptospira</i> lipopolysaccharides (LPS) ของ <i>Leptospira</i> spp.	31
2.1.1 การผลิตแอนติเจน <i>Leptospira</i> lipopolysaccharides (LPS)	31
2.1.2 การผลิตแอนติเจน Recombinant 25 kDa protein	32
การจำแนกหา <i>Leptospira</i> lipoprotein ขนาดโมเลกุลต่ำของ Pathogenic <i>Leptospira</i>	37
การผลิต recombinant protein 25 kDa ขนาดโมเลกุลต่ำของ Pathogenic <i>Leptospira</i>	37
2.2 การทดสอบ immunoreactivity ของ <i>Leptospira</i> lipopolysaccharides (LPS) และ recombinant 25 kDa proteins	40

สารบัญเรื่อง

	หน้า
2.3 การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LeptoProt_M) และ ชนิด IgG (LeptoProt _G) และ LepLPS_M	41
การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LeptoProt_M) และ ชนิด IgG (LeptoProt _G) และ LepLPS_M ครั้งที่ 1	41
การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LeptoProt _M) และ ชนิด IgG (LeptoProt _G) ครั้งที่ 2	44
การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LeptoProt _M) และ ชนิด IgG (LeptoProt _G) ครั้งที่ 3	45
3. การผลิตชุดทดสอบของโรคเต็งกี	46
3.1 ขั้นตอนการผลิตแอนติเจน Recombinant Envelope Glycoprotein	46
3.2 การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ recombinant envelope glycoprotein	49
ข้อวิจารณ์ และสรุปข้อเสนอแนะ	50
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	56

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยชิ้นนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยโครงการนี้ และสำนักงานพัฒนาและเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในฐานะผู้บริหารจัดการและประสานงานกับ สวรส.

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

- สถาบันร่วมวิจัย

- มหาวิทยาลัยมหิดล: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (ภาควิชาจุลชีววิทยาและภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน)

- คณะวิทยาศาสตร์ (ภาควิชาฟิสิกส์ชีววิทยา) และ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร แผนกพยาธิวิทยา กองวิจัย

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข

- ศ. ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา ศ. ดร. แพทย์หญิงยุพิน ศุภธรรมมงคล, และศ. ดร. นายแพทย์ประเสริฐ เอื้อวรากุล ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ และให้ความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

- อาจารย์ ดร.ชรินทร์ ถาวรคุณ ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล นายชนินทร์ จิระพงศ์วัฒนา ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตลอดจนผู้ที่ช่วยเก็บข้อมูลและจัดพิมพ์เอกสาร

คณะนักวิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยในโครงการนี้จะประโยชน์แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ในการได้องค์ความรู้ในการผลิตภัณฑ์ต้นแบบชุดทดสอบต่อไป

รองศาสตราจารย์ ดร.อุไรวรรณ โฆษิตานนท์

รองศาสตราจารย์ กัลยาณี ดวงฉวี

ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงธารารัตน์ ธารากุล

พันเอก ดร.วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์

นางสาว นภัสวรรณ บุญสาธ

รองศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สุธี ยกสำน

บทคัดย่อ

ไข้เฉียบพลัน (acute febrile illness หรือ undifferentiated fever) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาในประเทศต่างๆทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย อาการสำคัญ คือ ไข้และปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอาการที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถเจาะจงไปยังโรคหนึ่งโรคใด การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันการวินิจฉัยอาการทางคลินิก จึงเป็นที่มาของการพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถวินิจฉัยโรคโรคสครับไทฟัสและโรคเลปโตสไปโรซิสได้รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ โครงการนี้ได้ผลิตต้นแบบผลิตภัณฑ์สองชิ้น คือ ชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM/IgG และชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM/IgG โดยวิธี Immunochromatographic based gold nanoparticles test (Strip test) ซึ่งใช้ recombinant proteins เป็นแอนติเจน โดยผลิต recombinant proteins เริ่มด้วยการออกแบบไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ต้องการ สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อเพื่อเป็นต้นแบบจำลองยีน ด้วยเทคนิคโพลีเมอร์เชนรีเอกชัน (PCR) นำไปโคลนเข้ากับพลาสมิด หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน ด้วยเทคนิค PCR และ restriction fragment analysis จึงได้ recombinant โคลนต่างๆ ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน ให้ผลิตโปรตีนแล้วผ่านกระบวนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โปรตีนของโรคสครับไทฟัสและโรคเลปโตสไปโรซิส คือ 56kDa proteins จากเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ (prototype strains) Karp, Kato และ Gilliam และ 25kDa [Electron transfer flavoprotein subunit beta (ETF_beta)] ตามลำดับ

ในการพัฒนาชุดทดสอบการวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส ได้ recombinant 56 kDa proteins ของทั้งสามสายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ใน NCBI database เท่ากับร้อยละ 97.8, 97.7 และ 97.4 ตามลำดับ จากผลการทดสอบ immunoreactivity ซึ่งว่า recombinant 56 kDa proteins สามารถใช้เป็นแอนติเจนได้ดีมากในการตรวจหาแอนติบอดีต่อทั้งสามสายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam รวมทั้งสายพันธุ์ TA716 และ TA763 ได้

การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ IFA_IgM/IgG (titer $\geq$ 1:400) กับตัวอย่างตรวจซ้ำจำนวน 318 ตัวอย่าง ประกอบด้วย scrub typhus จำนวน 100 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus จำนวน 218 ตัวอย่าง (leptospirosis จำนวน 53 ตัวอย่าง, dengue จำนวน 96 ตัวอย่าง, มีวรีนไทฟัส จำนวน 30 ตัวอย่าง และ โรคไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 39 ตัวอย่าง) ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M/G มีความไวร้อยละ 97.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 98.6 หากพิจารณาแยก สำหรับค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M มีความไวร้อยละ 81.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 92.0 ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_G มีความไวร้อยละ 93.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 96.9

การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ซึ่งเตรียมโดยการหดยแอนติเจนเอง (version 1) ชนิด IgM (LepProt_M) ซึ่งมี recombinant ETF protein เป็นแอนติเจน และ LepLPS_M ซึ่งมี LPS เป็นแอนติเจน กับค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ leptospirosis พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_M (titer $<$ 1:50) ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_M และ LepLPS_M คิดเป็นร้อยละ 43.5 สำหรับในกลุ่มผลบวกของ IFA_M titer 1:400 ถึง $\geq$ 1:6400 ได้ผลบวกตรงกันด้วย LepProt_M คิดเป็นร้อยละ 44.4 (4 ใน 9 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับ LepLPS_M ได้ผลบวกทุกตัวอย่าง สำหรับ LepProt_M และ LepProt_G ยังได้ผลไม่ตึงแสดงว่าการตรวจหาแอนติบอดียังไม่ดีพอ สมควรที่จะปรับปรุงแก้ไข เช่น บัปเฟอร์ เมมเบรน และ conjugate เป็นต้น เมื่อทราบปัญหาจึงได้พัฒนาจนกระทั่งได้แอนติเจนที่ดีใช้ใน strip test เมื่อวิเคราะห์ผลของ LepLPS_M ได้ผลบวกเกือบทุกตัวอย่าง อาจเป็นไปได้ว่ามีความไวสูงมากหรือมีปัญหของผลบวกปลอม จำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไป

ต่อมาได้มีการพัฒนา LepProt_M และ LepProt_G เป็น version 2 ในการประเมินชุดทดสอบ เทียบกับชุดทดสอบที่มีวางจำหน่าย SD BIOLINE Leptospira IgM/IgG (SD Lep_M/G) ซึ่งมีความไวร้อยละ 96.2 และความจำเพาะร้อยละ 95.7 จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถใช้ผลการแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามหากใช้ผลการแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่า LepProt_M มีความไวสูงกว่า SD Lep_M ในด้านการตรวจหาแอนติบอดีในระยะต้นของโรค (early detection) สำหรับการใช้ผล microscopic agglutination test (MAT) ที่มีผลบวก titer $\geq$ 1:400 เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าชุดทดสอบ LepProt_M/G มีความไว ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ สูงกว่า SD_M/G ยกเว้น SD_M มีความจำเพาะ (ร้อยละ 100) สูงกว่า LepProt_M (ร้อยละ 91.7)

โดยสรุปโครงการนี้ได้ผลิตต้นแบบผลิตภัณฑ์สองชิ้น คือ ชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM/IgG และชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM/IgG ซึ่งมีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ ที่ดีมากสามารถวินิจฉัยโรคโรคสครับไทฟัสและโรคเลปโตสไปโรซิสได้รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ

คำสำคัญ: โรคสครับไทฟัส วินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว รีคอมบิแนนท์ โปรตีน

Abstract

Acute febrile illness (undifferentiated fever, AFI) is common disease and problem in worldwide including Thailand. Symptoms in early phase of AFI are non-specific resulting in mistakenly diagnosing it in acute febrile illness group. Laboratory diagnosis is important to confirm the definite clinical diagnosis. A rapid and accurate diagnostic test is essential tests for Point-of-care diagnosis. The objective was to generate the template products for diagnosis of scrub typhus and leptospirosis based on the principle of immunochromatography with gold nanoparticles (strip test). In preparation of recombinant proteins, the specific primers of entire genes were designed. PCR product from extracted DNA was cloned into plasmid and then selected positive clones were performed by PCR and restriction fragment analysis. Recombinant plasmids were transformed into expression cells. The characterized and purified recombinant proteins for scrub typhus and leptospirosis were 56 kDa proteins from *Orientia tsutsugamushi* prototype strains of Karp, Kato and Gilliam and 25 kDa protein of (Electron transfer flavoprotein subunit beta, ETF_beta), respectively.

In the development of scrub typhus test kit, the nucleotide sequences of the recombinant proteins of all three strains showed the identity percentage of 97.8, 97.7 and 97.4 respectively. IgM/IgG immunoreactivity indicated that the recombinant proteins could be used as excellent antigens for antibody detection against all three strains and others two strains of TA716 and TA763.

Evaluation of scrub typhus test kit IgM (Scrub_M) and IgG (Scrub_G) by using immunofluorescence assay (IFA) as a reference test. The titer $\geq 1:400$ of IFA_M/G was considered to be positive. Scrub_M/G were tested in 318 sera from 100 scrub typhus patients and 218 non-scrub typhus patients (53 leptospirosis, 96 dengue, 30 murine typhus and 39 unknown). Scrub_M/G yielded the values of sensitivity, specificity; positive predictive value and negative predictive value were 97.0%, 100%, 100% and 98.6%, respectively. Scrub_M showed the values of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (PNV) were 81%, 100%, 100 and 92.0, respectively. Scrub_G showed the values of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (PNV) were 93.0%, 100%, 100 and 96.9, respectively.

Evaluation of leptospirosis test kit IgM (LepProt_M) and IgG (LepProt_G) with recombinant ETF protein as antigen (version 1), was tested in 60 sera by using immunofluorescence assay (IFA) as a reference test. Correlation of (LepProt_M) and LepLPS_M with LPS as antigen was observed. The titer $\geq 1:400$ of IFA_M/G was considered to be positive. LepProt_M and LepLPS_M gave the same negative results of 43.5 in sera with IFA_M (titer $< 1:50$). In the group of positive results for IFA_M, LepProt_M gave the negative results of 44.4 (4/9 samples) while LepLPS_M yielded 100% of positive results. LepProt_M and LepProt_G which were further developed to be version 2 as compared with commercial kit SD BIOLINE Leptospira IgM/IgG (SD Lep_M/G) which demonstrating sensitivity of 96.2% and specificity of 95.7%, was evaluated. The results showed that leptospiral isolation as reference standard test could not be used as a tool of evaluation. However, LepProt_M gave the higher rate than SD Lep_M in antibody detection of early phase of illness. Using microscopic agglutination test (MAT) as reference test, the sera in the positive group (titer $\geq 1:400$) showed that LepProt_M/G yielded the values of sensitivity, PPV and PNV were higher than SD_M/G, except specificity of SD_M was higher than LepProt_M (100% vs 91.7%).

In conclusion, two template products of rapid diagnostic tests were Scrub_M and Scrub_G (for Scrub typhus) and LepProt_M and IgG LepProt_G (for leptospirosis) with high sensitivity, specificity; positive predictive value and negative predictive value.

Key words: scrub typhus, leptospirosis, rapid diagnostic test, recombinant proteins

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 IgM immunoreactivity ของ recombinant 56 kDa proteins จาก <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ Kato, Karp และ Gilliam	17
ตารางที่ 1.2 Immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato, Gilliam และ Pooled Ag จาก <i>Orientia tsutsugamushi</i> กับซีรัมผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสที่มี seroconversion ของแอนติบอดีต่อ TA716 (CMP25) และต่อ TA763 (CMP45)	18
ตารางที่ 1.3 Immunoreactivity ชนิด IgG ของ recombinant 56 kDa proteins Pooled Ag จาก <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ Kato, Karp และ Gilliam	19
ตารางที่ 1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G)	20
ตารางที่ 1.5 ผลของ Scrub_M และ Scrub_G ในกลุ่มตัวอย่างตรวจซีรัม scrub typhus และ non-scrub typhus โดยใช้ IFA เป็นวิธีมาตรฐาน	21
ตารางที่ 1.6 การเปรียบเทียบค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ Scrub_M และ Scrub_G	22
ตารางที่ 1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2	24
ตารางที่ 1.8 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2	24
ตารางที่ 1.9 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG กับ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) โดยวิเคราะห์ผลร่วมกับ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2	25
ตารางที่ 1.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ครั้งที่ 3	26
ตารางที่ 1.11 ผลการทดสอบที่ตรงกันและที่ไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) และ ผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M)	27

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.12 ผลการทดสอบที่ตรงกันและที่ไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_G) และ ผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G)	27
ตารางที่ 1.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และ ผลทดสอบของชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid ชนิด IgM/IgG (Immu_M/Immu_G)	28
ตารางที่ 1.14 การเปรียบเทียบผลการทดสอบของชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่มีจำหน่ายแล้วในซีรัมที่มีผลไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) และของชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid ชนิด IgM/IgG (Immu_M/Immu_G)	29
ตารางที่ 1.15 ค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ Scrub_M, Scrub_G และ Scrub_M/G โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน	30
ตารางที่ 2.1 IgM immunoreactivity ใน pooled fraction (fractions 6 - 10) ของ extractable OM components จาก pathogenic และ saprophytic <i>Leptospira</i> กับซีรัมจาก leptospirosis patients, non-leptospirosis patients and healthy persons	35
ตารางที่ 2.2 โปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก Proteomics analysis	35
ตารางที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) กับ ผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) และ LepLPS_M	41
ตารางที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และ ผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)	43
ตารางที่ 2.5 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M)	43
ตารางที่ 2.6 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgG (LepProt_G)	44
ตารางที่ 2.7 การเปรียบเทียบค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ LepProt_M/LepProt_G และ SD Lep_M/ SD Lep_M	45

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1.1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen จาก <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ต่างๆ	13
รูปที่ 1.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen ระหว่าง <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ Karp และ recombinant clone	15
รูปที่ 1.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen ระหว่าง <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ Kato และ recombinant clone	15
รูปที่ 1.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen ระหว่าง <i>Orientia tsutsugamushi</i> สายพันธุ์ Gilliam และ recombinant clone	16
รูปที่ 2.1 ผลการทดสอบคุณภาพของ Leptospiral lipopolysaccharides (LPS) ที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย Pool leptospirosis patient sera (A) Rabbit serum (B)	32
รูปที่ 2.2 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fractions 1 - 20 ของ outer membrane (OM) components ที่แยกได้จากเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> serovar Autumnalis (เชื้อก่อโรค, เส้นทึบ) และ <i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc (เชื้อในธรรมชาติ, เส้นปะ)	33
รูปที่ 2.3 SDS-PAGE ของ pooled fractions ของ outer membrane (OM) components ย้อมหาโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250R-250 solution (CBB) (A), ย้อมหา lipopolysaccharide ด้วย Pro-Q® Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain Kit (B) and ย้อมหา lipid ด้วย Sudan Black B (C)	34
รูปที่ 2.4 IgM immunoreactivity ของ pooled fractions 2 ใน acute phase sera จาก leptospirosis patients, non-leptospirosis patients และ healthy persons. Lane M, Protein marker; lane 1, non-leptospirosis patient; lanes 2-3, healthy persons; lanes 4-7, leptospirosis patients.	34
รูปที่ 2.5 ผล MASCOT แสดง โปรตีน Electron transfer flavoprotein subunit beta (ETF_beta)	36
รูปที่ 2.6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง recombinant ETF และ <i>etfB</i> gene ของ reference <i>L. interrogans</i> serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน	38

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง recombinant ETF และ <i>etfB</i> gene ของ reference <i>L. interrogans</i> serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน	39
รูปที่ 2.8 ภาพแสดงผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ leptospirosis ที่มี leptospira lipopolysaccharides (LPS) เป็นแอนติเจน ชนิด IgM (LepLPS_M)	40
รูปที่ 2.9 ภาพแสดงผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ leptospirosis ที่มี Recombinant 25 kDa proteins เป็นแอนติเจน ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)	40
รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ recombinant Envelope glycoprotein เปรียบเทียบกับเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ 16881. จุด (.) หมายถึงความเหมือนของนิวคลีโอไทด์	47
รูปที่ 3.2 การเปรียบเทียบลำดับลำดับกรดอะมิโนของ recombinant Envelope glycoprotein เปรียบเทียบกับเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ 16881 เครื่องหมายจุด (.) หมายถึงความเหมือนของกรดอะมิโน	47
รูปที่ 3.3 แสดง recombinant envelope glycoprotein ที่ผลิตได้ ขนาด 30 kDa ด้วยวิธี SDS-PAGE	49
รูปที่ 3.4 แสดงผลการทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ Recombinant Envelope Glycoprotein ที่ผลิตได้กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Dot-ELISA	49

บทนำ

ไข้เฉียบพลัน (acute febrile illness หรือ undifferentiated fever) เป็นโรคที่พบบ่อยและเป็นปัญหาในประเทศต่างๆทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย อาการสำคัญ คือ ไข้ ปวดศีรษะ ซึ่งเป็นอาการที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถเจาะจงไปยังโรคหนึ่งโรคใด สาเหตุอาจเกิดจากการติดเชื้อจุลชีพหรือไม่ใช่จุลชีพ ไข้ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส ที่พบบ่อยในประเทศไทย ได้แก่ โรค dengue โรค leptospirosis โรค scrub typhus มาลาเรีย และไข้หวัดใหญ่ เนื่องจากอาการไข้อยู่ในระยะต้นของโรคกลุ่มดังกล่าวจะคล้ายกัน ส่วนใหญ่ไม่อาจแยกได้ว่าเป็นโรคใด จึงมีความจำเป็นต้องมีงานวิจัยเพื่อผลการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการยืนยันการวินิจฉัยอาการทางคลินิก จึงเป็นที่มาของแนวคิดที่จะพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถวินิจฉัยโรค dengue และโรค leptospirosis พร้อมกัน อีกทั้งมีการประเมินชุดทดสอบตามมาตรฐานของการผลิตชุดทดสอบ

โรค scrub typhus เป็นโรคติดเชื้อริกเกตเซีย (rickettsial disease) ชนิดหนึ่ง เกิดจากการติดเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* โรค scrub typhus เป็นโรคประจำถิ่นพบได้ทั่วภูมิภาคของโลก โดยส่วนใหญ่พบในเอเชียอาคเนย์ บริเวณขอบชายฝั่งเอเชีย-แปซิฟิกและออสเตรเลียตอนเหนือ คาดว่าน่าจะมีผู้ติดเชื้อประมาณล้านคนต่อปี สำหรับในประเทศไทย พบผู้ป่วยโรค scrub typhus ร้อยละ 19.9 ในกลุ่มไข้เฉียบพลัน อัตราตายร้อยละ น้อยกว่า 1 ถึง 50 ขึ้นอยู่กับผลการวินิจฉัยทางอาการและทางห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้มีตัวอย่างงาน 8 สายพันธุ์ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* คือ Karp, Kato/TA716, Gilliam, JG-v (Japanese Gilliam-variant), TA763, TA678, TA686, และ TH1817

เชื้อ *O. tsutsugamushi* เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติจัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีขนาดเล็กกว่าแบคทีเรียทั่วไป เชื้อเพิ่มจำนวนในเซลล์มีชีวิตเท่านั้น (obligatory intracellular parasite) คุณสมบัติทั่วไป ขนาดประมาณ 0.3x0.6 ไมโครเมตร อาจเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นคู่สายสั้นหรือสายยาว ผนังเซลล์ของ มี peptidoglycan อยู่ระหว่างชั้น outer membrane (OM) และ inner membrane (IM) และมีแคปซูลบาง ๆ ล้อมรอบนอกชั้น OM เชื้อไม่มี lipopolysaccharide ตามธรรมชาติ เชื้อติดอยู่ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ฟันแทะ ซึ่งส่วนมากคือ หนู เป็นแหล่งรังโรค และแพร่เชื้อ โดยไม่ทำให้หนูเกิดอาการของโรคแต่อย่างใด โดยมีตัวไรอ่อน (chigger) ของไร *Leptotrombidium sp.* โดยเฉพาะ *L. chiangraiensis* เป็นพาหะนำโรค เชื้อจะถูกถ่ายทอดไปอยู่ในวงจรชีวิตของไร โดยไรเต็มวัยตัวเมียที่ติดเชื้อจะแพร่กระจายเชื้อผ่านรังไข่ไปสู่ไรตัวอ่อนรุ่นต่อไป ดังนั้นไรจะเป็นทั้งพาหะและแหล่งเก็บเชื้อด้วย คนที่ถูกไรตัวอ่อนที่มีเชื้อกัดจะมีระยะฟักตัวของโรค ประมาณ 5-14 วัน อาการของโรค คือ ไข้ ปวดศีรษะ และหนาวสั่น ผื่นขึ้นที่ลำคอก่อนแล้วกระจายไปแขนขา โดยมีอัตราการเสียชีวิตร้อยละ 1-60 แผลที่เกิดจากการกัดของไรตัวอ่อนจะกลายเป็นแผลไหม้คล้ายถูกบุหรี่จี้และรอบแผลบวมแดง เรียกว่าแผล eschar มักพบบ่อยที่บริเวณรักแร้ ขาหนีบและรอบเอว อาจพบหรือไม่พบก็ได้ เนื่องจากพบแผล eschar ในผู้ป่วยได้เพียงร้อยละ 20-50 เท่านั้น

โรค scrub typhus มักถูกจัดให้ไปอยู่ในกลุ่มของโรคไข้นอกระบบสาเหตุ ที่มีอาการและอาการแสดงคล้ายกัน ทำให้ไม่สามารถให้การตรวจวินิจฉัยโรคได้จากการสังเกตทางอาการเพียงอย่างเดียว การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี ดังนี้ การตรวจตัวอย่างตรวจโดยตรง ตรวจหาเชื้อโดยการย้อมสี Giemsa, Macchiavello หรือ Gimenez ในขั้นเนื่องจากผู้ป่วยหรือผู้เสียชีวิต หรือโดยการย้อมกับแอนติบอดีจำเพาะด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยโรคสำหรับผู้ป่วย การแยกเชื้อไข้อย่างตรวจที่เหมาะสม คือ เลือดในระยะมีไข้อยู่ในสัปดาห์แรกที่ได้รับป่วย วิธีที่นิยมคือฉีดตัวอย่างตรวจเข้าช่องท้องของหนูขาว หรือถุงไข่แดงของไข่ไก่ฟักอายุ 5-7 วัน หรือแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง primary cell culture, MRC-5 และ HeLa cell line การตรวจหาแอนติบอดีต่อโรค scrub typhus ซึ่งในปัจจุบันมี

