

รายงานฉบับสมบูรณ์ รหัสโครงการ P-๑๓-๕๐๑๓๐

ทุนอุดหนุนโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม
เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยหาแอนติเจนของ เลปโตสไปโรชีส และไข้เด็งกี
แบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่ตรวจได้ทั้งสองโรคในชุดตรวจชุดเดียว
Development of an immunochromatographic test for double
diagnosis of Leptospirosis and Dengue fever

ภายใต้บันทึกข้อตกลงความร่วมมือโครงการบริหารจัดการงานวิจัยและ
พัฒนาด้านการป้องกัน รักษา และควบคุมโรคติดต่ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ

หัวหน้ากลุ่มวิจัย

- | | |
|-------------------------|-----------------------|
| 1. นางวันเพ็ญ ชัยคำภา | มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นางสาวกนิษฐา ภัทรกุล | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

คณะผู้วิจัย

หัวหน้ากลุ่มวิจัย

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง กนิษฐา ภัทรกุล | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

ผู้ร่วมวิจัย

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. รองศาสตราจารย์ ดร. นิทัศน์ สุขรุ่ง | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. นางสาวพิสนี เอี่ยมอุไร | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ มณีวัชรรังษี | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 4. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิตยา อินทรวัดนา | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 5. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรภัค เรียมทอง | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 6. อาจารย์ ดร. ชรินทร์ ถาวรคุณ | สังกัด มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 7. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพ. อมรพันธ์ เสรีมาศพันธ์ | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 8. รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 9. Dr. Alain Jacquet | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 10. รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน | สังกัด มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยเรื่องการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยหาแอนติเจนของ เลปโตสไปโรซิส และไข้เด็งกี แบบอิมมูโนโครมาโทกราฟีที่ตรวจได้ทั้งสองโรคในชุดตรวจชุดเดียวนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ประจำปี 2557-2559 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณหน่วยงาน (สวรส และ สวทช) ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิสำหรับความไว้วางใจและให้โอกาสได้ทำงานวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบุคคลที่มีส่วนสนับสนุนการวิจัยของโครงการนี้ดังนี้

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประเสริฐ เอื้อวรากุล ที่สนับสนุนและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงดาราวรรณ วนะชีวินาวัน อดีตหัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร หัวหน้าภาควิชาปรสิตวิทยา และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ทุกคนที่ให้ความสะดวกและช่วยเหลืออย่างดียิ่งขอบคุณผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ทุกคนของห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรสิตวิทยา และศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านโปรตีนรักษาโรคและพันธุวิศวกรรมแอนติบอดี (Center of Research Excellence on Therapeutic Proteins and Antibody Engineering) คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ร่วมทำงานอย่างทุ่มเทในส่วนต่างๆ ในโครงการวิจัยนี้จนทำให้งานสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์อย่างดียิ่ง ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์แพทย์หญิง ยุพิน ศุภพถมงคลและเจ้าหน้าที่ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างซื่อสัตย์ของผู้ป่วยและการ validate test kits ขอขอบคุณ ดร. ชัญญา พุทธิจันทร์ จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ และหน่วยวิจัยใช้เลือดออก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่เตรียมแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลต่อเชื้อไวรัสเด็งกี

โครงการวิจัยนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือการวิจัยส่วนหนึ่งจากสถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล และภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

บทคัดย่อ

จุดประสงค์หลักของการศึกษาโครงการวิจัยนี้คือการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปในรูปแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟี (ICT) เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนู (leptospirosis) และโรคไข้เลือดออก (Dengue fever) ในลักษณะการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ โดยได้ดำเนินการพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปในรูปแบบอิมมูโนโครมาโทกราฟี เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนู ดังนี้ 1. การคัดเลือกคู่ของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา (โมโนโคลนาล แอนติบอดี โคลน LD5, LE1 และ LF9 จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และโคลน 3, 81 และ 82 จากคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) 2. การพัฒนารูปแบบที่เหมาะสมของชุดตรวจแบบ ICT แบบ MAb1-MAb2 หรือ MAb-PAb หรือ PAb-MAb 3. ดำเนินการเก็บตัวอย่างซีรัมจากผู้ป่วยที่มีไข้ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล โรงพยาบาลศิริราช และ 4. ดำเนินการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจที่ผลิตขึ้นโดยทำการตรวจสอบกับซีรัมที่เตรียมไว้เปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยที่ทราบแล้ว