หลายวิธี เช่น วิธี Weil-Felix เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะต่ำจึงไม่นิยมใช้ ส่วนวิธี IFA (Indirect immunofluorescence assay) และวิธี IIP (Indirect immunoperoxidase test) มีความไวและความจำเพาะที่ดีกว่า นอกจากนี้ยังมีวิธี ELISA, passive hemagglutination tests, neutralization test, และ toxin neutralization test แอนติเจนที่ใช้ในห้องปฏิบัติการจากการสกัดโปรตีนของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ในเซลล์เพาะเลี้ยง โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีคือ OMP ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 53 – 63 kDa โดยเฉพาะโปรตีนขนาด 56 kDa ซึ่งนำมาผลิตเป็น recombinant protein สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายไทย ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยโรคสครับไทฟัสอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาการระบาดของโรคนี้ พบการระบาดในกลุ่มทหารที่ออกฝึก ในพื้นที่อำเภอบ่อทอง จังหวัดชลบุรี เมื่อ ปี 2545 พบว่าทหารป่วยด้วยโรคสครับไทฟัส ร้อยละ 10 จากทหารที่ป่วยด้วยอาการไข้เฉียบพลัน ข้อมูลจากกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข พบว่ามีผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมา ในปัจจุบันประเทศไทยพบผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน มากกว่า 370,000 คนต่อปี จากการศึกษาของโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ร่วมกับ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ฝ่ายไทย พบผู้ป่วยโรค สครับไทฟัสในกลุ่มผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ร้อยละ 34 และจากการศึกษาของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร พบผู้ป่วยเด็กไข้เฉียบพลันที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลนคร พิงค์ จังหวัดเชียงใหม่ ป่วยด้วยโรคสครับไทฟัส ร้อยละ 47

วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์และคณะ ได้พัฒนาวิธี dot-ELISA (dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [34,35] เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส วิธี dot-ELISA เป็นวิธี ที่มีขั้นตอนการทำที่ง่าย รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะสูง ที่สำคัญคือสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่าอย่างชัดเจน ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง หรือหาได้ยาก หรือต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญในการอ่านผล สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ การแพทย์ทหาร ได้รับสิทธิบัตร การประดิษฐ์ จากกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ และได้พัฒนาต่อเนื่อง “ชุดตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส ชนิดเร็ว โดยวิธี dot-ELISA” มีความไวร้อยละ 99.49 ความจำเพาะร้อยละ 98.92 ค่าประสิทธิภาพร้อยละ 99.00 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 95.63 และค่าทำนายผลลบ 99.88 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน IFA

โรคเลปโตสไปโรซิส หรือไข้ฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน ซึ่งมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียรูปร่างเกลียวสปิชีส์ *Leptospira interrogans* สัตว์ที่รอดชีวิตจากการติดเชื้อจะกลายเป็นพาหะเรื้อรังซึ่งจะเป็นรังโรคของเชื้อต่อไป สัตว์ที่มีการติดเชื้อและเป็นพาหะสามารถปลดปล่อยเชื้อทางปัสสาวะและอุจจาระ ซึ่งจะปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นชั่วโมง หรือหลาย ๆ วันในดิน น้ำ นม โคลน และสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ การติดต่อกับคนโดยการสัมผัสกับสิ่งต่าง ๆ ที่ปนเปื้อนเชื้อ เชื้อสามารถเข้าทางแผลและเยื่อเมือกได้ โรคเลปโตสไปโรซิสพบได้ทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยพบผู้ป่วยประปรายอยู่ทุกภาคของประเทศ ต่อมาโรคนี้ได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข เนื่องจากได้พบผู้ป่วยจำนวนมากและมีอาการรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปี พ.ศ. 2539 ได้มีการระบาดของโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซิสมีอาการตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงรุนแรง และมักจะไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากโรคไข้อื่น ๆ เช่น dengue, influenza, hantavirus infection, malaria และ rickettsioses ได้ หากวินิจฉัยพลาด อาจเกิดอันตรายต่อผู้ป่วยได้ แต่อย่างไรก็ตาม โรคเลปโตสไปโรซิส สามารถรักษาให้หายได้ด้วยยาปฏิชีวนะ หากวินิจฉัยได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส อย่างรวดเร็วและถูกต้อง จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ทางห้องปฏิบัติการ คือการตรวจหาแอนติบอดี Lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อเลปโตสไปราเป็นแอนติเจน ที่นิยมศึกษา และทำการวิจัย เนื่องจากเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) แต่อย่างไรก็ตามการนำ LPS มาเป็นแอนติเจนยังคงมีข้อ

จำกัดเนื่องจากบริเวณคาร์โบไฮเดรต side chain ของ LPS นั้นมีผลต่อ antigenic diversity ของเชื้อแต่ละซีโรวาร์ จึงต้องมีการพัฒนาวิธีในการวินิจฉัยโดยที่แอนติเจนนั้นต้องมีความ conserve สูงระหว่างซีโรวาร์ โดยเฉพาะในสายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้น outer membrane proteins จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการวิจัย ซึ่ง outer membrane proteins (OMPs) ของเชื้อเลปโตสไปร่ามีความ conserve สูงระหว่างซีโรวาร์สายพันธุ์ที่ก่อโรค และเป็นส่วนที่สำคัญในการก่อพยาธิสภาพของโรคเนื่องจากเป็นบริเวณที่สัมผัสกับ mammalian host สำหรับ OMP ประกอบ ด้วย transmembrane outer membrane protein ซึ่งจะแทรกตัวอยู่ในชั้นของ outer membrane และ lipoproteins ซึ่งเป็นชนิดโปรตีนส่วนใหญ่บน outer membrane ในปัจจุบันมี lipoprotein เพียงสิบกว่าชนิด ที่ได้มีการศึกษาคุณลักษณะ และพบว่ามีความสมบัติเป็น protective immunogen เช่น LipL21, LipL32, LipL41, LipL46, LigB ได้มีการนำเทคนิครีคอมบิแนนท์ มาใช้กับ outer membrane proteins เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยทางซีโรโลยี เช่น งานวิจัยเกี่ยวกับรีคอมบิแนนท์ OmpL1, LipL41 และ LipL32 มีตัวอย่างงานที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า immunoglobulin M immunoblot (IgM-IB) assay ที่แสดงแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำในช่วงประมาณ 14-25 kDa ของเลปโตสไปร่า ที่ให้ผล reactivity กับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยช่วงระยะต้น (acute phase) ของโรคเลปโตสไปโรสิส มากกว่า 85% อุไรวรรณ โฆษิตานนท์ และคณะ ได้สกัดไลโปโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ให้ทำปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมระยะต้นของโรค จากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง พบว่าโปรตีนขนาดโมเลกุล 25 kDa ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีชนิด IgM ในทุกซีรัมทดสอบ และไม่พบปฏิกิริยาทางอิมมูนกับแอนติบอดีในซีรัมจากผู้ป่วยโรคอื่นที่ไม่ใช่เลปโตสไปโรสิส 13 ตัวอย่าง และซีรัมจากคนปกติ 10 ตัวอย่างสำหรับการทำ 2-DE ร่วมกับ immunoblot กับซีรัมหลายตัวอย่างรวมกันของระยะต้นของโรคจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรสิส พบว่า จุดของโปรตีนที่ให้ปฏิกิริยาทางอิมมูนต่อ IgM แอนติบอดี เป็นจุดโปรตีนที่ขนาด 25, 35, 36, 37, 38, 45 และ 50 kDa

กัลยานี ดวงฉวี และคณะ ได้สกัด Leptospira lipopolysaccharides ขนาดโมเลกุลระหว่าง 19-24 kDa ที่มีความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสตั้งแต่แรกป่วย ได้มีการพัฒนาชุดตรวจด้วยแบบ immunochromatography (IC) ได้เป็น “ชุดตรวจโรคฉี่หนูชนิดรวดเร็ว (LEPkit)” ที่สามารถนำไปตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรสิสในซีรัมของผู้ป่วย และเป็นชุดที่อยู่ระหว่างการยื่นจดสิทธิบัตรการประดิษฐ์จากกรมทรัพย์สินทางปัญญา ที่สามารถนำไปใช้งานได้อย่างสะดวกในห้องปฏิบัติการทั่วไปทุกพื้นที่ เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีเพื่อวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในซีรัมของผู้ป่วย ชุดตรวจนี้มีประสิทธิภาพด้วยความไว (sensitivity) ร้อยละ 98 และความจำเพาะ (specificity) ร้อยละ 96 ซึ่งสูงกว่าวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน กล่าวโดยสรุป คือ โปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa และ lipopolysaccharides ขนาดโมเลกุล 19-24 kDa มีความศักยภาพที่นำไปพัฒนาเทคนิคเป็นแอนติเจนสำหรับการวินิจฉัยระยะต้นของโรคเลปโตสไปโรสิสได้

โรคเด็งกี (Dengue, Dengue disease) จัดเป็นโรคที่สำคัญในมนุษย์และยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเขตร้อนแถบศูนย์สูตร เชื้อก่อโรคคือเชื้อไวรัสเด็งกีจัดอยู่ในแฟมิลี *Flaviviridae* ยีนส์ *Flavivirus* มีทั้งหมด 4 ซีโรทัยป์ คือ 1, 2, 3 และ 4 ยีนส์มีการเรียงตัวจากปลาย 5' ไปทางด้านปลาย 3' ดังนี้ 5'-nontranslated region (NTR) - capsid (C) - pre-membrane/membrane (prM/M) - envelope (E) - non-structural protein 1 (NS1) - (NS2A) - (NS2B) - (NS3) - (NS4A) - (NS4B) - (NS5) - 3' NTR โดยตลอดจีโนมมีเพียง 1 open reading frame (ORF) ซึ่งโปรตีนทั้งหมดจะถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนสายยาวตั้งต้น ไวรัสเด็งกีสามารถก่อให้เกิดโรคที่มีอาการความรุนแรงแตกต่างกันได้หลายรูปแบบ ตั้งแต่ อาการไข้ไม่จำเพาะต่อโรคใด

(Undifferentiated fever) ไข้เด็งกี (Dengue fever, DF) ไปจนถึงอาการรุนแรงอย่างเช่น ไข้เลือดออกเด็งกี (Dengue hemorrhagic fever, DHF) ซึ่งในตัวอย่างที่มีอาการรุนแรงมากอาจช็อค (Dengue shock syndrome, DSS) และเสียชีวิตได้ การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเด็งกีทางห้องปฏิบัติการ วิธีทดสอบที่นิยมใช้ คือการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัส แอนติบอดีที่เกิดขึ้นหลังจากการติดเชื้อ ได้แก่ แอนติบอดีต่อ E, NS1, prM, C, และ NS3 ของไวรัส ห้องปฏิบัติการทั่วไปแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบ มักใช้โปรตีนทั้งหมดของไวรัสจากการเลี้ยงไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง ข้อดีคือมีโปรตีนทั้งหมดของไวรัส อย่างไรก็ตามมีข้อเสียเนื่องจากแอนติเจนข้ามปฏิกิริยา (cross reaction) ในกลุ่มสมาชิกของยีนส์หรือแฟมิลีเดียวกันได้ จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งในการผลิต รีคอมบิแนนท์โปรตีนของโปรตีนจำเพาะของไวรัสที่สำคัญ คือ NS1 และ glycoprotein E

อุไรวรรณ โฆษิตานนท์ และคณะ ตัวอย่างงานว่าได้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน NS1 และ E (EDIII) สำหรับการศึกษาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน NS1 โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเด็งกี และตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันผลจากห้องปฏิบัติการว่าติดเชื้อไวรัสเด็งกี พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน NS1 สามารถจับกับแอนติบอดีในตัวอย่างทั้งหมดได้อย่างจำเพาะเจาะจง และเมื่อนำมาตรวจหาปฏิกิริยาต่อแอนติบอดีชนิด IgM และ/หรือ IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ รวมทั้งผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีด้วยวิธี Western blot (NS1Ag-WB) พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน NS1 สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ/หรือ IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์ทั้งแบบที่เป็นการติดเชื้อครั้งแรก และการติดเชื้อซ้ำได้ โดยความไวและความจำเพาะทางห้องปฏิบัติการของวิธี NS1Ag-WB สำหรับการตรวจหา IgM คิดเป็นร้อยละ 100 และร้อยละ 100 ตามลำดับ ในขณะที่ความไวและความจำเพาะสำหรับการตรวจหา IgG คิดเป็นร้อยละ 100 และร้อยละ 88.2 ตามลำดับ สำหรับการศึกษาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน EDIII สามารถทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสเด็งกีได้ [] และเมื่อนำมาตรวจหาปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีทุกซีโรทัยป์ รวมทั้งผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัสเด็งกีด้วย วิธี Dot blot assay (EDIII Ag-DB) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน EDIII สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้งชนิด IgM และ/หรือ IgG ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีทุกซีโรทัยป์ทั้งแบบติดเชื้อ primary และ secondary การเปรียบเทียบความไวทางห้องปฏิบัติการของวิธี ELISA และ EDIII Ag-DB โดยใช้ผลการเพาะแยกเชื้อ (virus isolation) เป็น gold standard สำหรับการตรวจหา IgM คิดเป็นร้อยละ 84 และ 87 ตามลำดับ ในขณะที่ความไวสำหรับการตรวจหา IgG คิดเป็นร้อยละ 78 และ 91 ตามลำดับ ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน NS1 และรีคอมบิแนนท์โปรตีน EDIII สามารถนำมาเป็นแอนติเจนสำหรับตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี ทั้งแบบการติดเชื้อครั้งแรก และการติดเชื้อซ้ำได้

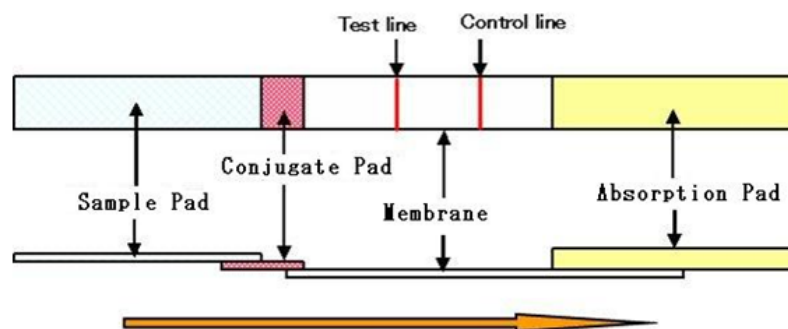
ผลงานวิจัยของโครงการ

สืบเนื่องจากการความเห็นของผู้เชี่ยวชาญในการประชุมของ EID Forum วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2559 ได้สรุปจากที่ประชุมว่า โครงการนี้ให้พัฒนาเฉพาะชุดตรวจของเชื้อสครับไทฟัส (single test) เท่านั้น

หลักการของ immunochromatographic test

โดยวิธี Immunochromatographic based gold nanoparticles test เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM/IgG Immunochromatographic test (ICT) เป็นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญและอุปกรณ์อื่น ๆ ที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังสะดวกและได้ผลในระยะเวลาอันรวดเร็วภายใน 5-15 นาที

หลักการของวิธี ICT ประกอบด้วยตัวกลางยึดเกาะ (solid phase) ซึ่งมีแผ่นกระดาษอาจใช้ nitrocellulose membrane หรือ nylon ส่วนแรกของแผ่นกระดาษ คือ Sample pad สำหรับหยดตัวอย่างตรวจซีรัม ซีรัมเคลื่อนที่ไปยังส่วนที่สอง Conjugate pad ภายในมี anti-human IgM หรือ IgG แล้วแต่กรณีที่ตรวจหา IgM หรือ IgG จำเพาะต่อเชื้อ ที่ปิดฉลากไว้กับผงทอง (colloidal gold) และส่วนที่สามภายในมีเส้น Test line ที่ตรึงแอนติเจนของแต่ละโรค และเส้น Control line ซึ่งมี Protein A ที่สามารถจับกับ anti-human IgM หรือ IgG ที่ปิดฉลากไว้กับผงทอง ที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยา หากมีแอนติบอดีชนิด IgM ในซีรัมจะมีปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดี กลายเป็นตะกอนอิมมูน (immune complex) ซึ่งเคลื่อนที่ไปยังส่วนที่สาม ตะกอนอิมมูนที่มี IgM ถูกจับด้วยแอนติเจนบนเส้น Test line จากการจับกันของตะกอนอิมมูน ซึ่งมีผงทองจะปรากฏเป็นเส้นแดงของผงทองบนเส้น Test line สำหรับ anti-human IgM หรือ IgG ที่ปิดฉลากไว้กับผงทองที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาจับกับ Protein A บนเส้น Control line จะปรากฏเป็นเส้นแดงของผงทองเช่นกัน



การผลิตชุดทดสอบของโรคสครับไทฟัส/โรคเลปโตสไปโรสิส/โรคเด็งกี

1. การผลิตชุดทดสอบของโรคสครับไทฟัส

1.1 ขั้นตอนการผลิตแอนติเจนจาก เชื้อ *Orientia tsutsugamushi* (โรคสครับไทฟัส)

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน 56kDa type-specific antigen

ได้การออกแบบไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง 56kDa type-specific antigen โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa จาก *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เพิ่ม นิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* ไว้ด้วย

Karp	(71)	AATTGGGG---GAAGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
Kato	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
Gilliam	(71)	AATTGGGTGAGGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC
TA716	(71)	AATTGGGTGATGAAGGCCGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAGAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
Lc-1	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
FPW1038	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
FPW2016	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
FPW2031	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
FPW2049	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT76	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT125	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT144	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT150	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT167	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT169	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT176	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC
UT177	(71)	AATTGGGTGAGGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC
UT196	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT213	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT219	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT221	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT302	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC
UT316	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT329	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC
UT332	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT336	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT395	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
UT418	(71)	AATTAGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC
Consensus	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTCGTTGGAGGAATGATTAC

รูปที่ 1.1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen จาก *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ต่าง ๆ

การโคลนและการผลิตโปรตีน

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam โดยเชื้อทั้งหมดนั้นได้รับความอนุเคราะห์จากพันเอกวุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบเพื่อจำลองยีน 56kDa type-specific antigen ด้วยเทคนิคโพลีเมอร์เชนรีเอคชัน (Polymerase chain reaction, PCR) หลังจากนั้นนำยีนที่ได้รับการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีดังกล่าวของแต่ละสายพันธุ์ไปย่อย

ด้วย restriction enzyme *NdeI* และ *XhoI* ก่อนนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิดที่ได้รับการย่อยด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนที่จำลองขึ้นมาเข้ากับพลาสมิด ด้วย ligase หลังจากนั้นนำเข้าสู่ *Escherichia coli* BL21(DE3) ด้วยวิธี Heat-shock transformation เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน 56kDa type-specific antigen ด้วยเทคนิค PCR และ restriction fragment analysis จาก *NdeI* และ *XhoI* สุดท้ายแล้วจึงได้ recombinant *E. coli* โคลนต่างๆ ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 56kDa type-specific antigen ของสายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ใน NCBI database เท่ากับ 97.8%, 97.7% และ 97.4% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่

1.2 - 1.4

การสร้างโปรตีน 56kDa type-specific antigen

นำ recombinant *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 56kDa type-specific antigen ของสายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำการเพิ่มจำนวนต่อใน 200mL ของ LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง (เพื่อให้ได้ OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5) หลังจากนั้นทำการเติม IPTG เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1mM แล้วทำการเลี้ยงต่อเนื่องไปอีก 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วย Phosphate buffer saline (PBS)

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำการแตกผนังเซลล์ด้วยคลื่นเสียง ทำการล้างตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 1% Triton x-100 ใน PBS แล้วทำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย 5mL ของ 6M guanidine-HCl ใน 50mM sodium Phosphate, 300mM sodium chloride, 10mM imidazole; pH 7.4 เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไปใส่ใน cobalt resin column โดยปล่อยให้สารละลายวิ่งผ่านจนหมดแล้วทำการล้างด้วย 30mL ของ 6M guanidine-HCl ใน 50 mM sodium Phosphate, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole; pH 7.4 ตามด้วย 30 mL ของ 6M guanidine-HCl ใน 50 mM sodium Phosphate, 300 mM sodium chloride, 30 mM imidazole; pH 7.4 หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนที่เกาะบน cobalt resin ด้วย 15 mL ของ 6M guanidine-HCl ใน 50 mM sodium Phosphate, 300 mM sodium chloride, 150 mM imidazole; pH 7.4 โดยทำการเก็บสารละลายที่ได้จากการชะครั้งสุดท้ายไป (ประกอบด้วยโปรตีน 56kDa type-specific antigen ที่บริสุทธิ์แล้ว) ทำการเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลาย PBS (pH7.4) และทำการเพิ่มความเข้มข้นด้วย column concentrator (molecular weight cutoff at 10 kDa)

		1	70
Karp	(1)	ATGAAAAAATATATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCGTTGTCGTTGCCATTTTCAGCTAGTGCAATAG	
Recombinant-Karp	(1)	-----CATATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCGTTGTCGTTGCCATTTTCAGCTAGTGCAATAG	
Consensus	(1)	TATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCGTTGTCGTTGCCATTTTCAGCTAGTGCAATAG	
		71	140
Karp	(71)	AATTGGGGGAAGAAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTGTTGGAGGAATGATTACTGG	
Recombinant-Karp	(62)	AATTGGGGGAAGAAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTGTTGGAGGAATGATTACTGG	
Consensus	(71)	AATTGGGGGAAGAAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTTGTTGGAGGAATGATTACTGG	
		141	210
Karp	(141)	CGTAGAATCTGCTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGAAGGCAAAAAACACTTGTCAATTAACAAATGGGCTG	
Recombinant-Karp	(132)	CGTAGAATCTGCTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGAAGGCAAAAAACACTTGTCAATTAACAAATGGGCTG	
Consensus	(141)	CGTAGAATCTGCTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGAAGGCAAAAAACACTTGTCAATTAACAAATGGGCTG	
		211	280
Karp	(211)	CCATTTGGTGGAAACGTTGGCTGCAGGTATGACAATCGCTCCAGGATTTAGAGCAGAGATAGGTGTTATGT	
Recombinant-Karp	(202)	CCATTTGGTGGAAACGTTGGCTGCAGGTATGACAATCGCTCCAGGATTTAGAGCAGAGATAGGTGTTATGT	
Consensus	(211)	CCATTTGGTGGAAACGTTGGCTGCAGGTATGACAATCGCTCCAGGATTTAGAGCAGAGATAGGTGTTATGT	
		281	350
Karp	(281)	ACCTTACAAATATAACTGCTCAGGTGGAAGAAGGTAAGTTAAGGCAGATTCTGTAGGTGAGACAAAGGC	
Recombinant-Karp	(272)	ACCTTACAAATATAACTGCTCAGGTGGAAGAAGGTAAGTTAAGGCAGATTCTGTAGGTGAGACAAAGGC	
Consensus	(281)	ACCTTACAAATATAACTGCTCAGGTGGAAGAAGGTAAGTTAAGGCAGATTCTGTAGGTGAGACAAAGGC	
		351	420
Karp	(351)	AGATTCTGTAGGTGGGAAAGATGCTCCTATACGTAAGCGGTTTAAACTTACACCTCCTCAGCCTACTATA	
Recombinant-Karp	(342)	AGATTCTGTAGGTGGGAAAGATGCTCCTATACGTAAGCGGTTTAAACTTACACCTCCTCAGCCTACTATA	
Consensus	(351)	AGATTCTGTAGGTGGGAAAGATGCTCCTATACGTAAGCGGTTTAAACTTACACCTCCTCAGCCTACTATA	
		421	490
Karp	(421)	ATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGACTTTGGGATTGATATTCCTAACATACCTCAGCAGCAAGCACAAAG	
Recombinant-Karp	(412)	ATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGACTTTGGGATTGATATTCCTAACATACCTCAGCAGCAAGCACAAAG	
Consensus	(421)	ATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGACTTTGGGATTGATATTCCTAACATACCTCAGCAGCAAGCACAAAG	

รูปที่ 1.2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen ระหว่าง *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Karp และ recombinant clone

		1	70
Kato	(1)	ATGAAAAAATATATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCGGATAG	
recombinant-kato	(1)	-----CATATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCGGATAG	
Consensus	(1)	TATGTTAATTGCTAGTGCAATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCGGATAG	
		71	140
Kato	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTCGTTGGAGGAATGATTAC	
recombinant-kato	(62)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTCGTTGGAGGAATGATTAC	
Consensus	(71)	AATTGGGGGATGAAGGAGGATTAGAGTGTGGTCCCTTATGCTAAAGTTGGAGTCGTTGGAGGAATGATTAC	
		141	210
Kato	(141)	TGGCGTAGAATCTACTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGGTGGCAAAAAACAAATGGCCATTAAACAACCTCG	
recombinant-kato	(132)	TGGCGTAGAATCTACTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGGTGGCAAAAAACAAATGGCCATTAAACAACCTCG	
Consensus	(141)	TGGCGTAGAATCTACTCGCTTGGATCCAGCTGATGCTGGTGGCAAAAAACAAATGGCCATTAAACAACCTCG	
		211	280
Kato	(211)	ATGCCATTGGTGGTACATTAGTGCAGGTATGACAATCGCGCCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGGGTTA	
recombinant-kato	(202)	ATGCCATTGGTGGTACATTAGTGCAGGTATGACAATCGCGCCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGGGTTA	
Consensus	(211)	ATGCCATTGGTGGTACATTAGTGCAGGTATGACAATCGCGCCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGGGTTA	
		281	350
Kato	(281)	TGTACCTTGCGAATGTAAAAGCAGAGGTGGAATCAGGTAAAACCTGGCTCTGATGCTGATATTAGATCTGG	
recombinant-kato	(272)	TGTACCTTGCGAATGTAAAAGCAGAGGTGGAATCAGGTAAAACCTGGCTCTGATGCTGATATTAGATCTGG	
Consensus	(281)	TGTACCTTGCGAATGTAAAAGCAGAGGTGGAATCAGGTAAAACCTGGCTCTGATGCTGATATTAGATCTGG	
		351	420
Kato	(351)	TGCAGATTCTCCTATGCCTCAGCGGTATAAACTTACACCACCTCAGCCTACTATAATGCCTATAAGTATT	
recombinant-kato	(342)	TGCAGATTCTCCTATGCCTCAGCGGTATAAACTTACACCACCTCAGCCTACTATAATGCCTATAAGTATT	
Consensus	(351)	TGCAGATTCTCCTATGCCTCAGCGGTATAAACTTACACCACCTCAGCCTACTATAATGCCTATAAGTATT	
		421	490
Kato	(421)	GCGGATCGTGACCTTGGGGTTGATATTCCTAACGTACCTCAAGGAGGAGCTAATCACCTGGGTGATAACC	
recombinant-kato	(412)	GCGGATCGTGACCTTGGGGTTGATATTCCTAACGTACCTCAAGGAGGAGCTAATCACCTGGGTGATAACC	
Consensus	(421)	GCGGATCGTGACCTTGGGGTTGATATTCCTAACGTACCTCAAGGAGGAGCTAATCACCTGGGTGATAACC	
		491	560
Kato	(491)	TTGGTGCTAATGATATTGCGCGTGCTGACGATAGGATCACTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTGTGACTA	
recombinant-kato	(482)	TTGGTGCTAATGATATTGCGCGTGCTGACGATAGGATCACTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTGTGACTA	
Consensus	(491)	TTGGTGCTAATGATATTGCGCGTGCTGACGATAGGATCACTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTGTGACTA	

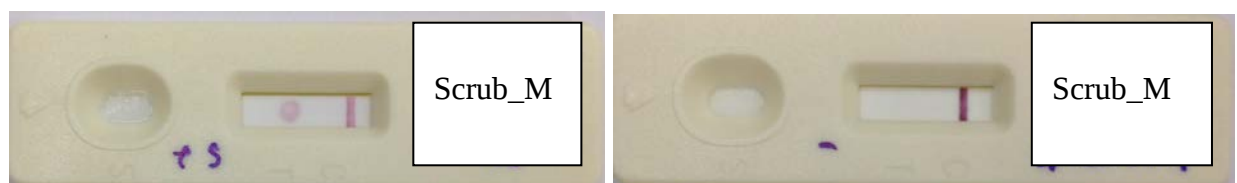
รูปที่ 1.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56kDa type-specific antigen ระหว่าง *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Kato และ recombinant clone

		1	70
Gilliam	(1)	ATGAAAAAATATATGTTAATTGCTAGTGCATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCAATAG	
recombinant-gilliam	(1)	-----CATATGTTAATTGCTAGTGCATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCAATAG	
Consensus	(1)	TATGTTAATTGCTAGTGCATGTCTGCATTGTCATTGCCGTTTTCAGCTAGTGCAATAG	
		71	140
Gilliam	(71)	AATTGGGTGAGGAAGGAGGATAGAGTGTGGTCCCTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC	
recombinant-gilliam	(62)	AATTGGGTGAGGAAGGAGGATAGAGTGTGGTCCCTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC	
Consensus	(71)	AATTGGGTGAGGAAGGAGGATAGAGTGTGGTCCCTACGGTAAAGTTGGAATCGTTGGAGGAATGATTAC	
		141	210
Gilliam	(141)	TGGTGCAGAATCTACTCGCTTGGATTCAACTGATTCTGAGGGAAAAAACATTGTTCATTAACTGGA	
recombinant-gilliam	(132)	TGGTGCAGAATCTACTCGCTTGGATTCAACTGATTCTGAGGGAAAAAACATTGTTCATTAACTGGA	
Consensus	(141)	TGGTGCAGAATCTACTCGCTTGGATTCAACTGATTCTGAGGGAAAAAACATTGTTCATTAACTGGA	
		211	280
Gilliam	(211)	CTGCCATTGGTGTACATTAGCTGCGGGTATGACAATTGCACCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGTGTTA	
recombinant-gilliam	(202)	CTGCCATTGGTGTACATTAGCTGCGGGTATGACAATTGCACCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGTGTTA	
Consensus	(211)	CTGCCATTGGTGTACATTAGCTGCGGGTATGACAATTGCACCAGGATTTAGAGCAGAGCTAGGTGTTA	
		281	350
Gilliam	(281)	TGTACCTTAGAAATATAAGCGCTGAGGTTGAAGTAGGTAAAGGCAAGGTAGATTCTAAAGGTGAGATAAA	
recombinant-gilliam	(272)	TGTACCTTAGAAATATAAGCGCTGAGGTTGAAGTAGGTAAAGGCAAGGTAGATTCTAAAGGTGAGATAAA	
Consensus	(281)	TGTACCTTAGAAATATAAGCGCTGAGGTTGAAGTAGGTAAAGGCAAGGTAGATTCTAAAGGTGAGATAAA	
		351	420
Gilliam	(351)	GGCAGATTCTGGAGGTGGGACAGATACTCCTATACGTAAGCGGTTTAACTTACACCACCTCAGCCTACT	
recombinant-gilliam	(342)	GGCAGATTCTGGAGGTGGGACAGATACTCCTATACGTAAGCGGTTTAACTTACACCACCTCAGCCTACT	
Consensus	(351)	GGCAGATTCTGGAGGTGGGACAGATACTCCTATACGTAAGCGGTTTAACTTACACCACCTCAGCCTACT	
		421	490
Gilliam	(421)	ATAATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGATGTGGGGTTGATACTGATATTCTTGCTCAAGCTGCTGCTG	
recombinant-gilliam	(412)	ATAATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGATGTGGGGTTGATACTGATATTCTTGCTCAAGCTGCTGCTG	
Consensus	(421)	ATAATGCCTATAAGTATAGCTGATCGTGATGTGGGGTTGATACTGATATTCTTGCTCAAGCTGCTGCTG	
		491	560
Gilliam	(491)	GGCAACCACGGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGCAGATAGGATCGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTAT	
recombinant-gilliam	(482)	GGCAACCACGGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGCAGATAGGATCGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTAT	
Consensus	(491)	GGCAACCACGGCTTACTGTTGAGCAGCGGGCTGCAGATAGGATCGCTTGGTTGAAGAATTATGCTGGTAT	

รูปที่ 1.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 56 kDa type-specific antigen ระหว่าง *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Gilliam และ recombinant clone

1.2 การทดสอบ immunoreactivity ของ recombinant 56 kDa proteins

ในการพัฒนาทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยอดแอนติเจนเอง (version 1)



ผลบวก

ผลลบ

การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM ของ recombinant 56 kDa proteins ของทั้งสามสายพันธุ์

ผลการทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM ของ recombinant 56 kDa proteins ของทั้งสามสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1.1 โดยทดสอบกับซีรัมจากผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส จำนวน 8 ตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay (IFA) ($\text{titer} \geq 1:400$) ผลการศึกษา พบว่า recombinant 56 kDa proteins ทั้งสามสายพันธุ์ สามารถให้ปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมจากผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสทุกซีรัม ยกเว้นผู้ป่วย Kato (ลำดับที่ 13) ในซีรัมแรก (S1) ซึ่งมีผลของ IFA เป็นลบ ($\text{titer} 1:100$) ให้ผลบวกเฉพาะ recombinant Kato เท่านั้น นอกจากนี้ทดสอบกับซีรัมจากผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรคสครับไทฟัส จำนวน 24 ตัวอย่าง ผลการทดลอง พบว่า recombinant 56 kDa proteins ทั้งสามสายพันธุ์ ให้ผลลบในปฏิกิริยาอิมมูโนชนิด IgM ในทุกซีรัม

จากผลการทดสอบชี้ว่า recombinant 56 kDa proteins ทั้งสามสายพันธุ์ สามารถใช้เป็นแอนติเจนได้ดีในการตรวจหาแอนติบอดีต่อทั้งสามสายพันธุ์ของเชื้อ *O. tsutsugamushi*

ตารางที่ 1.1 IgM immunoreactivity ของ recombinant 56 kDa proteins จาก *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Kato, Karp และ Gilliam

No.	Positive serum	S1/S2	Result IFA	r-KATO	r-KARP	r-Gilliam
1	KARP, CMP02	S1	IgM 1:1600	3+	1+	1+
2	KARP, CMP02	S2	IgM 1:3200	3+	3+	3+
3	KARP, CMP09	S1	IgM 1:400	3+	3+	3+
4	KARP, CMP09	S2	IgM 1:800	3+	3+	3+
5	KARP, CMP27	S1	IgM 1:1600	3+	3+	3+
6	KARP, CMP27	S2	IgM 1:1600	3+	3+	3+
7	GL, CMP40	S1	IgM 1:200	2+	2+	1+
8	GL, CMP40	S2	IgM 1:400	3+	2+	3+
9	GL, CMP33	S1	IgM 1:1600	3+	3+	2+
10	GL, CMP33	S2	IgM 1:3200	3+	3+	2+
11	GL, CMP39	S1	IgM 1:400	1+	1+	1+
12	GL, CMP39	S2	IgM 1:1600	1+	1+	1+
13	KATO, CMP24	S1	IgM 1:100	1+	—	—
14	KATO, CMP24	S2	IgM 1:400	1+	2+	2+
15	KATO, CMP04	S1	IgM 1:400	3+	2+	1+
16	KATO, CMP04	S2	IgM 1:800	3+	3+	1+

Note: GL = Gilliam; S1 = First serum; S2 = Second serum

การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pooled recombinant 56 kDa proteins (Pooled Ag)

การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pooled recombinant 56 kDa proteins (Pooled Ag) ในปฏิกิริยาอิมมูโนชนิด IgM ทั้งผลบวกและผลลบจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay (IFA) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Pooled recombinant 56 kDa proteins ของทั้งสามสายพันธุ์ (Pooled Ag) คือ 0.1 mg/mL

การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM ของ recombinant 56 kDa proteins กับซีรัมที่มีแอนติบอดีต่อ TA716 และต่อ TA763

โรคสครับไทฟัส เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยกเว้นคนเป็นแหล่งรังโรค เช่น หนู สุนัข และ วัว เป็นต้น หนูเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญที่สุดนอกจากเป็นแหล่งที่ให้เชื้อ *Orientia tsutsugamushi* อาศัยอยู่ภายในอวัยวะต่างๆ เช่น เลือด ตับ และม้าม ยังให้ไรอ่อน (chigger) ซึ่งมีเชื้อ *O. tsutsugamushi* อาศัยอยู่ด้วย ในประเทศไทย เชื้อ *O. tsutsugamushi* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคสครับไทฟัส มักพบสามสายพันธุ์ (prototype strains) ของ Karp, Kato และ Gilliam อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างงานการแยกเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์อื่นๆ ได้ในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น หนูท่อ หนู พุก หนูพาน กระแตไต่ และกระจอน เป็นต้น สายพันธุ์อื่นๆ ที่สำคัญ ได้แก่ TA763, TA716, TA678 และ TA686

การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM ของ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato, Gilliam และ Pooled recombinant 56 kDa proteins (Pooled Ag) กับซีรัมคู่ที่มี seroconversion ของแอนติบอดีต่อ TA716 (CMP25) และต่อ TA763 (CMP45) ดังแสดงในตารางที่ 1.2 ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay (IFA) (titer $\geq 1:400$) พบว่าซีรัมแรก (S1) ของ CMP25 ซึ่งมีผลบวกกับ แอนติเจน TA716 ด้วยวิธี IFA ใน IgM-IFA (1:50) จะให้ผลลบ กับ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato และ Pooled Ag ยกเว้น recombinant 56 kDa proteins ของ Gilliam ซึ่งให้ผลบวก สำหรับ IgG-IFA (1:50) ให้ผลลบตรงกัน กับ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato และ Pooled Ag สำหรับซีรัมสอง (S2) ของ CMP25 ให้ผลบวกต่อ แอนติเจนทุกชนิด

ซีรัมแรก (S1) และซีรัมสอง (S2) ของ CMP45 ซึ่งมีผลบวกกับแอนติเจน TA716 ด้วยวิธี IFA ทั้งชนิด IgM และ IgG ให้ผลบวกตรงกันกับ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato, Gilliam และ Pooled Ag จากผลการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato, Gilliam มีลักษณะของแอนติเจนที่เหมือนกับ TA716 และ TA763 อยู่ด้วย ดังนั้น หากเชื้อ *O. tsutsugamushi* สายพันธุ์ TA ดังกล่าวติดเชื้อในคน recombinant 56 kDa proteins ในการศึกษาสามารถใช้เป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีในการวินิจฉัยโรคสครับไทฟัสได้

ตารางที่ 1.2 Immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ recombinant 56 kDa proteins ของ Karp, Kato, Gilliam และ Pooled Ag จาก *Orientia tsutsugamushi* กับซีรัมคู่ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสที่มี seroconversion ของแอนติบอดีต่อ TA716 (CMP25) และต่อ TA763 (CMP45)

Serum TA	IFA	Scrub_IgG				Scrub_IgM			
		Kato	Karp	Gilliam	Pooled Ag	Kato	Karp	Gilliam	Pooled Ag
TA716	IgM 1:50	—	—	—	—	—	—	1+	1+
(CMP25) S1		—	—	—	—	—	—	1+	1+
TA716	IgG 1:50 IgM 1:800 IgG 1:800	1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	3+
(CMP25) S2		1+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	3+
TA763	IgM 1:400 IgG 1:400	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+
(CMP45) S1		1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+
TA763	IgM 1:800 IgG 1:800	1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+
(CMP45) S2		1+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	3+

Note: S1, first serum; S2, second serum

การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgG ของ recombinant 56 kDa proteins แบบ pooled antigen ของทั้งสามสายพันธุ์

การทดสอบ IgG immunoreactivity ของ recombinant 56 kDa proteins ของ Pooled Ag ทั้งสามสายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam ดังแสดงในตารางที่ 1.3 โดยทดสอบกับซีรัมจากผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส จำนวน 8 ราย (16 ตัวอย่าง) ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay ชนิด IgG (IFA_G) (titer $\geq 1:400$) ผลการทดลอง พบว่า Pooled Ag ของ recombinant 56 kDa proteins ในซีรัม ผู้ป่วย Karp, Kato และ Gilliam ได้ผลบวกตรงกันทุกตัวอย่าง ยกเว้น 1 ใน 4 ตัวอย่าง จากผู้ป่วย Gilliam สำหรับซีรัมที่มีผลลบของ IFA_G (titer $< 1:400$) Pooled Ag ให้ผลบวก 3 ใน 6 ตัวอย่าง สำหรับซีรัมจากผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ที่ไม่ใช่โรคสครับไทฟัส Pooled Ag และ IgG-IFA ให้ ผลลบตรงกันทั้ง 15 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1.3 Immunoreactivity ชนิด IgG ของ recombinant 56 kDa proteins Pooled Ag จาก *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Kato, Karp และ Gilliam

Group	Antibody to (titer)	Result by IgG_IFA	n	Result by Pooled Ag	
				Positive	Negative
Scrub typhus (n = 8 paired sera)	Karp	Negative (< 400)	1	1	0
		Positive (≥ 400)	5	5	0
	Kato	Negative (< 400)	3	2	1
		Positive (≥ 400)	1	1	0
	Gilliam	Negative (< 400)	2	0	2
		Positive (≥ 400)	4	3	1
Non-Scrub typhus (n = 15 sera)		Negative (< 400)	15	0	15
		Positive (≥ 400)	0	0	0
Sub-total		Negative (< 400)	21	3	18
Sub-total		Positive (≥ 400)	10	9	1
Total			31	12	19

1.3 การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G)

การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 1

ในการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) การประเมินชุดทดสอบโดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 60 ตัวอย่าง แบบไม่ทราบผล IFA ซึ่งหลังจากส่งผลทดสอบ จึงทราบผล IFA และ final diagnosis ซีรัมจำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย scrub typhus 30 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus 30 ตัวอย่าง (leptospirosis 24 ตัวอย่าง และ dengue 6 ตัวอย่าง)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ Scrub typhus และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ดังแสดงในตารางที่ 1.4 พบว่าในกลุ่ม titer <1:50 (จำนวน 29 ตัวอย่าง) และ titer 1:50 (จำนวน 6 ตัวอย่าง) ของ IFA_M ได้ผลลบด้วย Scrub_M ทุกตัวอย่าง แสดงว่าได้ผลตรงกันร้อยละ 100 สำหรับผลบวกด้วย Scrub_M ในกลุ่ม titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ดังนี้ titer 1:100 (1 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:200 (1 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:400 (1 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:800 (3 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (5 ใน 5 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (1 ใน 3 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (5 ใน 7 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_G) ต่อ Scrub typhus และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) ดังแสดงในตารางที่ 1.4 พบว่าในกลุ่ม titer <1:50 (จำนวน 31 ตัวอย่าง) ของ IFA_G ได้ผลลบด้วย Scrub_G จำนวน 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 97 สำหรับผลบวกด้วย Scrub_G ในกลุ่ม titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ดังนี้ titer 1:100 (0 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:200 (3 ใน 4 ตัวอย่าง), titer 1:400 (2 ใน 7 ตัวอย่าง), titer 1:800 (1 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (2 ใน 7 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (1 ใน 1 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (5 ใน 5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

ตารางที่ 1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G)

Scrub IgM/IgG Antibody							
IFA_M		Scrub_M		IFA_G		Scrub_G	
titer	n	+	-	titer	n	+	-
<50	29	0	29	<50	31	1	30
50	6	0	6	50	0	0	0
100	2	1	1	100	2	0	2
200	2	1	1	200	4	3	1
400	3	1	2	400	7	2	5
800	3	3	0	800	3	1	2
1600	5	5	0	1600	7	2	5
3200	3	1	2	3200	1	1	0
≥ 6400	7	5	2	≥ 6400	5	5	0
Total	60	17(28%)	43(72%)		60	15(25%)	45(75%)

จากการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) โดยใช้ IFA เป็นวิธีมาตรฐาน ในการผลิตชุดทดสอบใหม่จำเป็นต้องหาค่าความแม่นยำและค่าทำนายผล เพื่อการวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ จึงใช้ตัวอย่างตรวจซ้ำ ประกอบด้วย scrub typhus สองกลุ่ม คือ Group I มีซีรัมคู่ (paired sera) จำนวน 17 คู่ (S1 = first serum, S2 = second serum) รวมเป็น 34 ตัวอย่าง และ Group II ผู้ป่วย scrub typhus โดยใช้เกณฑ์การพิจารณา

ผลบวกจากค่า titer ของ IFA (titer $\geq$ 1:400) ด้วย IFA IgM จำนวน 20 ตัวอย่าง และ ด้วย IFA IgG จำนวน 23 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus 50 ตัวอย่าง (leptospirosis cases 30 ตัวอย่าง, dengue cases 6 ตัวอย่าง, murine typhus cases 5 ตัวอย่าง และ normal individuals 9 ตัวอย่าง) ดังแสดงในตารางที่ 1.5 ได้ผลดังนี้ ในกลุ่ม scrub typhus: Group I ซีรัมคู่ จำนวน 17 คู่ ในซีรัมแรก (S1) ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 94.1 (16/17 ตัวอย่าง) และ ร้อยละ 64.7 (11/17 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับในซีรัมที่สอง (S2) ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 100 (17/17 ตัวอย่าง) และ ร้อยละ 82.4 (14/17 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ในกลุ่ม scrub typhus: Group II ผู้ป่วย scrub typhus ที่มีผลบวกจากค่า titer ของ IFA IgM (titer $\geq$ 1:400) ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 85.0 (17/20 ตัวอย่าง) สำหรับผู้ป่วย scrub typhus ที่มีผลบวกจากค่า titer ของ IFA IgG (titer $\geq$ 1:400) ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 52.2 (12/23 ตัวอย่าง) และ ร้อยละ 56.5 (13/23 ตัวอย่าง) ตามลำดับ โดยภาพรวมในซีรัมจากผู้ป่วย scrub typhus ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 80.5 (62/77 ตัวอย่าง) และ ร้อยละ 71.1 (55/77 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับในกลุ่ม non-scrub typhus ได้ผลบวกของ IgM และ IgG เท่ากับ ร้อยละ 6.0 (3/50 ตัวอย่าง) และ ร้อยละ 8.0 (4/50 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

ตารางที่ 1.5 ผลของ Scrub_M และ Scrub_G ในกลุ่มตัวอย่างตรวจซีรัม scrub typhus และ non-scrub typhus โดยใช้ IFA เป็นวิธีมาตรฐาน