สำหรับกิจกรรมข้อที่ 1 ดำเนินการประเมินโดย รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (คนกลาง) จากผลการประเมินพบว่า โมโนโคลนาล แอนติบอดีโคลน LD5 และ LE1 จากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เหมาะสมในการนำไปพัฒนาชุดตรวจเชื้อเลปโตสไปรา ดังนั้น ในการพัฒนาชุดตรวจแบบ ICT คณะผู้วิจัยใช้ MAbLE1 ติดฉลากอนุภาคทองคำ และ สเปร์ยลงบน conjugate pad และ MAbLD5 สเปร์ยลงบนแผ่นเมมเบรนที่ตำแหน่ง Test line สำหรับ Control line คณะผู้วิจัยใช้ Goat anti-mouse immunoglobulin ในอีกรูปแบบหนึ่ง คณะผู้วิจัยใช้ โพลีโคลนาล แอนติบอดี จากกระต่ายที่จำเพาะกับ pathogenic *Leptospira* ติดฉลากกับอนุภาคทองคำ และใช้ MAbLD5 เป็น Test line และ Goat anti-mouse immunoglobulin เป็น Control line ชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นทั้งสองรูปแบบสามารถตรวจโปรตีนของเชื้อได้ต่ำที่สุดที่ 0.375 ไมโครกรัม และจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยไม่ทำปฏิกิริยากับแบคทีเรียอื่น (นำมาทดสอบ 27 สายพันธุ์)

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจที่ผลิตขึ้นโดยทำการตรวจสอบกับซีรัมที่เตรียมไว้จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยทราบในภายหลังว่าเป็นซีรัมจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 14 ตัวอย่าง ซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อสครับไทฟัส 16 ตัวอย่าง และซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้เลือดออกจำนวน 30 ตัวอย่าง ผลการทดสอบด้วยชุดตรวจแบบ ICT พบว่าให้ผลบวกกับซีรัมจากผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อเลปโตสไปราทุกตัวอย่างการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ชุดตรวจที่ผลิตขึ้นให้ผลบวกกับซีรัมผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อสครับไทฟัส 11 จาก 16 ราย และซีรัมจากผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไข้เลือดออก 3 ใน 30 ราย จากผลดังกล่าวจะพบว่าชุดตรวจแบบ ICT ที่พัฒนามี sensitivity 100%, specificity 70%, accuracy 77% ผลลบปลอม 0% และผลบวกปลอม 30% ดังนั้น เพื่อเป็นการยืนยันผลบวกปลอมที่เกิดขึ้น คณะผู้วิจัยจึงได้นำโปรตีนที่ Test line ของ strip ที่ให้ผลบวก

ด้วย *Leptospira* ICT test kit แต่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นซีรัมของผู้ป่วยสครับไทฟัส ไปวิเคราะห์หาโปรตีนด้วย mass spectrometry ปรากฏว่าไม่พบแอนติเจนของเชื้อสครับไทฟัส แต่พบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรา จึงทำให้เชื่อว่าผลการวินิจฉัยที่ทราบมาก่อนน่าจะไม่ต้อง สำหรับการประเมินประสิทธิภาพของชุดตรวจครั้งที่ 2 คณะผู้วิจัยได้รับตัวอย่างซีรัมจำนวน 248 ตัวอย่างจากศาสตราจารย์แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธรมงคล ผลการทดสอบพบว่า ได้ผลบวกกับเชื้อเลปโตสไปรา 201 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยยังไม่ได้รับผลการเปรียบเทียบจากห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธรมงคล

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการพัฒนาชุดตรวจแบบ ICT สำหรับตรวจหาเชื้อไข้เลือดออกโดยได้รับโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสไข้เลือดออกจาก ดร. ชัญญา พุทธิขันธุ์ จากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ และหน่วยวิจัยไข้เลือดออก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โดยโมโนโคลนัลแอนติบอดี (SI4) ประกอบด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดี 4 ชนิด (เป็น IgG1 2 ชนิด และ IgG2b 2 ชนิด) ถูกนำไปติดฉลากด้วยอนุภาคทองคำ สำหรับโมโนโคลนัลแอนติบอดี (SI1) ซึ่งเป็นชนิด IgM จะใช้เป็น Test line ส่วน Goat anti-mouse immunoglobulin จะใช้เป็น Control line

เนื่องจากปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจแบบ ICT นี้ยังไม่เพียงพอทำให้ชุดตรวจดังกล่าวยังไม่แล้วเสร็จ ขณะนี้ ดร. ชัญญา พุทธิขันธุ์ และทีมวิจัยกำลังเตรียมแอนติเจนและแอนติบอดีให้เพียงพอต่อการนำไปพัฒนาชุดตรวจ ซึ่งจะทำได้แล้วเสร็จต่อไป

Abstract

The ultimate aim of this study is to invent a ready to use immunochromatographic test (ICT) test kit for double diagnosis of leptospirosis and Dengue fever by means of antigen detection. The research activities on invention of ICT test kit for leptospirosis diagnosis were carried out sequentially which included: 1) determination of suitability of the pre-existing mouse monoclonal antibodies to *Leptospira* antigens (clones LD5, LE1 and LF9 from Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University and clones 3, 81, and 82 from Faculty of Medicine, Chulalongkorn University); 2) development of an ICT test kit using suitable MAb1-MAb2, MAb-PAb, or Pab-MAb format; 3) acquisition of serum samples of patients with febrile illnesses from collection of Prof. Dr. Yupin Suputthamongkol, Siriraj Hospital; and 4) validation of the ICT test kit which was performed in blinded manner in comparison to the previous laboratory and clinical diagnoses. The activity 1 was carried out by Dr. Surasak Wongrattanacheewin, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon-Kaen University (third party). It turns out that suitable monoclonal antibodies were from clones LD5 and LE1 (specific to pathogenic *Leptospira*) from Siriraj Hospital. Therefore, the MAbLE1 was used to conjugate with the colloidal gold particles and impregnated into the gold conjugate pad while the MAbLD5 was immobilized at the Test (T) line. Control (C) line was immobilized with goat anti-mouse immunoglobulin. Alternatively, rabbit polyclonal immunoglobulin to pathogenic *Leptospira* was used to conjugate with the gold particles, MAbLD5 was immobilized at the Test (T) line, and goat anti-rabbit immunoglobulin was at the Control line. Both formats of the ICT test kit had the lowest detection limit at 0.375 µg of *Leptospira* whole cell proteins/strip. They are specific only to *Leptospira* and did not detect antigens of 27 other bacterial species.

Sixty serum samples of patients with febrile illnesses (kept frozen) were obtained from Prof. Dr. Yupin for use for the ICT test kit validation. They were subsequently known after the ICT testing to be 14 sera diagnosed leptospirosis, 16 sera diagnosed scrub typhus, and 30 sera diagnosed Dengue viral infections. All 14 sera diagnosed leptospirosis gave positive results by the ICT test kit. Nevertheless, 11 of the 16 diagnosed scrub typhus and 3 of 30 diagnosed Dengue viral infections gave positive results by the ICT test kit. Thus, the ICT test kit shows 100% sensitivity, 70% specificity, 77% accuracy, 0% negative predictive value and 30% positive predictive value. It is noteworthy that, we

have sent the bands at the test lines of three samples diagnosed scrub typhus which were positive by our leptospirosis ICT test kit for mass spectrometry. The results of the mass spectrometry revealed the presence of *Leptospira* peptides and the absence of scrub typhus antigen; implying that the original diagnosis was inaccurate. The second batch of 248 serum samples was obtained from Prof. Dr. Yupin. Among them, 201 samples were positive for leptospirosis by the ICT test kit. However, we have not obtained the diagnoses of these sera from Prof. Dr. Yupin as yet.