Patients	Scrub typhus IgM/IgG	
	IgM	IgG
Scrub typhus		
Group I		
Paired sera S1 (n = 17)	16 (94.1%)	11 (64.7%)
Group I		
Paired sera S12 (n = 17)	17 (100%)	14 (82.4%)
Group II		
IFA_M titer > 1:400 (n = 20)	17 (85.0%)	17 (85.0%)
Group II		
IFA_G titer > 1:400 (n = 23)	12 (52.2%)	13 (56.5%)
Total		
Scrub typhus (n = 77)	62 (80.5%)	55 (71.4%)
Non-Scrub typhus (n = 50)	3 (6.0%)	4 (8.0%)

Note: S1, first serum; S2, second serum

การวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแม่นยำของความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (Specificity) และค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value, PPV) ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value, NPV) ของชุดทดสอบ Scrub_M และ Scrub_G ดังแสดงในตารางที่ 1.6 ได้ผลดังนี้

ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M ใน Group I กลุ่มซีรัมแรก (S1) มีความไวร้อยละ 94.1 ความจำเพาะร้อยละ 94.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 84.2 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 97.9 สำหรับในกลุ่ม convalescent serum มีความไวร้อยละ 100 ความจำเพาะร้อยละ 94.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 85.0 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 100

ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_G ใน Group I กลุ่มซีรัมแรก (S1) มีความไวร้อยละ 64.7 ความจำเพาะร้อยละ 92.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 73.3 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 88.5 สำหรับในกลุ่ม convalescent serum มีความไวร้อยละ 82.4 ความจำเพาะร้อยละ 92.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 77.8 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 93.9

ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M ใน Group II กลุ่ม IFA_M (titer $\geq$ 1:400) มีความไวร้อยละ 85.7 ความจำเพาะร้อยละ 94.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 85.0 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 94.0 สำหรับในกลุ่ม IFA_G (titer $\geq$ 1:400) มีความไวร้อยละ 52.2 ความจำเพาะร้อยละ 94.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 80.0 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 81.0

ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_G ใน Group II กลุ่ม IFA_G (titer $\geq$ 1:400) มีความไวร้อยละ 52.2 ความจำเพาะร้อยละ 92.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 81.3 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 82.5 สำหรับในกลุ่ม IFA_M (titer $\geq$ 1:400) มีความไวร้อยละ 81.0 ความจำเพาะร้อยละ 92.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 85.0 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 94.0

โดยภาพรวม ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M มีความไวร้อยละ 80.5 ความจำเพาะร้อยละ 94.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 95.4 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 75.8 สำหรับ ชุดทดสอบ Scrub_G มีความไวร้อยละ 71.4 ความจำเพาะร้อยละ 92.0 ค่าทำนายผลบวกร้อยละ 93.2 และค่าทำนายผลลบร้อยละ 67.6

โดยสรุปชุดทดสอบ Scrub_M มีประสิทธิภาพดีกว่าชุดทดสอบ Scrub_G ทั้งในด้านความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ

ตารางที่ 1.6 การเปรียบเทียบค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ Scrub_M และ Scrub_G

Subjects	Test	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Group I S1	Scrub_M	94.1%	94.0%	84.2%	97.9%
	Scrub_G	64.7%	92.0%	73.3%	88.5%
Group I S2	Scrub_M	100%	94.0%	85.0%	100%
	Scrub_G	82.4%	92.0%	77.8%	93.9%
Group II IFA_M titer $\geq$ 1:400	Scrub_M	85.7%	94.0%	85.0%	94.0%
	Scrub_G	81.0%	92.0%	85.0%	94.0%
Group II IFA_G titer $\geq$ 1:400	Scrub_M	52.2%	94.0%	80.0%	81.0%
	Scrub_G	52.2%	92.0%	81.3%	82.5%
Total	Scrub_M	80.5%	94.0%	95.4%	75.8%
	Scrub_G	71.4%	92.0%	93.2%	67.6%

Note: S1, first serum; S2, second serum

การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 2

การประเมินชุดทดสอบในครั้งนี้ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการพ่น (spray) แอนติเจนตามมาตรฐาน (version 2) โดยทดสอบชุดตรวจ Scrub IgM & IgG กับซีรัมจากผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน ซีรัมเหล่านี้ได้ถูกตรวจหาแอนติบอดีต่อสครับไทฟัส ต่อมีวรีนไทฟัส และ Tick typhus จำนวน 320 ตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay (IFA) ($\text{titer} \geq 1:400$)

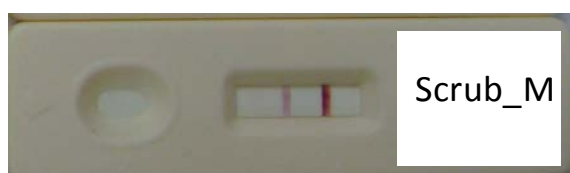
ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบระหว่างค่า titer IFA และชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G)

ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบระหว่างค่า titer IFA และ Scrub IgM & IgG strip test ดังแสดงในตารางที่ 1.7 พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส ซีรัมมีผลบวก (IFA_IgM, $\text{titer} \geq 1:400$) จำนวน 100 ตัวอย่างได้ผลตรงกันร้อยละ 98 (98/100 ตัวอย่าง) ในกลุ่มผู้ป่วยซีรัมมีผลลบ (IFA_IgM, $\text{titer} < 1:50$, $1:100-1:200$) พบว่ากลุ่มซีรัมมีผลลบ (IFA_IgM, $\text{titer} < 1:50$) Scrub_M ได้ผลลบตรงกันร้อยละ 94.5 (208/220 ตัวอย่าง) และได้ผลบวกร้อยละ 5.5 (12/220 ตัวอย่าง)

สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส ซีรัมผลบวก (IFA_IgG, $\text{titer} \geq 1:400$) จำนวน 97 ตัวอย่างได้ผลตรงกันร้อยละ 95.9 (93/97 ตัวอย่าง) ในกลุ่มผู้ป่วยซีรัมที่มีผลลบ (IFA_IgG, $\text{titer} < 1:50$, $1:100-1:200$) Scrub_G ได้ผลลบตรงกันร้อยละ 82.1 (183/223 ตัวอย่าง) และได้ผลบวกร้อยละ 17.9 (40/223 ตัวอย่าง)

เมื่อวิเคราะห์ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM กับ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) โดยวิเคราะห์ผลร่วมกับ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) ดังแสดงในตารางที่ 1.8 พบว่า IFA ชนิด IgM $\text{titer} < 50$ ให้ผลบวกด้วย Scrub_M จำนวน 12/220 ตัวอย่าง ซึ่งแปลว่าอาจเป็นแอนติบอดีที่มาจากการติดเชื้อก่อนหน้านี้ หรือ Scrub_M มีความไวมากกว่า IFA_M จึงสามารถตรวจจับแอนติบอดีได้ก่อน จำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไป สำหรับเมื่อวิเคราะห์ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG กับ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) โดยวิเคราะห์ผลร่วมกับ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ดังแสดงในตารางที่ 1.9 พบว่า IFA ชนิด IgG $\text{titer} < 50$ ให้ผลบวกด้วย Scrub_G จำนวน 37 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ผลบวกของ Scrub_G เป็นผลบวกอ่อน (weak positive, +W) จำนวน 29 ตัวอย่างซึ่งทุกตัวอย่างมีผลลบของทั้ง IFA_M และ Scrub_M แปลว่าน่าจะเป็นแอนติบอดีที่มาจากการติดเชื้อก่อนหน้านี้

Scrub_M และ Scrub_G (version 2)



ผลบวก



ผลลบ

ตารางที่ 1.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2

Results of Scrub strip test						
IFA titer	IgM (Scrub_M)			IgG (Scrub_G)		
	n	Positive	Negative	n	Positive	Negative
Negative						
<50	220	12 (5.4%)	208 (94.5%)	220	37 (16.8%)	183 (83.2%)
100	-	-	-	3	3 (100%)	0
200	-	-	-	-	-	-
Sub-Total	220	12 (5.4%)	208 (94.5%)	223	40 (17.9%)	183 (82.1%)
Positive						
400	6	6 (100%)	0	30	23 (95.8%)	2 (6.7%)
800	24	23 (95.8%)	1 (4.2%)	30	23 (95.8%)	1 (4.2%)
1600	49	48 (98.0%)	1 (2.0%)	19	23 (95.8%)	1 (5.3%)
3200	12	12 (100%)	0	16	12 (100%)	0
6400	7	7 (100%)	0	2	12 (100%)	0
12800	2	2 (100%)	0	-	-	-
Sub-Total	100	98 (98.0%)	2 (2.0%)	97	93 (95.9%)	4 (4.1%)
Total	320	111 (34.7%)	209 (65.3%)	320	133 (41.6%)	187 (58.4%)

ตารางที่ 1.8 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2

IFA_M titer	Scrub_M		Interpretation
	Result	n	
<50 (n = 12)	+W	8	Pre-existing antibody or Early detection / Need further confirmation
	+M	3	Pre-existing antibody or Early detection / Need further confirmation
	+S	1	Pre-existing antibody or Early detection / Need further confirmation
800	-ve	1	False negative or Need further confirmation
1600	-ve	1	False negative or Need further confirmation

ตารางที่ 1.9 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG กับ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) โดยวิเคราะห์ผลร่วมกับ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ในการประเมินชุดทดสอบครั้งที่ 2

IFA_G titer	Scrub_G		Result of		Interpretation
	Result	n	IFA_M, Scrub_M	n	
<50 (n = 37)	+W	29	-, -	29	Pre-existing antibody
	+M	7	-, -	6	Pre-existing antibody
			-, +	1	False positive or Further confirmation
	+S	1	-, +	1	False positive or Further confirmation
100	+W	1	+, +	1	Early detection / Need further confirmation
(n = 3)	+M	2	+, +	2	Early detection / Need further confirmation

การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) ครั้งที่ 3

การประเมินชุดทดสอบ ใช้ Scrub_M ซึ่งเตรียมโดยการพันแอนติเจน โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 318 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. แพทย์หญิง ยุพิน ศุภุทธมงคล ประกอบด้วย scrub typhus จำนวน 100 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus จำนวน 218 ตัวอย่าง (leptospirosis จำนวน 53 ตัวอย่าง, dengue จำนวน 96 ตัวอย่าง, มีวินไทฟัส จำนวน 30 ตัวอย่าง และ โรคไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 39 ตัวอย่าง)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของวิธี IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ scrub typhus และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ในกลุ่มตัวอย่างตรวจซีรัมผู้ป่วย scrub typhus จำนวน 100 ตัวอย่าง ดังแสดงใน ตารางที่ 1.10 ในกลุ่ม IFA_M พบว่า IFA_M ที่มี titer $\leq 1:50$ ได้ผลลบตรงกัน จำนวน 15/17 (88 %) ตัวอย่าง สำหรับในกลุ่ม IFA_M titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ที่ได้ผลบวกตรงกัน ดังนี้ titer 1:100 (1 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:200 (2 ใน 4 ตัวอย่าง), titer 1:400 (13 ใน 14 ตัวอย่าง), titer 1:800 (17 ใน 17 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (17 ใน 17 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (12 ใน 13 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (16 ใน 16 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า วิธี IFA ชนิด IgM (IFA_M) กับชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 78/83 ตัวอย่าง (ร้อยละ 94) และได้ผลลบตรงกัน จำนวน 14/17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 82)

ตารางที่ 1.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_G) ต่อ scrub typhus และ ผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) ในกลุ่ม IFA_G ทดสอบกับ Scrub_G พบว่า IFA_G ที่มี titer $\leq 1:50$ ได้ผลลบตรงกัน จำนวน 1/5 (20%) ตัวอย่าง สำหรับในกลุ่ม IFA_G titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ที่ได้ผลบวกตรงกัน ดังนี้ titer 1:100 (8 ใน 9 ตัวอย่าง), titer 1:200 (4 ใน 4 ตัวอย่าง), titer 1:400 (16 ใน 17 ตัวอย่าง), titer 1:800 (21 ใน 22 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (16 ใน 17 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (13 ใน 15 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (11 ใน 11 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า วิธี IFA ชนิด IgG (IFA_G) กับชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 89/95 ตัวอย่าง (ร้อยละ 94) และได้ผลลบตรงกัน จำนวน 1/5 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20)

นอกจากนี้ใช้ชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) กับวิธี IFA ชนิด IgM (IFA_M) และ ชนิด IgG (IFA_G) ในกลุ่มซีรัมผู้ป่วย non-scrub typhus จำนวน 218 ตัวอย่าง (leptospirosis จำนวน 53 ตัวอย่าง, dengue จำนวน 96 ตัวอย่าง, มีวรีนไทฟัส จำนวน 30 ตัวอย่าง และ โรคไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 39 ตัวอย่าง) พบว่าได้ผลลบตรงกันทุกตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 100

ตารางที่ 1.10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) ครั้งที่ 3

Scrub IgM/IgG Antibody							
IFA_IgM		Scrub_M		IFA_IgG		Scrub_G	
titer	n	Positive	Negative	titer	n	Positive	Negative
≤ 50	17	3	14	≤ 50	5	4	1
100	2	1	1	100	9	8	1
200	4	2	2	200	4	4	0
400	14	13	1	400	17	16	1
800	17	17	0	800	22	21	1
1600	17	17	0	1600	17	16	1
3200	13	12	1	3200	15	13	2
≥ 6400	16	16	0	≥ 6400	11	11	0
Total	100	81 (81%)	19 (19%)		100	93 (93%)	7 (7%)

การเปรียบเทียบซีรัมผลที่ไม่ตรงกัน ด้วยชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่จำหน่ายแล้ว

จากการประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) กับวิธี IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) ครั้งที่ 3 พบว่าซีรัมที่มีผลไม่ตรงกัน จำนวน 14 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1.11 ในกลุ่ม IFA_M พบซีรัมที่มีผลไม่ตรงกัน จำนวน 7 ตัวอย่าง สำหรับ IFA_M ที่มี titer $\leq 1:50$ ชุดทดสอบ Scrub_M ได้ผลบวกจำนวน 2 ตัวอย่าง (+S 1 ตัวอย่าง, +M 1 ตัวอย่าง) , titer 1:100 ชุดทดสอบ Scrub_M ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง, titer 1:200 ชุดทดสอบ Scrub_M ได้ผลลบ จำนวน 2 ตัวอย่าง, titer 1:400 ชุดทดสอบ Scrub_M ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง และ titer 1:3200 ชุดทดสอบ Scrub_M ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ

สำหรับกลุ่ม IgG พบซีรั่มที่มีผลไม่ตรงกัน จำนวน 8 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1.12 ในกลุ่ม IFA_G ที่มี titer $\leq 1:50$ ชุดทดสอบ Scrub_G ได้ผลบวก จำนวน 4 ตัวอย่าง (+S 1 ตัวอย่าง, +W 3 ตัวอย่าง) , titer 1:100 ชุดทดสอบ Scrub_G ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง, titer 1:400 ชุดทดสอบ Scrub_G ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง, titer 1:800 ชุดทดสอบ Scrub_G ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง และ titer 1:3200 ชุดทดสอบ Scrub_G ได้ผลลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ตารางที่ 1.11 ผลการทดสอบที่ตรงกันและที่ไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) และ ผลทดสอบของ ชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M)

Scrub IgM Antibody							
IFA_IgM result		Scrub_M result					
		Concordant result	Disconcordant result				
Titer	n	n	n	+S	+M	+W	Negative
≤ 50	17	15	2	1	1	0	
100	2	1	1				1
200	4	2	2				2
400	14	13	1				1
800	17	17	0				0
1600	17	17	0				0
3200	13	12	1				1
≥ 6400	16	16	0				0
Total	100	93 (93%)	7 (7%)				

ตารางที่ 1.12 ผลการทดสอบที่ตรงกันและที่ไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_G) และ ผลทดสอบของ ชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G)

Scrub IgG Antibody							
IFA_IgG result		Scrub_G result					
		Concordant result	Disconcordant result				
Titer	n	n	n	+S	+M	+W	Negative
≤ 50	5	1	4	1	0	3	
100	9	8	1				1
200	4	4	0				0
400	17	16	1				1
800	22	21	1				1
1600	17	17	0				0
3200	15	14	1				1
≥ 6400	11	11	0				0
Total	100	92 (92%)	8 (8%)				

ก่อนการเปรียบเทียบซีรัมผลที่ไม่ตรงกัน ด้วยชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่จำหน่ายแล้ว ImmuneMed Scrub Typhus Rapid ซึ่งใช้แอนติเจนเป็น recombinant protein เช่นเดียวกับชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่ผลิตในโครงการนี้ ชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid (Immu_M/G) มีความไวร้อยละ 97.3 (146/150) และความจำเพาะร้อยละ 100 (145/145) ได้ทดสอบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid (Immu) ชนิด IgM/IgG (Immu_M/Immu_G) ในกลุ่มตัวอย่างตรวจซีรัมผู้ป่วย scrub typhus จำนวน 42 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1.13 ในกลุ่ม IFA_M ที่มี titer $\leq 1:50$ ได้ผลลบตรงกันจำนวน 10/11 ตัวอย่าง (91%) สำหรับในกลุ่ม IFA_M titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ที่ได้ผลบวกตรงกัน ดังนี้ titer 1:100 (1 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:200 (1 ใน 2 ตัวอย่าง), titer 1:400 (4 ใน 4 ตัวอย่าง), titer 1:800 (6 ใน 6 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (7 ใน 7 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (4 ใน 5 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (5 ใน 5 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า วิธี IFA IFA_M กับชุดทดสอบ Immu_M ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 28/31 ตัวอย่าง (ร้อยละ 90) และได้ผลลบตรงกัน จำนวน 10/11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 91)

สำหรับในกลุ่ม IFA_G ที่มี titer $\leq 1:50$ ได้ผลลบตรงกัน จำนวน 2/3 ตัวอย่าง (67%) สำหรับในกลุ่ม IFA_G titer 1:100 ถึง $\geq 1:6400$ ที่ได้ผลบวกตรงกัน ดังนี้ titer 1:100 (2 ใน 6 ตัวอย่าง), titer 1:200 (2 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:400 (2 ใน 11 ตัวอย่าง), titer 1:800 (3 ใน 9 ตัวอย่าง), titer 1:1600 (3 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (2 ใน 4 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (3 ใน 3 ตัวอย่าง) ตามลำดับ ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่า วิธี IFA IFA_G กับชุดทดสอบ Immu_G ได้ผลบวกตรงกัน จำนวน 17/39 ตัวอย่าง (ร้อยละ 44) และได้ผลลบตรงกัน จำนวน 2/3 ตัวอย่าง (ร้อยละ 67)

โดยภาพรวมชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่จำหน่ายแล้ว ImmuneMed Scrub Typhus Rapid มีค่าตัดสินบวกลบ (cut-off value) อยู่ที่ IFA_M titer $\geq 1:400$ และ IFA_G titer $\geq 1:800$

ตารางที่ 1.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid ชนิด IgM/IgG (Immu_M/Immu_G)

Scrub typhus IgM/IgG Antibody							
IFA_IgM		Immu_M		IFA_IgG		Immu_G	
titer	n	Positive	Negative	titer	n	Positive	Negative
≤ 50	11	1	10	≤ 50	3	1	2
100	2	1	1	100	6	2	4
200	2	1	1	200	3	2	1
400	4	4	0	400	11	2	9
800	6	6	0	800	9	3	6
1600	7	7	0	1600	3	3	0
3200	5	4	1	3200	4	2	2
≥ 6400	5	5	0	≥ 6400	3	3	0
Total	42	29 (69%)	13 (31%)		42	18 (43%)	24 (57%)

ได้นำซีรัมที่มีผลไม่ตรงกันเหล่านี้ จำนวน 14 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยชุดทดสอบโรคสครับไทฟัสที่มีจำหน่ายแล้ว
ดังแสดงในตารางที่ 1.14 พบว่า

- Scrub_M เป็นชุดทดสอบที่มีความไวสูงกว่าวิธี IFA_IgM (Code 95, และ 91)
- Scrub_G เป็นชุดทดสอบที่มีความไวสูงกว่าวิธี IFA_IgG (Code 101, 89, 90 และ 149)
- Code 98 มีค่าทั้ง IFA_IgM/IgG เท่ากับ 1:3200 แต่ Scrub_M/G และ Immu_M/G ได้ผลลบทั้งสองวิธี อาจเป็นผลบวกปลอมในวิธี IFA เนื่องจากปฏิกิริยา rheumatoid factor ในปัจจุบันการแก้ปัญหาได้ด้วยวิธี Capture immunoglobulin test ซึ่งเป็นหลักการเหมือนในชุดทดสอบที่ผลิต

ตารางที่ 1.14 การเปรียบเทียบผลการทดสอบของชุดทดสอบในซีรัมที่มีผลไม่ตรงกันระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM/IgG (Scrub_M/Scrub_G) และของชุดทดสอบ ImmuneMed Scrub Typhus Rapid ชนิด IgM/IgG (Immu_M/Immu_G)

No.	Code	Days of Fever	Discordant result retested by Immu kit					
			IFA_IgM titer	IFA_IgG titer	Scrub_M	Scrub_G	Immu_M	Immu_G
1	95	10	< 50	800	+S	+W	neg	neg
2	91	3	< 50	1600	+M	+S	+M	+M
3	78	4	100	400	neg	+M	neg	neg
4	79	3	200	3200	neg	+S	+W	+W
5	141	12	200	1600	neg	+S	neg	+M
6	80	5	400	6400	neg	+S	+S	+S
7	98	7	3200	3200	neg	neg	neg	neg
8	101	7	3200	< 50	+S	+S	+S	+W
9	89	3	≥ 6400	50	+S	+W	+S	neg
10	90	3	400	< 50	+M	+W	+S	neg
11	149	7	400	< 50	+W	+W	+M	neg
12	64	-	< 50	100	neg	neg	neg	neg
13	77	3	< 50	400	neg	neg	neg	neg
14	124	7	800	800	+M	neg	+S	neg

การประเมินชุดทดสอบ Scrub_M/G เพื่อหาค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลโดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน

ค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลจากการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M/G โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ IFA_IgM/IgG ($\text{titer} \geq 1:400$) กับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 318 ตัวอย่าง ประกอบด้วย scrub typhus จำนวน 100 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus จำนวน 218 ตัวอย่าง (leptospirosis จำนวน 53 ตัวอย่าง, dengue จำนวน 96 ตัวอย่าง, มีวินไทฟัส จำนวน 30 ตัวอย่าง และ โรคไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 39 ตัวอย่าง) ดังแสดงในตารางที่ 1.15 ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M/G มีความไวร้อยละ

97.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 98.6 หากพิจารณาแยกชุดทดสอบ Scrub_M และ Scrub_G สำหรับค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M มีความไวร้อยละ 81 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 92.0 ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_G มีความไวร้อยละ 93.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 96.9

ตารางที่ 1.15 ค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ Scrub_M, Scrub_G และ Scrub_M/G โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน

Test	Positive/n	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Scrub_M	81/100	81.0%	100%	100%	92.0%
Scrub_G	93/100	93.0%	100%	100%	96.9%
Scrub_M/G	97/100	97.0%	100%	100%	98.6%

Note: Sensitivity (ความไว), Specificity (ความจำเพาะ), PPV = Positive predictive value (ค่าทำนายผลบวก) และ NPV = Negative predictive value (ค่าทำนายผลลบ)

2. การผลิตชุดทดสอบของโรคเลปโตสไปโรซิส

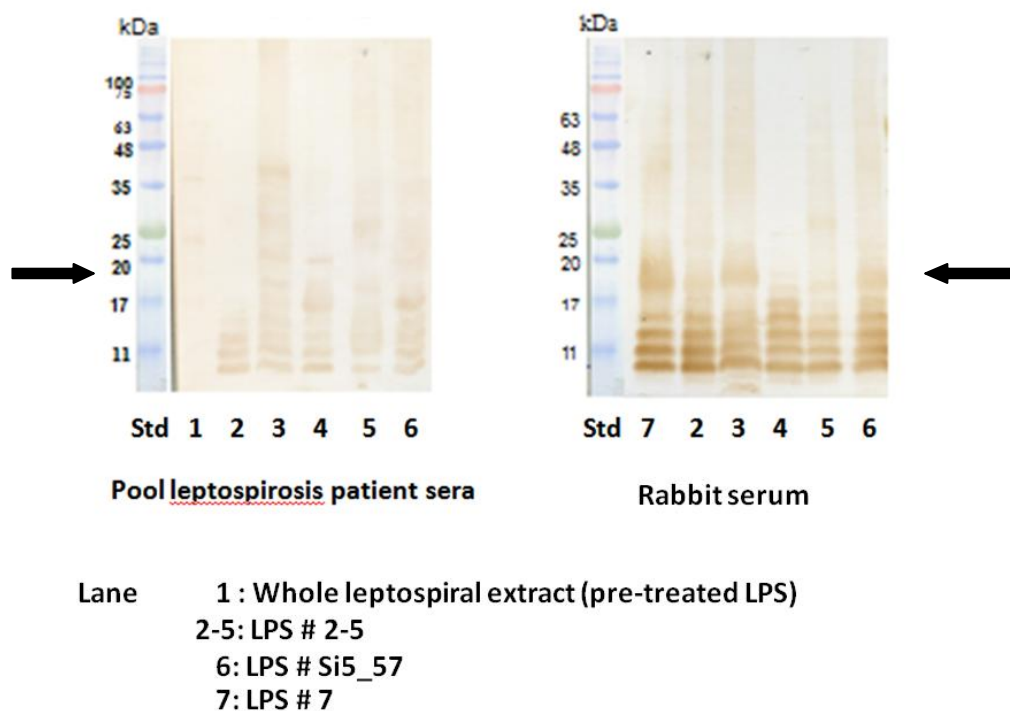
ในการคัดเลือกให้ได้แอนติเจนจากเชื้อเลปโตสไปราเพื่อตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ที่ดีและเหมาะสมที่สุดในการผลิตชุดทดสอบของโรคเลปโตสไปโรซิส แอนติเจนมีสองชนิด คือ Lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อเลปโตสไปรา และ recombinant protein 25 kDa ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa

2.1 ขั้นตอนการผลิตแอนติเจน *Leptospira lipopolysaccharides (LPS)* ของ *Leptospira* spp.

2.1.1 การผลิตแอนติเจน *Leptospira lipopolysaccharides (LPS)*

การเตรียมแอนติเจนของ *Leptospira lipopolysaccharides (LPS)* โดยการคัดเลือกเชื้อ *Leptospira* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคในประเทศ 5 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นมาสกัดให้ได้ LPS เพื่อเตรียมแอนติเจน แล้วทำการศึกษาคูสมบัติของสารดังกล่าวก่อนส่งต่อเพื่อนำไปผลิตเป็นชุดทดสอบ โดยการทดสอบขั้นต้นทางห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน (reference antisera) จากกระต่ายทดลองซึ่งมี antibodies ที่บ่งชี้จำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของเชื้อ leptospires (whole leptospiral antigens) ด้วยวิธี immunoblotting ได้ผลทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2.1 การทดสอบขั้นต้นทางห้องปฏิบัติการโดยทดสอบกับ Pooled ซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสซึ่งมีผล IgM antibodies ด้วยวิธี immunoblotting ได้ผลทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2.1 ซ้าย การทดสอบขั้นต้นทางห้องปฏิบัติการกับตัวอย่างซีรัมมาตรฐาน (reference antisera) จากกระต่ายทดลองซึ่งมี antibodies ที่บ่งชี้จำเพาะต่อส่วนต่างๆ ของเชื้อ leptospires (whole leptospiral antigens) ด้วยวิธี immunoblotting ได้ผลทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2.1 ขวา

ได้จัดส่งชุดทดสอบ *Leptospira LPS kit* และน้ำยาเพื่อประเมินแอนติเจนใน ICT ดังนี้ control serum ผู้ป่วย 3 ชุด (strong = 0.2 mL, moderate = 0.2 mL, weak = 0.1mL), normal serum samples 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 0.1 mL) และ rabbit-anti leptospira reference antisera 0.5 mL

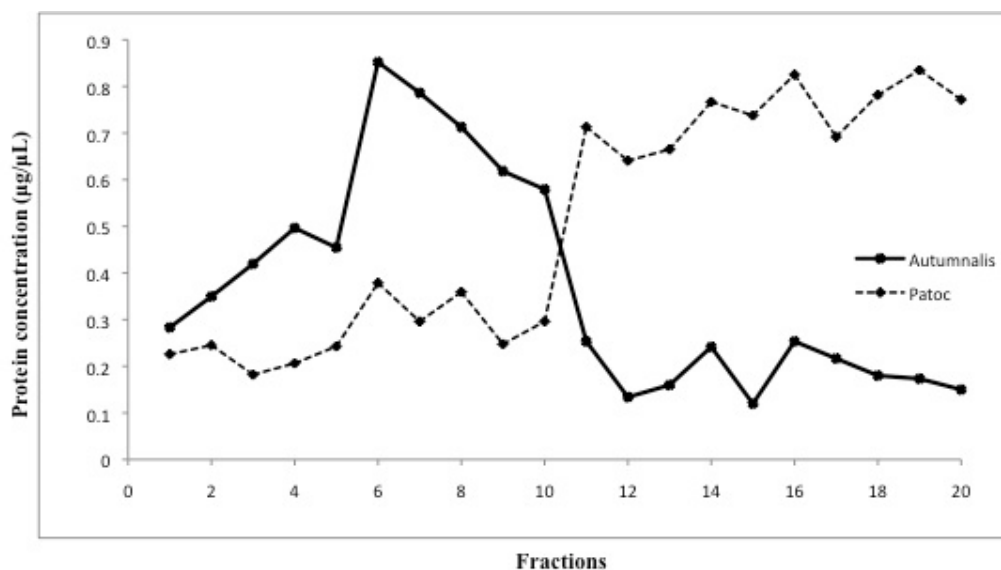


รูปที่ 2.1 ผลการทดสอบความคุณภาพของ Leptospiral lipopolysaccharides (LPS) ที่ผลิตได้ด้วยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส Pool leptospirosis patient sera (A) Rabbit serum (B)

2.1.2 การผลิตแอนติเจน recombinant 25 kDa protein

การจำแนกหา *Leptospira* lipoprotein ขนาดโมเลกุลต่ำของ Pathogenic *Leptospira*

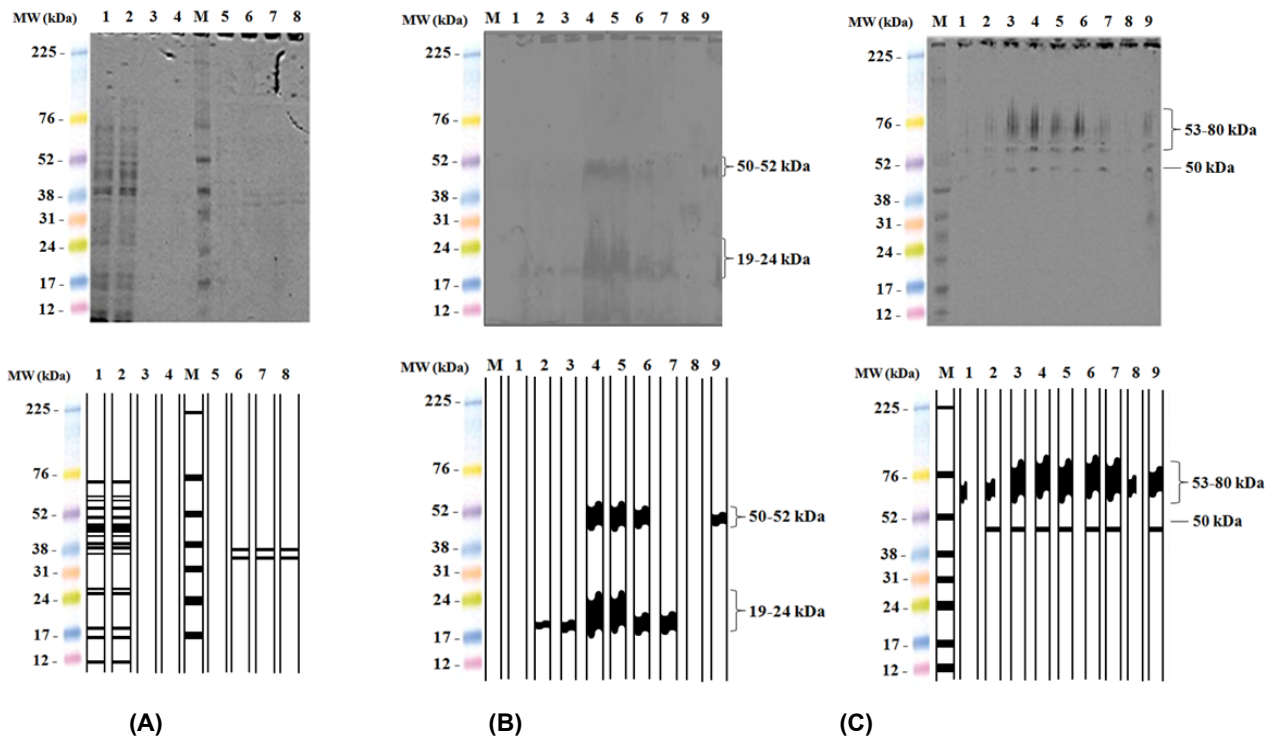
เพื่อจำแนกเมมเบรนโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำจากเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Autumnalis (pathogenic leptospires) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนในการวินิจฉัยในระยะแรกของโรคเลปโตสไปโรซิส เมมเบรนโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราจะถูกนำออกมาด้วย alkaline plasmolysis buffer ตามด้วย ultracentrifugation จากนั้นแต่ละ fractions ที่ได้จะนำมาตรวจหาองค์ประกอบของเชื้อเบื้องต้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่าโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำอยู่ใน fractions 6-10 ในขณะที่โปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำจากเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Patoc (saprophytic leptospires) อยู่ใน fractions 12-20 ดังแสดงในรูปที่ 2.2



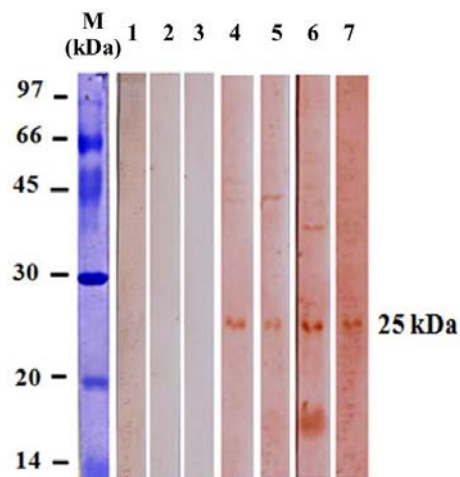
รูปที่ 2.2 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fractions 1 - 20 ของ outer membrane (OM) components ที่แยกได้จากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis (เชื้อก่อโรค, เส้นทึบ) และ *Leptospira biflexa* serovar Patoc (เชื้อในธรรมชาติ, เส้นปะ)

จากนั้นในแต่ละห้า fractions จะถูกนำมารวมเป็น pool fractions ก่อนที่จะนำมาตรวจหาโปรตีน, ไลปิด และ LPS โดยการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า (1-Dimension Electrophoresis) และย้อมเจลด้วยสี coomassie blue, Sudan Black B และชุดสีย้อม LPS ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยจากการทดลองพบว่าใน pool fractions ที่ 1 และ 2 พบแบนของโปรตีนที่ขนาดโมเลกุล 12, 16-17, 25-26, 38-39, 50-52, 60 และ 75 kDa ในขณะที่ pool fractions ที่ 6, 7 และ 8 พบแบนของโปรตีนที่ขนาดโมเลกุล 37 และ 38 kDa เท่านั้น สำหรับการย้อมหา LPS และไลปิดนั้น สามารถพบทั้งสองชนิดได้ในทุก pool fractions โดย LPS จะพบเป็น diffuse bands ที่ขนาดโมเลกุล 19-24 และ 50-52 kDa ส่วนไลปิดนั้นจะพบที่ขนาดโมเลกุล 50 และ 53-80 kDa

สำหรับการตรวจหาโปรตีนที่ให้อิมมูโนรีแอคทีวิตีกับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยทำได้โดยวิธี 1-DE ร่วมกับการย้อมด้วย acute phase ซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส ในเบื้องต้นพบโปรตีนใน pool fractions 1, 2, 5, 6, 7 และ 8 แต่ที่น่าสนใจคือจาก acute phase ซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 10 ตัวอย่างที่นำมาทดสอบกับแอนติเจนใน pool fractions 2 นั้นพบแอนติเจนที่ให้อิมมูโนรีแอคทีวิตีกับ IgM แอนติบอดีในซีรัมเป็นโปรตีนที่ขนาดโมเลกุล 25 kDa กับทุกซีรัมทดสอบ สำหรับการตรวจหา LPS นั้นพบว่า LPS ที่ขนาดโมเลกุลระหว่าง 19-24 kDa พบได้ในทุก pool fractions ในขณะที่ LPS ที่ขนาดโมเลกุลระหว่าง 50-52 kDa พบใน pool fractions 4 และ 5 ส่วนการตรวจหาไลปิดจะพบเป็น diffuse bands ที่ขนาดโมเลกุล 50 kDa และระหว่าง 53-80 kDa โดยปริมาณที่พบจะมีมากที่สุดที่ pool fractions 3, 4, 5, และ 6 ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 SDS-PAGE ของ pooled fractions ของ outer membrane (OM) components ย้อมหาโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue G-250R-250 solution (CBB) (A), ย้อมหา lipopolysaccharide ด้วย Pro-Q® Emerald 300 Lipopolysaccharide Gel Stain Kit (B) and ย้อมหา lipid ด้วย Sudan Black B (C)



รูปที่ 2.4 IgM immunoreactivity ของ pooled fractions 2 ใน acute phase sera จาก leptospirosis patients, non-leptospirosis patients และ healthy persons' serum samples. Lane M, Protein marker; lane 1, non-leptospirosis patient; lanes 2-3, healthy persons; lanes 4-7, leptospirosis patients.

ผลของ IgM immunoreactivity ใน pooled fraction (fractions 6 - 10) ของ extractable OM components จาก pathogenic และ saprophytic *Leptospira* กับซีรัมจาก leptospirosis patients, non-leptospirosis patients and healthy persons ดังแสดงในตารางที่ 2.1 พบว่าโปรตีนขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ร้อยละ 100 ในทุกซีรัม

ตารางที่ 2.1 IgM immunoreactivity ใน pooled fraction (fractions 6 - 10) ของ extractable OM components จาก pathogenic และ saprophytic *Leptospira* กับซีรัมจาก leptospirosis patients, non-leptospirosis patients and healthy persons

Leptospiral antigen (kDa)	No. of patients with IgM immunoreactivity to leptospiral proteins bands			
	Pathogenic	Saprophytic	Pathogenic	Pathogenic
	Leptospirosis patients		Non-leptospirosis	Healthy persons
	(n = 15)		patients (n = 6)	(n = 4)
63	9 (60%)	0	0	0
59	6 (40%)	0	0	0
35-48	9 (60%)	0	0	0
30-32	9 (60%)	0	0	0
25	15 (100%)	0	0	0
20	6 (40%)	0	0	0
18 (discrete band)	6 (40%)	0	0	0
18 (diffuse band)	3 (20%)	0	0	0
<17	6 (40%)	6 (40%)	0	0

จากการศึกษาทำให้สามารถจำแนกโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลต่ำ 25 kDa ได้ ประกอบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีโปรตีโอมิกส์ (Proteomics analysis) ซึ่งได้ผลตรงกันว่าเป็นโปรตีน Electron transfer flavoprotein subunit beta (ETF_beta) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และรูปที่ 2.5

ตารางที่ 2.2 โปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก Proteomics analysis

Spot	Proteins	Species/serovar/strain	NCBI search		
			ID	Score	% coverage
12	Flagellin protein	<i>L. interrogans</i> serovar lai str. 56601 / <i>L. interrogans</i> serovar copenhageni	gi 45600993	57	36%
13	Endoflagellar core protein	<i>L. biflexa</i>	gi 12657818	75	46%
14	Endoflagellar core protein	<i>L. biflexa</i>	gi 12657818	72	46%
15	Endoflagellar core protein	<i>L. biflexa</i>	gi 12657818	52	36%
16	Endoflagellar core protein	<i>L. biflexa</i>	gi 12657818	45	35%
17	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	<i>L. interrogans</i> serovar lai str. 56601 / <i>L. interrogans</i>	gi 24193815	75	48%
18	Electron transfer flavoprotein beta-subunit	<i>L. interrogans</i> serovar lai str. 56601 / <i>L. interrogans</i>	gi 24193815	78	48%

Protein View: gi|514354863

putative electron transfer flavoprotein subunit beta [*Leptospira wolffii*]

Database: NCBIInr
Score: 110
Nominal mass (M_r): 27103
Calculated pI: 5.34
Taxonomy: [Leptospira wolffii](#)

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|514175575](#) from [Leptospira wolffii serovar Khorat str. Khorat-H2](#)

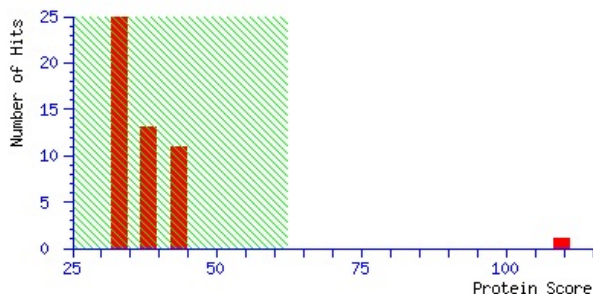
Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|514354863 against nr](#).

Search parameters

MS data file: 570124_LP1_D1_01_1341.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
Variable modifications: [Oxidation \(M\)](#)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 62 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As	Peptide Summary	Help	
Significance threshold p<	0.05	Max. number of hits	50
Standard scoring	☒ MudPIT scoring ☐	Ions score or expect cut-off	0
Show pop-ups	☒ Suppress pop-ups ☐	Sort unassigned	Decreasing Score
Preferred taxonomy	All entries	Show sub-sets	0
		Require bold red	☐

รูปที่ 2.5 ผล MASCOT แสดง โปรตีน Electron transfer flavoprotein subunit beta (ETF_beta)

การผลิต recombinant protein 25 kDa ขนาดโมเลกุลต่ำของ Pathogenic *Leptospira*

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน 25 kDa antigen

ได้การออกแบบไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง 25 kDa antigen โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 25 kDa จาก *Leptospira* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เพิ่ม นิวคลีโอไทด์เพื่อช่วยในการจับกับ template DNA (single line) และนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* (double lines) ไว้ด้วย ดังนี้ 5'-CCGCCG CATATG ATGAAAATCATCGTATTAGT-3' และ 5'-CCGCCG CTCGAG TTATATAACCTTAGCTTCTT-3'

การโคลนและการผลิตโปรตีน

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Autumnalis ใช้การสกัดโดยใช้ชุดสกัด DNA หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบเพื่อจำลองยีน 25 kDa antigen ด้วยเทคนิคโพลีเมอร์เรสเซนรีเอชัน (Polymerase chain reaction, PCR) หลังจากนั้นนำยีนที่ได้รับการเพิ่มจำนวนด้วยวิธีดังกล่าวไปย่อยด้วย restriction enzyme *NdeI* และ *XhoI* ก่อนนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิดที่ได้รับการย่อยด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนที่จำลองขึ้นมาเข้ากับพลาสมิด ด้วย ligase หลังจากนั้นนำเข้าสู่ *Escherichia coli* BL21(DE3) ด้วยวิธี Heat-shock transformation เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน 25 kDa antigen ด้วยเทคนิค PCR และ restriction fragment analysis จาก *NdeI* และ *XhoI* สุดท้ายแล้วจึงได้ recombinant *E. coli* โคลนต่างๆ ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 25 kDa antigen ของ *Leptospira* sp. โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Leptospira interrogans* serovar Lai (GeneBank accession numbers AE010300) ที่อยู่ใน NCBI database เท่ากับร้อยละ 98 ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง recombinant ETF และ *etfB* gene ของ reference *L. interrogans* serovar Lai มีความเหมือนกันร้อยละ 99 ดังแสดงในรูปที่ 2.7

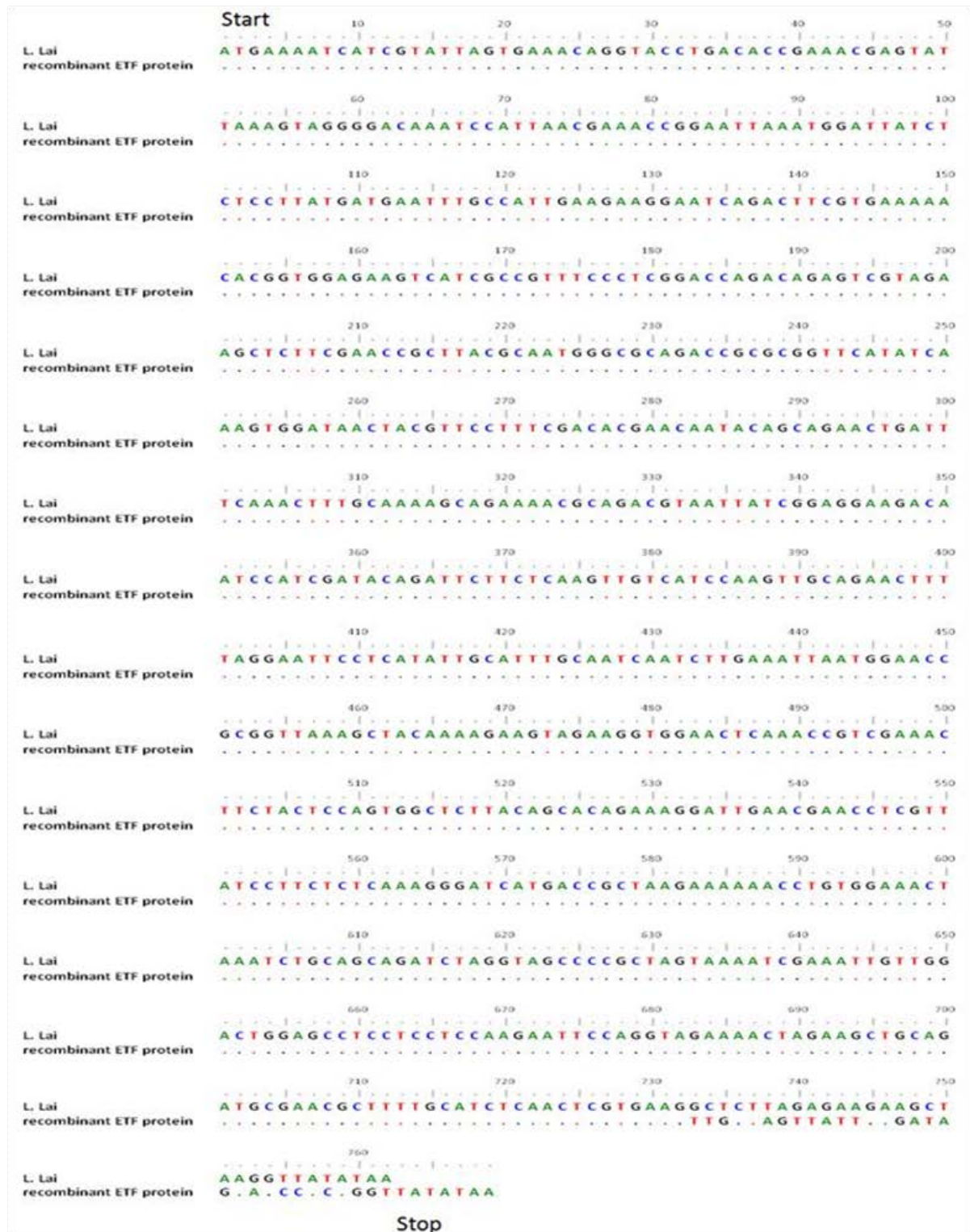
การสร้างโปรตีน 25 kDa antigen

นำ recombinant *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน 25 kDa antigen ของ *Leptospira* sp. มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำการเพิ่มจำนวนต่อใน 200mL ของ LB ที่มีส่วนผสมของ Kanamycin ปริมาณ 30 ug/mL เป็นเวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง (เพื่อให้ได้ OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5) หลังจากนั้นทำการเติม IPTG เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1mM แล้วทำการเลี้ยงต่อเนื่องไปอีก 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วย Phosphate buffer saline (PBS)

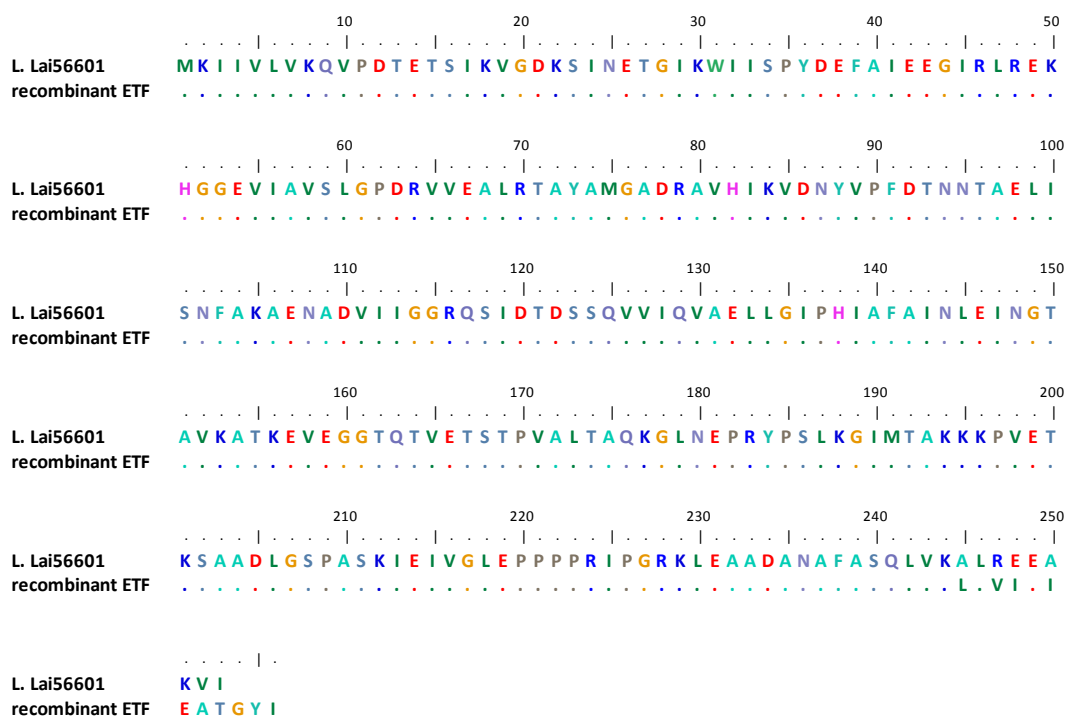
การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำการแตกผนังเซลล์ด้วยคลื่นเสียง ทำการล้างตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 1X PBS แล้วนำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย 2mL ของ 6M Urea + NaNO₃ จนกระทั่งตะกอนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารละลายที่ได้ไปใส่ใน nickel resin column โดยปล่อยให้สารละลายวิ่งผ่านจนหมดแล้วทำการล้างด้วย 30 mL ของ 6M Urea ใน 50 mM sodium Phosphate, 300 mM sodium chloride ; pH 7.4 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการชะโปรตีนที่เกาะบน nickel resin ด้วย 5 mL ของ 6M Urea ใน 50 mM sodium Phosphate, 300 mM sodium chloride, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 40, 50, 60 และ 300 mM imidazole; pH 7.4 ตามลำดับ โดยทำการเก็บสารละลายที่ได้จากการชะครั้งสุดท้ายไป (ประกอบด้วย

โปรตีน 25 kDa antigen ที่บริสุทธิ์แล้ว) ทำการเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลาย PBS (pH7.4) และทำการเพิ่มความเข้มข้นด้วย column concentrator (molecular weight cutoff at 10 kDa)



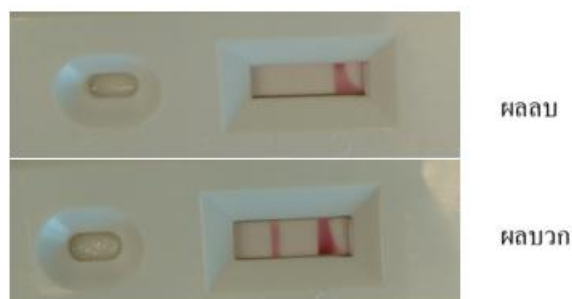
รูปที่ 2.6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง recombinant ETF และ *etfB* gene ของ reference *L. interrogans* serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน



รูปที่ 2.7 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง recombinant ETF และ *etfB* gene ของ reference *L. interrogans* serovar Lai จุด (.) แสดงถึงความเหมือนกัน

2.2 การทดสอบ immunoreactivity ของ *Leptospira* lipopolysaccharides (LPS) และ recombinant 25 kDa protein

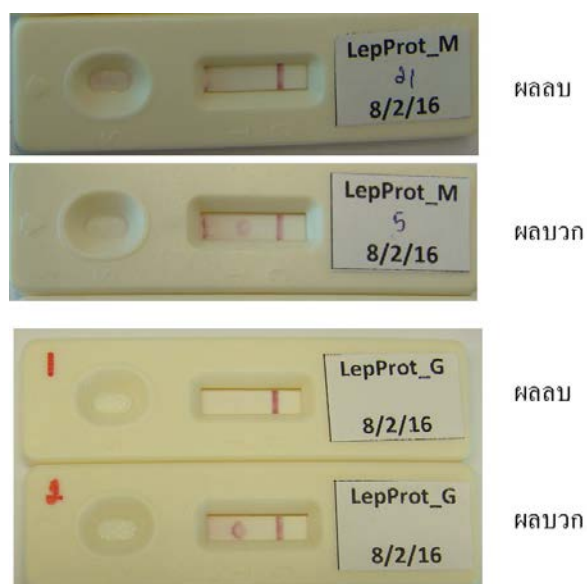
***Leptospira* lipopolysaccharides (LPS): ชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepLPS_M)**



รูปที่ 2.8 ภาพแสดงผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ leptospirosis ที่มี *leptospira* lipopolysaccharides (LPS) เป็นแอนติเจน ชนิด IgM (LepLPS_M)

Recombinant 25 kDa protein: ชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)

ในการพัฒนาทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยอดแอนติเจนเอง ประสบบัญหา recombinant 25 kDa protein ไม่สามารถจับกับเมมเบรน จึงได้แก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ จนกระทั่งได้โปรตีนที่ดี



รูปที่ 2.9 ภาพแสดงผลบวกและผลลบของชุดทดสอบ leptospirosis ที่มี Recombinant 25 kDa proteins เป็นแอนติเจน ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)

2.3 การประเมินชุดทดสอบเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LepProt_M) และ ชนิด IgG (LepProt_G) และ LepLPS_M

การประเมินชุดทดสอบเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LepProt_M) และ ชนิด IgG (LepProt_G) และ LepLPS_M ครั้งที่ 1

ในการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) การประเมินชุดทดสอบ โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 60 ตัวอย่าง แบบไม่ทราบผล IFA ซึ่งหลังจากส่งผลทดสอบ จึงทราบผล IFA และ final diagnosis ตัวอย่างตรวจซีรัมได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. แพทย์หญิงยุพิน ศุภธรรมงคล ดังนี้ ซีรัม จำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย leptospirosis 24 ตัวอย่าง และ non-leptospirosis 36 ตัวอย่าง (scrub typhus 30 ตัวอย่าง และ dengue 6 ตัวอย่าง)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) กับผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) และ LepLPS_M

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ leptospirosis กับผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) และ LepLPS_M ดังแสดงในตารางที่ 2.3 พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_M จำนวน 51 ตัวอย่าง: titer <1:50 (จำนวน 46 ตัวอย่าง) ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_M จำนวน 33 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 71.7 และได้ผลลบตรงกันด้วย LepLPS_M จำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.5; titer 1:50 ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_M (จำนวน 1/2 ตัวอย่าง) , 1:100 (จำนวน 1/2 ตัวอย่าง) และ 1:200 (จำนวน 1/1 ตัวอย่าง) สำหรับในกลุ่มผลบวกของ IFA_M titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$ จำนวน 9 ตัวอย่าง ดังนี้ LepProt_M ได้ผลบวกในกลุ่ม titer 1:400 (1 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:800 (2 ใน 4 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (1 ใน 2 ตัวอย่าง) ตามลำดับ แต่สำหรับ LepLPS_M ได้ผลบวกทุกตัวอย่างในกลุ่ม titer 1:50 – $\geq 1:6400$

ตารางที่ 2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) กับผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) และ LepLPS_M

Leptospirosis IgM Antibody					
IFA_M		LepProt_M		LepLPS_M	
titer	n	+	-	+	-
<50	46	13 (28.3%)	33 (71.7%)	26 (56.5%)	20 (43.5%)
50	2	1	1	2	0
100	2	1	1	2	0
200	1	0	1	1	0
Sub-Total	51	15 (29.4%)	36 (70.6%)	31 (60.8%)	20 (39.3%)
400	3	1	2	3	0
800	4	2	2	4	0
≥ 6400	2	1	1	2	0
Sub-Total	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	9 (100%)	0
Total	60	19 (31.7%)	41 (68.3%)	40 (66.7%)	20 (33.3%)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ

leptospirosis ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ leptospirosis และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) ดังแสดงในตารางที่ 2.4 พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_M จำนวน 51 ตัวอย่าง titer <1:50 (จำนวน 46 ตัวอย่าง), 1:50 (จำนวน 2 ตัวอย่าง), 1:100 (จำนวน 2 ตัวอย่าง) และ 1:200 (จำนวน 1 ตัวอย่าง) ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_M จำนวน 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70.6 สำหรับในกลุ่มผลบวกของ IFA_M titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$ พบผลบวกด้วย LepProt_M ดังนี้ titer 1:400 (1 ใน 3 ตัวอย่าง), titer 1:800 (2 ใน 4 ตัวอย่าง) และ titer $\geq 1:6400$ (1 ใน 2 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_G) ต่อ leptospirosis และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgG (LepProt_G) ดังแสดงในตารางที่ 2.4 พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_G จำนวน 51 ตัวอย่าง titer <1:50 (จำนวน 47 ตัวอย่าง), 1:50 (จำนวน 2 ตัวอย่าง) และ 1:200 (จำนวน 2 ตัวอย่าง) ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_G จำนวน 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.7 สำหรับในกลุ่มผลบวกของ IFA_G titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$ พบผลบวกด้วย LepProt_G ดังนี้ titer 1:400 (2 ใน 4 ตัวอย่าง), titer 1:800 (1 ใน 1 ตัวอย่าง), titer 1:3200 (0 ใน 3 ตัวอย่าง), และ titer $\geq 1:6400$ (1 ใน 1 ตัวอย่าง) ตามลำดับ

เมื่อวิเคราะห์ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันระหว่างชุดทดสอบ LepProt_M และ LepProt_G กับค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) ดังแสดงในตารางที่ 2.5 พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_M จำนวน 51 ตัวอย่าง ดังนี้ titer <1:50 (จำนวน 45 ตัวอย่าง) พบผลบวกด้วย LepProt_M จำนวน 15 ตัวอย่าง: +W จำนวน 1 ใน 2 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของ ทั้ง LepProt_G และ leptospiral antigen, +M จำนวน 2 ใน 6 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_G/LepProt_G และ leptospiral antigen, +S จำนวน 6 ใน 7 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_G/LepProt_G และ leptospiral antigen; และ 1:100 จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้ +S ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_G, LepProt_G และ leptospiral antigen

เมื่อวิเคราะห์ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันระหว่างชุดทดสอบ LepProt_M และ LepProt_G กับค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) ดังแสดงในตารางที่ 2.6 พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_G จำนวน 51 ตัวอย่าง ดังนี้ titer <1:50 – 1:50 (จำนวน 49 ตัวอย่าง) พบผลบวกด้วย LepProt_G จำนวน 16 ตัวอย่าง: +W จำนวน 1 ใน 2 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง LepProt_G และ leptospiral antigen, +M จำนวน 4 ใน 4 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_M/LepProt_M และ leptospiral antigen, +S จำนวน 8 ใน 10 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_M/LepProt_M และ leptospiral antigen

พอสรุปได้ว่าหากทดสอบซ้ำด้วยชุดทดสอบ LepProt_M และ LepProt_G ได้ผลบวกของทั้ง LepProt_M และ LepProt_G การแปลผล คือ ผู้ป่วย leptospirosis

เมื่อวิเคราะห์ผลของ LepProt_M และ LepProt_G ในกลุ่มซ้ำผลบวก (IFA-IgM/IgG, titer $\geq 1:400$) ได้ผลลบ ร้อยละ 55.6 แสดงว่าการตรวจหาแอนติบอดียังไม่ดีพอ สมควรที่จะปรับปรุงแก้ไข เช่น บัปเฟอร์ เมมเบรน และ conjugate เป็นต้น เมื่อวิเคราะห์ผลของ LepLPS_M ได้ผลบวกเกือบทุกตัวอย่าง อาจเป็นไปได้ว่ามีความไวสูงมากหรือมีปัญหาของ ผลบวกปลอม จำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM/IgG (LepProt_M/LepProt_G)

LepProt IgM/IgG Antibody							
IFA_M	LepProt_M			IFA_G	LepProt_G		
titer	n	+	-	titer	n	+	-
<50	46	13	33	<50	47	16	31
50	2	1	1	50	2	1	1
100	2	1	1	100	0	0	0
200	1	0	1	200	2	0	2
Sub-Total	51	15 (29.4%)	36 (70.6%)	Sub-Total	51	17 (33.3%)	34 (66.7%)
400	3	1	2	400	4	2	2
800	4	2	2	800	1	1	0
1600	0	0	0	1600	0	0	0
3200	0	0	0	3200	3	0	3
≥6400	2	1	1	≥6400	1	1	0
Sub-Total	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	Sub-Total	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)
Total	60	19 (31.7%)	41 (68.3%)	Total	60	21 (35.0%)	39 (65.0%)

ตารางที่ 2.5 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M)

IFA_M	LepProt_M		Result of		Interpretation
titer	Result	n	IFA_G, LepProt_G	n	
<50	+W	1	-, -	1	Pre-existing antibody
		1	-, +	1 ^a	Early detection
	+M	6	-, -	3	Pre-existing antibody
			-, +	2 ^b	Pre-existing antibody
			+, -	1 ^a	Early detection
			+, +	1 ^a	Early detection
	+S	7	-, -	1	Early detection / Need further confirmation
			-, +	5 ^a	Early detection
			+, +	1 ^a	Early detection
50	+M	1	+, -	1 ND	Early detection / Need further confirmation
100	+S	1	+, +	1 ^a	Early detection

^a Lep Ag was detected in all samples.

^b Lep Ag was detected in 1/2 samples.

ND = Not done

ตารางที่ 2.6 ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันของชุดทดสอบ ระหว่างค่า titer ของ IFA ชนิด IgG (IFA_M/IFA_G) และผลทดสอบของชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgG (LepProt_G)

IFA_G titer	Lep_G		Result of		Interpretation
	Result	n	IFA_M, Lep_M	n	
<50 - 50	+W	2	-, +	1	Pre-existing antibody
	+M	4	-, -	1 ^a	Early detection / Need further confirmation
			-, +	2 ^a	Early detection / Need further confirmation
			+, +	1 ^a	Early detection / Need further confirmation
	+S	10	-, -	4 ^b	Early detection / Need further confirmation
			-, +	6 ^a	Early detection / Need further confirmation

^a Lep Ag was detected in all samples.

^b Lep Ag was detected in 2/4 samples.

การประเมินชุดทดสอบเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LepProt_M) และ ชนิด IgG (LepProt_G) ครั้งที่ 2

ในการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) การประเมินชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดทดสอบที่มีวางจำหน่าย SD BIOLINE Leptospira IgM/IgG (SD Lep_M/G) ซึ่งมีความไวร้อยละ 96.2 และความจำเพาะร้อยละ 95.7 โดยใช้ microscopic agglutination test (MAT) และผลการแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานผู้ป่วย leptospirosis โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ MAT (titer $\geq$ 1:400) ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 41 ตัวอย่าง แบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ Group I จำนวน 26 ตัวอย่าง: ซีรัมที่มีผลการแยกเชื้อได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง และซีรัมที่มีผลการแยกเชื้อไม่ได้ (normal) จำนวน 20 ตัวอย่าง และ Group II จำนวน 35 ตัวอย่าง: ซีรัมที่มีผลบวก titer $\geq$ 1:400 ของ MAT จำนวน 15 ตัวอย่าง และซีรัมที่มีผลลบ titer < 1:400 ของ MAT (normal) จำนวน 20 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 2.7

จากการศึกษาพบว่า ใน Group I ชุดทดสอบ LepProt_M ได้ผลบวก จำนวน 1/6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 16.7 ในขณะที่ SD Lep_M ไม่ได้ผลบวกสักตัวอย่าง แสดงว่า LepProt_M มีความไวสูงกว่า SD Lep_M ในด้านการตรวจหาแอนติบอดีในระยะต้นของโรค (early detection) ใน Group II ซีรัมที่มีผลบวก titer $\geq$ 1:400 ของ MAT จำนวน 15 ตัวอย่าง ชุดทดสอบ LepProt_M ได้ผลบวก จำนวน 11/15 ตัวอย่าง ในขณะที่ SD Lep_M ได้ผลบวก จำนวน 7/15 ตัวอย่าง สำหรับซีรัมที่มีผลลบ titer < 1:400 ของ MAT (normal) จำนวน 20 ตัวอย่าง ชุดทดสอบ LepProt_M ได้ผลบวก จำนวน 3/20 ตัวอย่าง ในขณะที่ SD Lep_M ไม่พบผลบวก แสดงว่า SD Lep_M มีความจำเพาะสูงกว่า LepProt_M ดังนั้นค่าการประเมินชุดทดสอบ LepProt_M มีความไวร้อยละ 73.3 ความจำเพาะร้อยละ 85.0 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 91.7 และค่าทำนายผลลบ 82.6 สำหรับค่าการประเมินชุดทดสอบ SD Lep_M มีความไวร้อยละ 46.7 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 71.4

จากการศึกษาพบว่า ใน Group I ชุดทดสอบ LepProt_G และ SD Lep_G ได้ผลลบทั้ง 6 ตัวอย่าง ใน Group II ซีรัมที่มีผลบวก titer $\geq$ 1:400 ของ MAT จำนวน 15 ตัวอย่าง ชุดทดสอบ LepProt_G ได้ผลบวก จำนวน 10/15 ตัวอย่าง ในขณะที่ SD Lep_M ไม่ได้ผลบวกสักตัวอย่าง สำหรับซีรัมที่มีผลลบ titer < 1:400 ของ MAT (normal) จำนวน 20

ตัวอย่าง ชุดทดสอบ LepProt_G ได้ผลบวก จำนวน 3/20 ตัวอย่าง ในขณะที่ SD Lep_M ไม่พบผลบวก แสดงว่า SD Lep_M มีความจำเพาะสูงกว่า LepProt_M ดังนั้นค่าการประเมินชุดทดสอบ LepProt_M มีความไวร้อยละ 66.7 ความจำเพาะร้อยละ 90.0 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 83.3 และค่าทำนายผลลบ 78.3 สำหรับค่าการประเมินชุดทดสอบ SD Lep_M มีความไวร้อยละ 0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 0 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 54.5

การประเมินชุดทดสอบเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LepProt_M) และ ชนิด IgG (LepProt_G) ครั้งที่ 3

ในการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการพันแอนติเจนตามมาตรฐาน (version 2) การประเมินชุดทดสอบ โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 179 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. แพทย์หญิงยุพิน ศุภธรรมมงคล

อยู่ในระหว่างการวิเคราะห์ผลประเมินชุดทดสอบ

ตารางที่ 2.7 การเปรียบเทียบค่าความแม่นยำและค่าทำนายผลของ LepProt_M/LepProt_G และ

SD Lep_M/ SD Lep_M

	Test	Positive/n	Sensitivity	Specificity	PPV	PNV
Group II	LepProt_M	11/15	73.3%	85.0%	91.7%	82.6%
	SD Lep_M	7/15	46.7%	100%	100%	71.4%
	LepProt_G	10/15	73.3%	73.3%	73.3%	73.3%
	SD Lep_G	0/15	0%	100%	0%	54.5%
Normal	LepProt_M	3/20				
	SD Lep_M	0/20				
	LepProt_G	2/20				
	SD Lep_G	0/20				

3. การผลิตชุดทดสอบของโรคเด็งกี

สืบเนื่องจากการความเห็นของผู้เชี่ยวชาญในการประชุมของ EID Forum วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2559 ได้สรุปจากที่ประชุมว่า โครงการนี้ให้พัฒนาเฉพาะชุดตรวจของเชื้อสกริปไทฟัส (single test) เท่านั้น ดังนั้นรายงานของชุดทดสอบของโรคเด็งกีจึงไม่สมบูรณ์

3.1 ขั้นตอนการผลิต Recombinant Envelope Glycoprotein

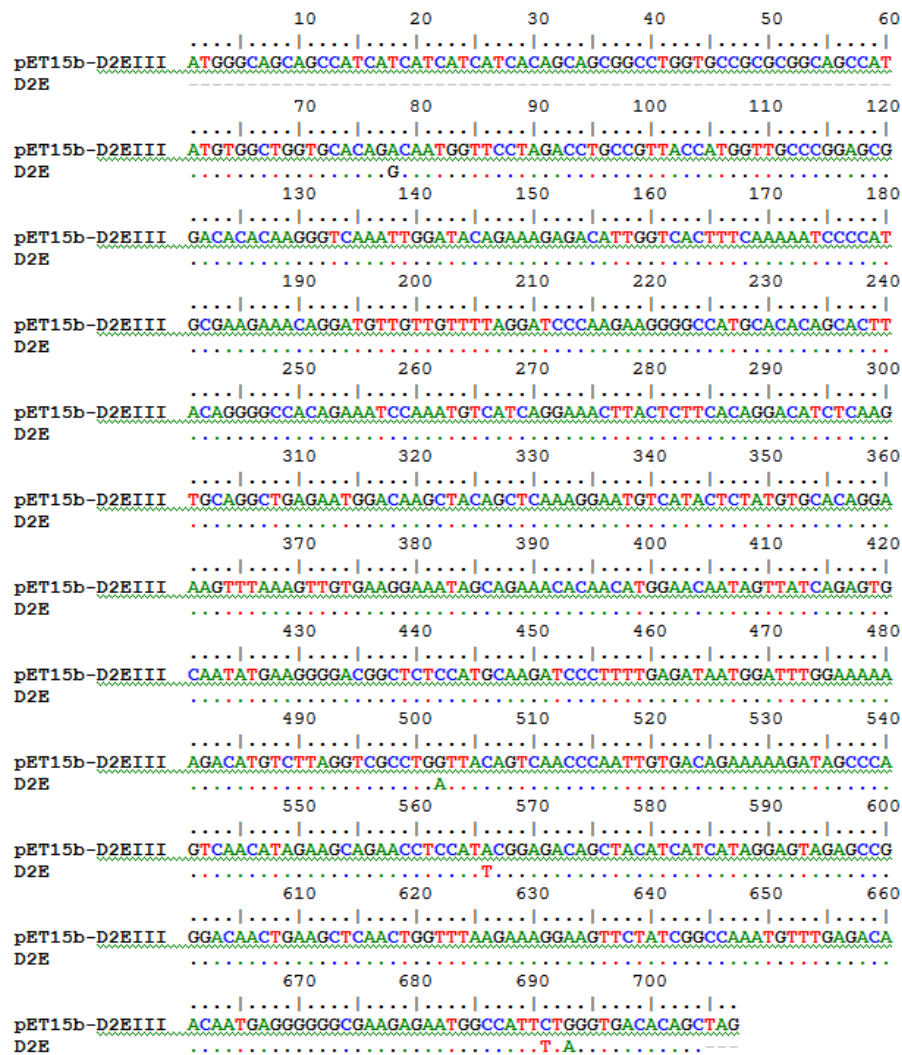
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน Envelope Glycoprotein

การออกแบบไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมการสร้าง Envelope Glycoprotein domain III (EDIII) เป็นหลักโดยปรับปรุงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *env* ของ Dengue virus จากการศึกษาของ Yenchitsomanas P. *et al.* 1996 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้เพิ่มนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* และ *XhoI* (underline letters) ไว้ด้วย ดังนี้ 5'-ACCCATATGTTGGCTGGTGCACAGACAATGGTT-3' และ 5'-AAA CTCGAGCTGTGTACCCAGAATGGCCAT-3'

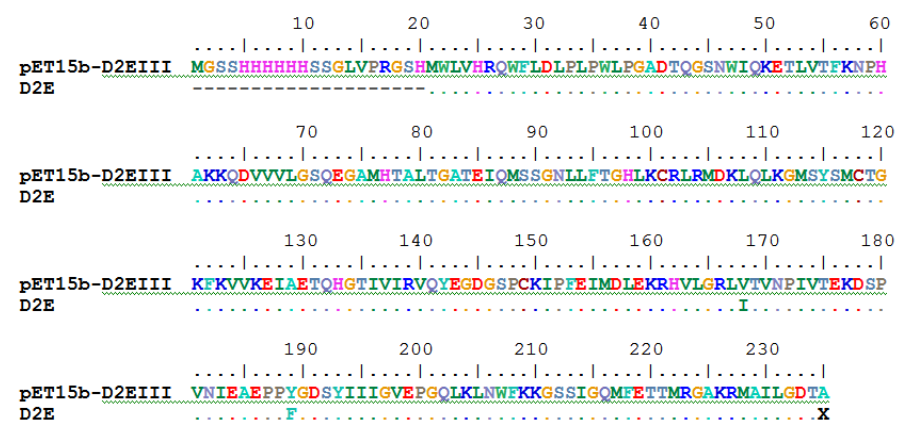
การโคลนและการผลิตโปรตีน

สกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ 16681 จากน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบเพื่อจำลองยีน Envelope Glycoprotein ด้วยเทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชัน-โพลีเมอร์เรสเซนส์เชน (Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR) หลังจากนั้นนำยีนที่ได้รับการเพิ่มจำนวน (PCR product) ด้วยวิธีดังกล่าวไปย่อยด้วย restriction enzyme *NdeI* และ *XhoI* ก่อนนำไปโคลนเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนที่จำลองขึ้นมาเข้ากับพลาสมิด ด้วย ligase หลังจากนั้นนำเข้าสู่ *Escherichia coli* Top10F⁺ ได้ recombinant plasmid ที่มี EDIII gene, pET15b-EDIII ซึ่งนำไปเปรียบเทียบกับเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ NGC GenBank M24447 โดยมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 และความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโน 99% ดังแสดงในรูปที่ 3.2

นำ recombinant pET15b-NS1D2 plasmid นำเข้าสู่ expression host, *E. coli* BL21 (DE3) ด้วยวิธีการเชื่อมต่อ ด้วย ligase จากนั้นเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มีส่วนผสมของ ampicillin หลังจากนั้นทำการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน ด้วยเทคนิค PCR และ restriction fragment analysis จาก *NdeI* และ *XhoI* จึงได้ recombinant *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน Envelope Glycoprotein



รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำหรับ recombinant Envelope glycoprotein เปรียบเทียบกับเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ 16881. จุด (.) หมายถึงความเหมือนของนิวคลีโอไทด์



รูปที่ 3.2 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ recombinant Envelope glycoprotein เปรียบเทียบกับเชื้อ Dengue virus serotype 2 สายพันธุ์ 16881 เครื่องหมายจุด (.) หมายถึงความเหมือนของกรดอะมิโน

การสร้างโปรตีน Envelope Glycoprotein

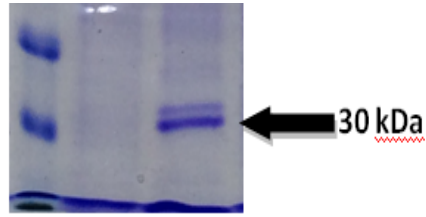
1. นำ recombinant *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างโปรตีน Envelope Glycoprotein มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว LB ที่มี 100 µg/mL Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C 16-18 ชั่วโมง และ subculture ใน 1,000 mL LB medium ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมงหรือมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.6 จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีนด้วย isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอนที่ได้
2. นำตะกอนมาละลายด้วย 1x IB wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA and 1% (v/v) Triton X-100) ในอัตราส่วน 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ culture volume
3. เติม lysozyme ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. นำมา sonicate เป็นเวลา 30-40 นาที หรือ จนกว่าสารละลายมีลักษณะใสไม่มีตะกอนเซลล์เหลืออยู่
5. นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที
6. นำเอาส่วนใสมากรองด้วย filter membrane ขนาด 0.22 µm และนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

1. นำสารละลายโปรตีนที่ได้มาจับกับ Ni-NTA Agarose bead ในหลอดทดลองขนาด 50 mL (ปริมาตร bead 2 mL) โดยเขย่าด้วยเครื่อง Rocker ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง
2. บรรจุสารละลายโปรตีนและ Ni-NTA Agarose bead ลงใน column chromatography โดยยังไม่เปิดปลาย column ทิ้งไว้จนกว่า bead จะเซตตัวลงมาด้านล่างของ column จนหมด
3. เปิดปลาย column เพื่อให้ส่วนที่เป็น unbound ไหลออกจากนั้นล้าง bead ด้วย washing buffer ในปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายโปรตีน
4. เซาะส่วนโปรตีนที่ต้องการออกมาด้วย Elution buffer* โดนเก็บเป็นส่วน (fraction) ครั้งละ 1 mL หลังจากนั้นนำ fraction ที่ได้ไปวัดที่ OD 280 nm
5. นำ fraction ที่ต้องการไป Dialysis ใน 10 mM phosphate buffer pH 9.0 ปริมาตร 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง 2 ครั้ง
6. เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ นำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Lowry ตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Dot-ELISA

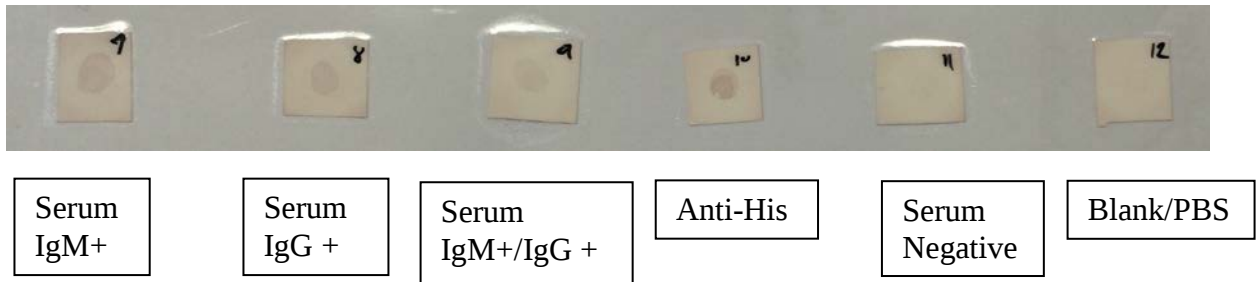
การผลิต Recombinant Envelope Glycoprotein (Lot1/09082013)

- สามารถผลิต Recombinant Envelope Glycoprotein ที่ความเข้มข้น 2.3 mg/mL ปริมาณที่ได้ 1.5 mL
- ตรวจสอบโปรตีน โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie Brilliant Blue ดังแสดงในรูปที่ 3.3
- ทดสอบ immunoreactivity ของโปรตีนกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย ที่มีผลการทดสอบด้วยวิธี Antibody capture ELISA ว่ามีแอนติบอดีต่อไวรัสเด็งกี่ชนิด IgM, ชนิด IgG และ ชนิด IgM/IgG เป็นบวก และซีรัมคนปกติ ที่มีผลการทดสอบด้วยวิธี Antibody capture ELISA เป็นลบ ด้วยวิธี Dot-ELISA ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.3 แสดง recombinant envelope glycoprotein ที่ผลิตได้ ขนาด 30 kDa ด้วยวิธี SDS-PAGE

การทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ recombinant Envelope glycoprotein

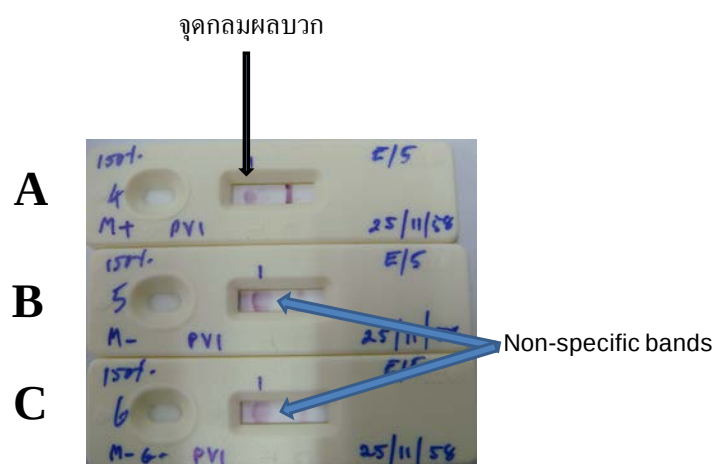


รูปที่ 3.4 แสดงผลการทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM/IgG ของ Recombinant Envelope Glycoprotein ที่ผลิตได้ กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยด้วยวิธี Dot-ELISA

การผลิตชุดทดสอบ โรคเด็งกี ชนิด IgM

อยู่ในการหว่างการผลิตชุดทดสอบโรคเด็งกี ชนิด IgM มี Recombinant glycoprotein E เป็นแอนติเจน ยังประสบปัญหา ดังนี้

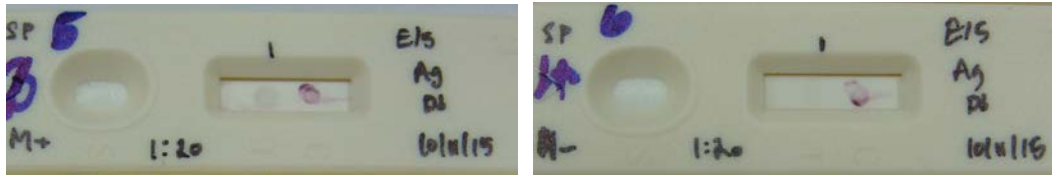
- non- specific band ดังแสดงผลในรูป ซีรัมของที่มีผลแอนติบอดี IgM +ve ได้จับกลุ่มผลบวกสีแดงชัดเจน อย่างไรก็ตามยังพบ non- specific bands



ใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีผลแอนติบอดีโดยวิธี ELISA เป็นมาตรฐาน:

A = IgM +ve; B = IgM -ve; C = IgM -ve, IgG -ve

- จุดกลมผลบวกยังไม่เข้มชัดเจน



อย่างไรก็ตามยังพบ non- specific bands ต่อมาได้มีการสังเคราะห์เพื่อผลิต Recombinant Envelope Glycoprotein ใหม่ อยู่ในระหว่างการทดสอบ immunoreactivity ชนิด IgM/IgG

ข้อวิจารณ์ และสรุปข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้สามารถผลิตต้นแบบผลิตภัณฑ์ ชื่อ ชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM/IgG ซึ่งใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคสครับไทฟัส และ ต้นแบบผลิตภัณฑ์ ชื่อ ชุดทดสอบแบบรวดเร็วการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM/IgG ซึ่งใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรซิส ชุดทดสอบทั้งสองชุดนี้ให้ผลถูกต้องและอ่านผลภายใน 15 นาที ชุดทดสอบทั้งสองชุดนี้จึงเหมาะสมที่จะใช้ในภาคสนามในบริเวณที่สามารถดูแลรักษาผู้ป่วยได้ทันที (Point-of-Care)

การวินิจฉัยจำแนกโรคสครับไทฟัสและโรคเลปโตสไปโรซิส ในกลุ่มไข้เฉียบพลันมีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อสาเหตุของทั้งสองโรค โรคสครับไทฟัส คือเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* และโรคเลปโตสไปโรซิส คือเชื้อก่อโรค *Leptospira spp.* เป็นเชื้อที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ ยังไม่มีรายงานของเชื้อดื้อยา เมื่อการวินิจฉัยโรคทั้งสองโรคกระทำไ้รวดเร็วก็สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันที หากผู้ป่วยได้รับการรักษาช้า ส่งผลให้การดำเนินโรคต่อไปจนถึงขั้นผู้ป่วยเสียชีวิตได้

ในการพัฒนาชุดทดสอบการวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกยีนที่ควบคุมการสร้าง 56kDa type-specific proteins เพื่อผลิตแอนติเจนจากเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* สายพันธุ์ Karp, Kato และ Gilliam ได้ recombinant 56 kDa proteins ของทั้งสามสายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ใน NCBI database เท่ากับร้อยละ 97.8, 97.7 และ 97.4 ตามลำดับ จากผลการทดสอบ immunoreactivity ชี้ว่า recombinant 56 kDa proteins สามารถใช้เป็นแอนติเจนได้ดีมากในการตรวจหาแอนติบอดีต่อทั้งสามสายพันธุ์ของเชื้อ *O. tsutsugamushi* นอกจากนั้นยังมีลักษณะของแอนติเจนที่เหมือนกับ TA716 และ TA763 อยู่ด้วย จึงสามารถใช้เป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อสายพันธุ์ TA716 และ TA763 ได้

การประเมินชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) โดยใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) การประเมินชุดทดสอบโดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย scrub typhus 30 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus 30 ตัวอย่าง (leptospirosis 24 ตัวอย่าง และ dengue 6 ตัวอย่าง) พบว่าชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgM (Scrub_M) ได้ผลลบตรงกันร้อยละ 100 กับผลลบในกลุ่ม IFA ชนิด IgM (IFA_M) (titer <1:50 และ titer 1:50) สำหรับในกลุ่มผลบวก IFA ชนิด IgM (IFA_M) (titer 1:400 ถึง $\geq$ 1:6400) พบว่าได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 100 สำหรับชุดทดสอบ Scrub typhus ชนิด IgG (Scrub_G) พบว่าได้ผลลบตรงกันร้อยละ 97 กับผลลบในกลุ่ม IFA ชนิด IgG (IFA_G) (titer <1:50) สำหรับในกลุ่มผลบวก IFA ชนิด IgG (IFA_G) (titer 1:400 ถึง $\geq$ 1:6400) พบว่าได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 100

การประเมินชุดทดสอบใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการพ่น (spray) แอนติเจนตามมาตรฐาน (version 2) โดยทดสอบชุดตรวจ Scrub IgM & IgG กับซีรัมจากผู้ป่วยไข้เฉียบพลัน จำนวน 320 ตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคสครับไทฟัสโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ indirect immunofluorescence assay (IFA) (titer $\geq 1:400$) พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส ซีรัมที่มีผลบวก (IFA_IgM, titer $\geq 1:400$) จำนวน 100 ตัวอย่างได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 98 สำหรับในกลุ่มซีรัมผลลบ (IFA_IgM, titer $< 1:50$) Scrub_M ได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 94.5 สำหรับในกลุ่มผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส ซีรัมที่มีผลบวก (IFA_IgG, titer $\geq 1:400$) จำนวน 97 ตัวอย่างได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 95.9 ในกลุ่มซีรัมที่มีผลลบ (IFA_IgG, titer $< 1:50 - 1:200$) Scrub_G ได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 82.1

การประเมินผลิตภัณฑ์ต้นแบบชุดทดสอบโรคสครับไทฟัส ชนิด IgM (Scrub_M) และ ชนิด IgG (Scrub_G) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยใช้เกณฑ์การพิจารณาผลบวกจากค่า titer ของ IFA (titer $\geq 1:400$) กับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 318 ตัวอย่าง ประกอบด้วย scrub typhus จำนวน 100 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus จำนวน 218 ตัวอย่าง (leptospirosis จำนวน 53 ตัวอย่าง, dengue จำนวน 96 ตัวอย่าง, มีวรีนไทฟัส จำนวน 30 ตัวอย่าง และ โรคไม่ทราบสาเหตุ จำนวน 39 ตัวอย่าง) ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M/G มีความไวร้อยละ 97.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 98.6 หากพิจารณาแยกสำหรับค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_M มีความไวร้อยละ 81.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ ร้อยละ 92.0 ค่าการประเมินชุดทดสอบ Scrub_G มีความไวร้อยละ 93.0 ความจำเพาะร้อยละ 100 ค่าทำนายผลบวก ร้อยละ 100 และค่าทำนายผลลบ 96.9

การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) ชนิด IgM (LepProt_M) ซึ่งมี recombinant ETF protein เป็นแอนติเจน และ LepLPS_M ซึ่งมี LPS เป็นแอนติเจนตั้ง กับค่า titer ของ IFA ชนิด IgM (IFA_M) ต่อ leptospirosis พบว่าในกลุ่มผลลบของ IFA_M (titer $< 1:50$) ได้ผลลบตรงกันด้วย LepProt_M และ LepLPS_M คิดเป็นร้อยละ 43.5 สำหรับในกลุ่มผลบวกของ IFA_M titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$ ได้ผลบวกตรงกันด้วย LepProt_M คิดเป็นร้อยละ 44.4 (4 ใน 9 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับ LepLPS_M ได้ผลบวกทุกตัวอย่าง

การประเมินชุดทดสอบโรคเลปโตสไปโรซิส ชนิด IgM (LepProt_M) และ ชนิด IgG (LepProt_G) การประเมินชุดทดสอบ โดยใช้ immunofluorescence assay (IFA) เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ใช้ชุดทดสอบกับตัวอย่างตรวจซีรัม จำนวน 60 ตัวอย่าง ประกอบด้วย leptospirosis 24 ตัวอย่าง และ non-scrub typhus 36 ตัวอย่าง (scrub typhus 30 ตัวอย่าง และ dengue 6 ตัวอย่าง) พบว่าชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgM (LepProt_M) ได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 70.6 กับผลลบในกลุ่ม IFA ชนิด IgM (IFA_M) (titer $< 1:50 - 1:200$) สำหรับในกลุ่มผลบวก IFA ชนิด IgM (IFA_M) (titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$) พบว่าได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 44.4 สำหรับชุดทดสอบ leptospirosis ชนิด IgG (LepProt_G) พบว่าได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 66.7 กับผลลบในกลุ่ม IFA ชนิด IgG (IFA_G) (titer $< 1:50 - 1:200$) สำหรับในกลุ่มผลบวก IFA ชนิด IgG (IFA_G) (titer 1:400 ถึง $\geq 1:6400$) พบว่าได้ผลบวกตรงกันร้อยละ 44.4

เมื่อวิเคราะห์ผลทดสอบที่ไม่ตรงกันระหว่างชุดทดสอบ LepProt_M และ LepProt_G กับค่า titer ของ IFA ชนิด IgM/IgG (IFA_M/IFA_G) ในกลุ่มผลลบของ IFA_M พบว่า LepProt_M ได้ผลบวก +S จำนวน 7/8 ตัวอย่าง ที่ได้ผลบวกของทั้ง LepProt_G และ leptospiral antigen สำหรับในกลุ่มผลลบของ IFA_G พบผลบวก +M/+S ด้วย LepProt_G จำนวน 9/13 ตัวอย่าง ซึ่งได้ผลบวกของทั้ง IFA_M/LepProt_M และ leptospiral antigen พอสรุปได้ว่าหากทดสอบซีรัมด้วยชุดทดสอบ LepProt_M และ LepProt_G ได้ผลบวกของทั้ง LepProt_M และ LepProt_G การแปลผลได้ว่า ผู้ป่วยเพิ่งมีการติดเชื้อ leptospirosis

เมื่อวิเคราะห์ผลของ LepProt_M และ LepProt_G ในกลุ่มซีรัมผลบวก (IFA_IgM/IgG, titer $\geq$ 1:400) ได้ผลลบร้อยละ 55.6 แสดงว่าการตรวจหาแอนติบอดียังไม่ดีพอ สมควรที่จะปรับปรุงแก้ไข เช่น บัปเฟอร์ เมมเบรน และ conjugate เป็นต้น เมื่อทราบปัญหาจึงได้พัฒนาจนกระทั่งได้แอนติเจนที่ดีใช้ใน strip test เมื่อวิเคราะห์ผลของ LepLPS_M ได้ผลบวกเกือบทุกตัวอย่าง อาจเป็นไปได้ว่ามีความไวสูงมากหรือมีปัญหาของผลบวกปลอม จำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไป

ในการประเมินชุดทดสอบ ใช้ strip test ซึ่งเตรียมโดยการหยดแอนติเจนเอง (version 1) เทียบกับชุดทดสอบที่ มีวางจำหน่าย SD BIOLINE Leptospira IgM/IgG (SD Lep_M/G) ซึ่งมีความไวร้อยละ 96.2 และความจำเพาะร้อยละ 95.7 จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถใช้ผลการแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างไรก็ตามหากใช้ผลการแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่า LepProt_M มีความไวสูงกว่า SD Lep_M ในด้านการตรวจหาแอนติบอดีในระยะต้นของโรค (early detection) สำหรับการให้ผล microscopic agglutination test (MAT) ที่มีผลบวก titer $\geq$ 1:400 เป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าชุดทดสอบ LepProt_M/G มีความไว ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบ สูงกว่า SD_M/G ยกเว้น SD_M มีความจำเพาะ (ร้อยละ 100) สูงกว่า LepProt_M (ร้อยละ 91.7)

ประเด็นเสนอแนะแนวทางเกี่ยวกับการวิจัยในโครงการนี้ ดังนี้

1. การคัดเลือกยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ต้องการ ต้องมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดีและมีความจำเพาะสูงไม่มีปฏิกิริยาข้าม
2. ขนาดของโปรตีนไม่ควรใช้โปรตีนขนาดเล็กเกินไป เนื่องจากได้เปรียบเทียบกับขนาดของโปรตีนที่ใช้ในโรคสครับไทฟัส (56kDa) กับ ขนาดของโปรตีนที่ใช้ในโรคเลปโตสไปโรสิส (25kDa) ขนาดของโปรตีน 25kDa มีปัญหาในการจับ (binding) กับเมมเบรน ซึ่งต้องใช้เวลานานในการแก้ปัญหาข้อนี้
3. ปัญหาของ non-specific reaction ที่พบในซีรัมทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้แก่ปัญหาโดยหยดซีรัม ลงบนเมมเบรนก่อน ตามด้วยหยดบัฟเฟอร์ในหลุม sample pad เพื่อให้ non-specific reaction จับกับเมมเบรนที่ตำแหน่งที่หยดซีรัม จึงไม่เข้าซ้อนปฏิกิริยาการจับระหว่างแอนติบอดีจำเพาะกับแอนติเจน

เป็นที่น่าเสียดายที่โครงการนี้ยังไม่สามารถผลิต multiplex antibody ทั้งสองโรคให้อยู่ในแถบทดสอบเดียวกันได้ คณะผู้วิจัยจะดำเนินการนำผลงานที่ได้จากโครงการนี้เชื่อมโยงกับการวิจัยและพัฒนาต่อยอดต่อไปเพื่อให้สัมฤทธิ์ผลตามวัตถุประสงค์และเป้าหมายของโครงการ

เอกสารอ้างอิง

1. กัลลยานี ดวงฉวี. การวินิจฉัยเพื่อจำแนกโรคฉี่หนูของผู้ป่วยในพื้นที่ระบาด (Potential Diagnosis of Human Leptospirosis in Endemic Area) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553-2554 รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555.
2. มะลิ ไทยเหนือ. รายงานคนไข้ Scrub Typhus 1 ราย จดหมายเหตุทางแพทย์ ของแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 2549;35:9-26.
3. มะลิ ไทยเหนือ และสำเนียง บุษปวนิช. สะคับ ทัยฟัส และมาเลเรีย ระบาดในการซ้อมรบของกองทหาร อุบลราชธานี. จดหมายเหตุทางแพทย์ ของแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 2501;41:103-9.
4. มุกดา ตฤณานนท์ และคณะ. การตรวจแยกเพื่อพบเชื้อโรคฉี่หนู ที่สุท้สูกามูชิ จากผู้ป่วยที่เป็นโรคสครับไทฟัส ในประเทศไทย. จดหมายเหตุทางแพทย์ ของแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย 2508;48:428-92.

5. วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ ธรธิดา โพธิ์ทนต์ ณรงค์ฤทธิ์ ศิริโสภณา. ชุดตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัสชนิดเร็ว โดยวิธี dot-ELISA. รางวัลสภาวิจัยแห่งชาติ รางวัลผลงานประดิษฐ์คิดค้น ประจำปี 2550, 103-10.
6. วุฒิกรณ์ รอดความทุกข์ ธรธิดา โพธิ์ทนต์ สุภารัตน์ กาญจนวนิชย์ จริยานาฏ เกวี ยุวดี อยู่สุข และ ณรงค์ฤทธิ์ ศิริโสภณา. (2555) การใช้ชุดตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัสชนิดเร็ว โดยวิธี dot-ELISA ในโรงพยาบาลส่วนภูมิภาค. รายงานประจำปี 2553-2554 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร.,12.
7. Adler B, Faine S. A pomona serogroup-specific, agglutinating antigen in *Leptospira*, identified by monoclonal antibodies. Pathology 1983;15:247-50.
8. Arimitsu Y, Kobayashi S, Akama K, Matuhasi T. Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. J Clin Microbiol 1982;15:835-41.
9. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003;3:757-71.
10. Bundo K, Igarashi A. Antibody capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue haemorrhagic fever patients. J Virol Methods 1985;11:15-22.
11. Cardoso MJ, Zuraini I. Comparison of an IgM capture ELISA with a dot enzyme immunoassay for laboratory diagnosis of dengue virus infections. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;22:337-40.
12. Chin J. Control of Communicable Diseases Manual. An official report of the American Public Health Association, 17th edition, 2000: 545-48.
13. Cole JR Jr, Sulzer CR, Pursell AR. Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test. Appl Microbiol 1973;25:976-80.
14. Dounghawee G, Kositanont U, Niwetpathomwat A, Inwisai T, Sagarasaeranee P, Haake DA. Early diagnosis of leptospirosis by immunoglobulin M immunoblot testing. Clin Vaccine Immunol 2008; 15: 492-8.
15. Dounghawee G, Boonsathorn N, Sutdan D, Niwatayakul K, Inwisai T, Sitthipunya A, Sripa B. Development and diagnostic accuracy of a novel *Leptospira* IgM-based immunochromatographic assay for acute leptospirosis. (manuscript)
16. Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. J Med Microbiol 1987;23:1-7.
17. Foongladda S, Inthawong D, Kositanont U, Gaywee J. Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, and Bartonella in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok. Vector Borne Zoonotic Dis 2011;11:1335-41.
18. Indrea J. Cuzzubbo TPE, Nisalak A, Kalayanarooj S, Vaughn DW, Ogata SA, Clements DE, Devine PL. Use of Recombinant Envelope Proteins for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection in an Immunochromatographic Assay. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:1150-5.
19. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. Am J Trop Med Hyg 1989;40:418-27.
20. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. J Infect Dis 1997;176:313-21.

21. Kositanont U, Chotinantakul K, Phulsuksombati D, Tribuddharat C. Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. *J Microbiol Methods* 2007;69:288-97.
22. Kositanont U, Prasajak P, Trakulsomboon S, Sangjun N, Phulsuksombati D. Fingerprints by pulsed-field gel electrophoresis of leptospires isolated from field rats in comparison with reference *Leptospira* serovars. *Asian Biomedicine* 2012;6:557-64.
23. Kositanont U, Saetun P, Krittanai C, Doungchawee G, Tribuddharat C, Thongboonkerd V. Application of immunoproteomics to leptospirosis: towards clinical diagnostics and vaccine discovery. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:400–9.
24. Kositanont U, Wanna W, Duangchawee G, Tribuddharat C. Characterization of recombinant flagellin B protein from *Leptospira* interrogans. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2014;45:1080-9.
25. Kuhn RJ, Zhang W, Rossman MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 2002;108:717–25.
26. Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:11-4.
27. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296-32.
28. Mairuhu JW ATA, Brandjes DPM, van Gorp ECM. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:425–33.
29. M'egret F, Hugnot JP, Falconar A, Gentry MK, Morens DM, Murray JM, Schlesinger JJ, Wright PJ, Young P, van Regenmortel MHV, Deubel V. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue envelope glycoprotein, *Virology* 1992;187:480–91.
30. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sugunan AP, Sharma S, Sehgal SC. Leptospiral proteins expressed during acute & convalescent phases of human leptospirosis. *Indian J Med Res* 2004;120: 151-9.
31. Nawa M. An enzyme-linked immunosorbent assay using a chaotropic agent (sodium thiocyanate) for serotype specific reaction between crude dengue viral antigen and anti-dengue mouse antibody. *Microbiol Immunol* 1992;36:721-30.
32. Palaniappan RU, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:284-92.
33. Sangkasuvana V. Potential Hazard of Scrub Typhus to Military Personnel. XVIII International Congress of Military Medicine and Pharmacy. Bangkok, Thailand. November 1-7, 1965:300-2.
34. Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:622-30.

35. Sitthipunya Ai, Kositanont U. Expression and characterization of low-molecular weight lipoproteins of *Leptospira interrogans* for early diagnosis of leptospirosis. M.Sc. Thesis, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.
36. Talarmin A, Labeau B, J. Lelarge, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. J Clin Microbiol 1998;36:1189-92.
37. Thongboonkerd V, Chiangjong W, Saetun P, Sinchaikul S, Chen ST, Kositanont U. Analysis of differential proteomes in pathogenic and non-pathogenic *Leptospira*: potential pathogenic and virulence factors. Proteomics. 2009;9:3522-34.
38. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C. Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients J Clin Microbiol 2000;38:1053-7.
39. Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML, Devine PL. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. J Clin Microbiol 1997;35:1938-42.
40. Wolff JW, Bohlander HJ. Evaluation of Galton's macroscopic slide test for the serodiagnosis of leptospirosis in human serum samples. Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol 1966;46:123-33.

ชุดทดสอบ
Scrub IgM (Scrub_M)
Scrub IgG (Scrub_G)

คู่มือการใช้งาน

ต้องอ่านคู่มือการใช้งานและวิธีการแปลผลโดยละเอียดก่อนใช้

ชุดทดสอบ Scrub IgM (Scrub_M) & Scrub IgG (Scrub_G) ให้ผลการตรวจอย่างรวดเร็วและแม่นยำภายใน 15 นาที โดยใช้หลักการ Immunochromatography อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ใช้ในการตรวจเบื้องต้น เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgG ต่อ Scrub typhus ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย

ส่วนประกอบของชุดตรวจชนิด IgM หรือ IgG

ชุดตรวจ 1 กล่อง สามารถใช้ตรวจวัดได้ 35 ตัวอย่าง พร้อมอุปกรณ์สำหรับการตรวจ ประกอบด้วย

1. แถบตรวจซึ่งบรรจุในซองอลูมิเนียม
2. ขวดบรรจุน้ำยาบัฟเฟอร์ (Buffer reagent) จำนวน 1 ขวด
3. คู่มือการใช้งาน

การเตรียมสิ่งส่งตรวจ ประสิทธิภาพของการตรวจขึ้นอยู่กับคุณภาพของสิ่งส่งตรวจและปริมาณแอนติบอดีที่มี สิ่งส่งตรวจที่ใช้ควรเป็นสิ่งส่งตรวจเก็บใหม่ หากเป็นสิ่งส่งตรวจที่แช่เย็น แช่แข็ง หรือเจือจางมาก่อนแล้วอาจทำให้ประสิทธิภาพของการตรวจลดลง

ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

1. การทดสอบต้องทำที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจ และขวดบรรจุน้ำยาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที
2. ฉีกซองบรรจุแถบตรวจ เมื่อฉีกซองแล้วต้องใช้เวลาไม่เกิน 15 นาที
3. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจปริมาณ 5 ul โดยใช้ autopipette หยดลงที่ตำแหน่งซ้ายมือซี ด w i n d o w ของแถบตรวจ (S1)
4. หยด buffer จำนวน 4 หยด (100 ไมโครลิตร) ในบริเวณใส่ตัวอย่าง [Sample area (S2)] ที่ปลายแถบตรวจ
5. อ่านผลที่เวลา 15 นาที หลังหยด ห้ามอ่านผลหลังจาก 30 นาที ไปแล้ว

การแปลผล

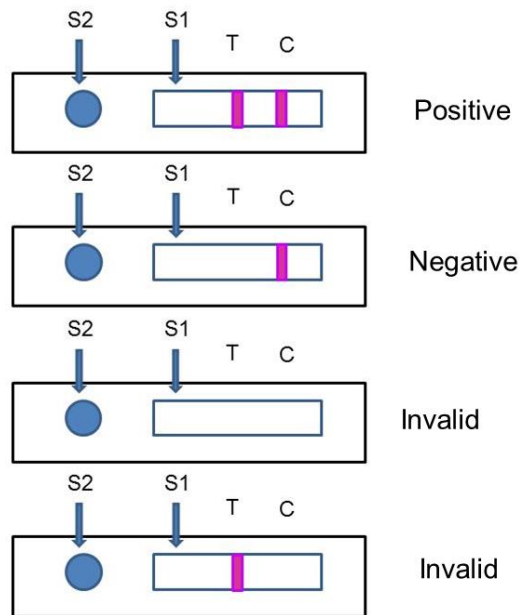
อ่านผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงในช่องอ่านผลที่ตำแหน่ง C (แถบควบคุมหรือ Control line) และที่ตำแหน่ง T (Test line)

ผลบวก (Positive) : ปรากฏแถบที่ตำแหน่ง T และแถบที่ตำแหน่ง C แสดงว่า พบแอนติบอดีต่อ Scrub typhus

ผลลบ (Negative) : ปรากฏ 1 แถบที่ตำแหน่ง C

อ่านผลไม่ได้ (Invalid) : ไม่ปรากฏแถบที่ตำแหน่ง C หรือ ทั้งแถบที่ตำแหน่ง C และที่ตำแหน่ง T ถือว่าไม่สามารถอ่านผลได้ ให้ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ตัวอย่างใหม่และชุดตรวจใหม่ หากยังได้ผลเหมือนเดิม แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธีนี้

การอ่านผล (Interpretation)



ข้อจำกัดของชุดทดสอบคำเตือนและข้อระวัง

1. ชุดตรวจ Scrub IgM & IgG นี้ใช้ในการตรวจเบื้องต้น ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จะต้องใช้ประกอบกับข้อมูล และผลการตรวจอื่นๆ ด้วย
2. การทดสอบต้องปฏิบัติตามวิธีที่ได้ระบุไว้อย่างเคร่งครัด หากไม่ทำตามขั้นตอนอาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้

การเก็บรักษา ชุดตรวจนี้มีอายุการใช้งานถึงวันหมดอายุที่พิมพ์ไว้ข้างซองบรรจุ ให้เก็บชุดตรวจในที่แห้ง อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง ห้ามถูกแสงแดด โดยตรง หากเก็บชุดตรวจในตู้เย็นให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจและขวดบรรจุน้ำยามาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาทีก่อนใช้งาน

ชุดทดสอบ
Lepto-Protein IgM (LeptoProt_M)
Lepto-Protein IgG (LeptoProt_G)

คู่มือการใช้งาน

ต้องอ่านคู่มือการใช้งานและวิธีการแปลผลโดยละเอียดก่อนใช้

ชุดตรวจ Lepto-Protein IgM (LeptoProt_M) & IgG (LeptoProt_G) ให้ผลการตรวจอย่างรวดเร็วและแม่นยำภายใน 15 นาที โดยใช้หลักการ Immunochromatography อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ใช้ในการตรวจเบื้องต้น เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgG ต่อ *Leptospira* ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย

ส่วนประกอบของชุดตรวจชนิด IgM

ชุดตรวจ 1 กล่อง สามารถใช้ตรวจวัดได้ 35 ตัวอย่าง พร้อมอุปกรณ์สำหรับการตรวจ ประกอบด้วย

1. แถบตรวจซึ่งบรรจุในซองอลูมิเนียม
2. ขวดบรรจุน้ำยาบัฟเฟอร์ (Buffer reagent) จำนวน 1 ขวด
3. คู่มือการใช้งาน

การเตรียมสิ่งส่งตรวจ ประสิทธิภาพของการตรวจขึ้นอยู่กับคุณภาพของสิ่งส่งตรวจและปริมาณแอนติบอดีที่มี สิ่งส่งตรวจที่ใช้ควรเป็นสิ่งส่งตรวจเก็บใหม่ หากเป็นสิ่งส่งตรวจที่แช่เย็น แช่แข็ง หรือเจือจางมาก่อนแล้วอาจทำให้ประสิทธิภาพของการตรวจลดลง

ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

1. การทดสอบต้องทำที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจ และขวดบรรจุน้ำยาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที
2. นำตัวอย่างซีรัมที่ต้องการตรวจ เจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ ในอัตราส่วน 1:50 โดยใช้ autopipette ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าหลอด หรือ vortex เมื่อเสร็จแล้วนำไปตรวจโดยใช้แถบตรวจทันที
3. ฉีกซองบรรจุแถบตรวจ เมื่อฉีกซองแล้วต้องใช้ภายในเวลาไม่เกิน 15 นาที
4. ใช้ autopipette ดูด-ปล่อย Serum ที่เจือจางแล้ว 5-10 ครั้ง แล้วหยดลงในบริเวณใส่ตัวอย่าง [Sample area (S)] ที่ปลายแถบตรวจ จำนวน 100 ไมโครลิตร
5. อ่านผลที่เวลา 15 นาที หลังหยด ห้ามอ่านผลหลังจาก 30 นาที ไปแล้ว

การแปลผล

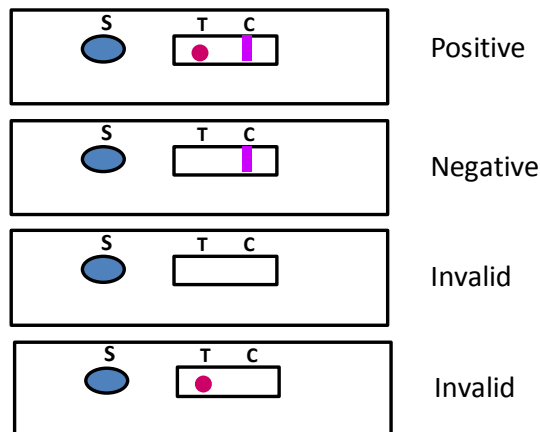
อ่านผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงในช่องอ่านผลตำแหน่ง C (แถบควบคุมหรือ Control line) และจุดวงกลมที่ตำแหน่ง T (Test line)

ผลบวก : ปรากฏ จุดกลมที่ตำแหน่ง T และแถบที่ตำแหน่ง C แสดงว่า พบแอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgG ต่อ *Leptospira* ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย

ผลลบ : ปรากฏ 1 แถบที่ตำแหน่ง C

อ่านผลไม่ได้ : ไม่ปรากฏแถบที่ตำแหน่ง C หรือ ทั้งแถบที่ตำแหน่ง C และจุดกลมที่ตำแหน่ง T ถือว่าไม่สามารถอ่านผลได้ ให้ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ตัวอย่างใหม่และชุดตรวจใหม่ หากยังได้ผลเหมือนเดิม แสดงว่าตัวอย่างนั้นไม่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธีนี้

การอ่านผล / Interpret



ข้อจำกัดของชุดทดสอบ คำเตือนและข้อระวัง

- 1.ชุดทดสอบ LepProt_M & IgG LepProt_G นี้ใช้ในการตรวจเบื้องต้น ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จะต้องใช้ประกอบกับข้อมูลและผลการตรวจอื่นๆด้วย
- 2.การทดสอบต้องปฏิบัติตามวิธีที่ได้ระบุไว้อย่างเคร่งครัด หากไม่ทำตามขั้นตอนอาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้

การเก็บรักษา ชุดตรวจนี้มีอายุการใช้งานถึงวันหมดอายุที่พิมพ์ไว้ข้างซองบรรจุ ให้เก็บชุดทดสอบ ในที่แห้ง อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง ห้ามถูกแสงแดด โดยตรง หากเก็บชุดตรวจในตู้เย็นให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจและขวดบรรจุน้ำยา มาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาทีก่อนใช้งาน

ชุดตรวจ

Lepto-LPS IgM

คู่มือการใช้งาน

ต้องอ่านคู่มือการใช้งานและวิธีการแปลผลโดยละเอียดก่อนใช้

ชุดตรวจ Lepto-LPS IgM ให้ผลการตรวจอย่างรวดเร็วและแม่นยำภายใน 15 นาที โดยใช้หลักการ Immunochromatography อ่านผลได้ด้วยตาเปล่าและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ใช้ในการตรวจเบื้องต้น เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อ *Leptospira* ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วย

ส่วนประกอบของชุดตรวจชนิด IgM

ชุดตรวจ 1 ถู สามารถใช้ตรวจวัดได้ 10 ตัวอย่าง พร้อมอุปกรณ์สำหรับการตรวจ ประกอบด้วย

1. แถบตรวจซึ่งบรรจุในซองอลูมิเนียม
2. ขวดบรรจุน้ำยาบัฟเฟอร์ จำนวน 1 ขวด ห้ามแช่เย็น
3. คู่มือการใช้งาน

การเตรียมสิ่งส่งตรวจ ประสิทธิภาพของการตรวจขึ้นอยู่กับคุณภาพของสิ่งส่งตรวจและปริมาณแอนติบอดีที่มีสิ่งส่งตรวจที่ใช้ควรเป็นสิ่งส่งตรวจเก็บใหม่ หากเป็นสิ่งส่งตรวจที่แช่เย็น แช่แข็ง หรือเจือจาง มาก่อนแล้วอาจทำให้ประสิทธิภาพของการตรวจลดลง

ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

1. การทดสอบต้องทำที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจ มาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที
2. หยด Serum 10 ไมโครลิตร
3. หยดน้ำยาบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร
4. อ่านผลที่เวลา 15 นาที หลังหยด ห้ามอ่านผลหลังจาก 30 นาทีไปแล้ว

การแปลผล

อ่านผลโดยดูจากแถบสีม่วงแดงในช่องอ่านผลตำแหน่ง C (แถบควบคุมหรือ

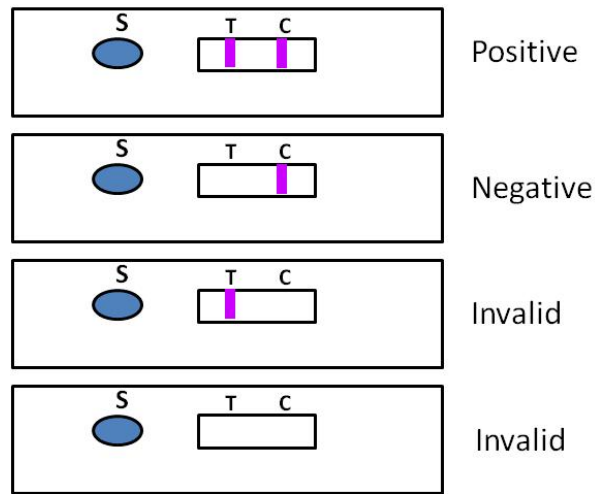
Control line) และตำแหน่ง T (แถบแอนติเจนหรือ Test line)

ผลบวก : ปรากฏแถบสีที่ตำแหน่ง T และแถบที่ตำแหน่ง C แสดงว่า พบ แอนติบอดีต่อ Leptospirosis

ผลลบ : ปรากฏ 1 แถบสีที่ตำแหน่ง C

อ่านผลไม่ได้ : ไม่ปรากฏแถบสีที่ตำแหน่ง C ถือว่าไม่สามารถอ่านผลได้ ให้ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ตัวอย่างใหม่ และชุดตรวจใหม่ หากยังได้ผลเหมือนเดิม แสดงว่า ตัวอย่างนั้นไม่สามารถทดสอบได้ด้วยวิธีนี้

การอ่านผล / Interpret



ข้อจำกัดของชุดทดสอบ คำเตือนและข้อระวัง

1. ชุดตรวจ LeptoKit IgM นี้ ใช้ในการตรวจเบื้องต้น ซึ่งผลการทดสอบที่ได้จะต้องใช้ประกอบกับข้อมูล และผลการตรวจอื่นๆ ด้วย

2. การทดสอบต้องปฏิบัติตามวิธีที่ได้รับมาอย่างเคร่งครัด หากไม่ทำตามขั้นตอนอาจให้ผลคลาดเคลื่อนได้

3. ฉีกซองบรรจุแถบตรวจ เมื่อฉีกซองแล้วต้องใช้อยู่ในเวลาไม่เกิน 15 นาที

การเก็บรักษา ชุดตรวจนี้มีอายุการใช้งานถึงวันหมดอายุที่พิมพ์ไว้ข้างซองบรรจุ ให้เก็บชุด ตรวจในที่แห้ง อุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส ห้ามแช่แข็ง ห้ามถูกแสงแดด โดยตรง หากเก็บชุดตรวจในตู้เย็นให้นำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยต้องนำซองบรรจุแถบตรวจ มาอยู่ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 30 นาที ก่อนใช้งาน