We have prepared ICT test kit for detection of Dengue virus antigen. The monoclonal antibodies to Dengue virus were from Dr. Chanya Putthikhan, Siriraj Hospital. One MAb preparation (SI4) is a pool of 4 MAbs (2 MAbs were mouse IgG1 and the other two were IgG2b) and another MAb (SI1) is IgM. We have used the MAbSI4 to conjugate with gold particles and used the MAbSI1 at the test (T) line. Goat anti-mouse immunoglobulin were immobilized at the control (C) line. Because the supply of Dengue virus antigens and the MAbs from Dr. Chanya was inadequate for optimization of the test kit, we cannot accomplish the test kit invention as yet.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้าที่
คณะผู้วิจัย	i
กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	v
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	vii
สารบัญตาราง (List of Tables)	ix
สารบัญภาพ (List of Illustrations)	x
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	xi
บทนำ (Introduction)	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	7
1. วัตถุประสงค์หลัก (Ultimate objective)	7
2. วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม (Specific objectives)	7
ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์	8
ผลกระทบเชิงสังคม	8
เป้าหมาย/ผลงานหลักของโครงการ	8
เนื้อเรื่อง (Main Body)	9
กิจกรรมที่ 1: การเตรียม reagents สำหรับการประเมินเพื่อคัดเลือกว่าแอนติบอดีที่เหมาะสมเฉพาะ Leptospirosis (สำหรับ Dengue NS1 มาจากโครงการ HBM167)	9
กิจกรรมที่ 2: การประเมิน reagents โดยวิธี spiking และ การใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยเพื่อคัดเลือกว่าแอนติบอดีที่เหมาะสมเฉพาะ Leptospirosis (สำหรับ Dengue NS1 มาจากโครงการ HBM167)	18
กิจกรรมที่ 3: การเก็บตัวอย่างสำหรับประเมิน ICT kit (จำนวนตัวอย่างบางส่วนจะได้รับ ความอนุเคราะห์จากโครงการ HBM142)	22
กิจกรรมที่ 4: การพัฒนาและผลิต ICT kit	22
กิจกรรมที่ 5: To perform an in-house validation of the ICT kit	25

	หน้า
กิจกรรมที่ 6: To validate the ICT test kit using clinical samples and to determine diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and positive and negative predictive values of the ICT kits in diagnosis of leptospirosis and Dengue fever	28
ข้อวิจารณ์ สรุปและข้อเสนอแนะ (Discussion, Conclusion and Recommendation)	36
เอกสารอ้างอิง (References)	38
ภาคผนวก	42

สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้าที่
ตารางที่ 1 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAbLD5	18
ตารางที่ 2 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAbLE1	18
ตารางที่ 3 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAbLF9	19
ตารางที่ 4 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAb: No. 3	19
ตารางที่ 5 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAb: No. 81	19
ตารางที่ 6 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสม MAb: No. 82	19
ตารางที่ 7 การทดสอบความไว MAbLE1 ในการ detect <i>Leptospira</i> antigen ด้วยวิธี Dot-blot ELISA	21
ตารางที่ 8 การทดสอบความไว MAbLD5 ในการ detect <i>Leptospira</i> antigen ด้วยวิธี Dot-blot ELISA	21
ตารางที่ 9 การทดสอบความไว MAb No. 82 ในการ detect <i>Leptospira</i> antigen ด้วยวิธี Dot-blot ELISA	22
ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลของชุดทดสอบ และผลตรวจจาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล	29
ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลของชุดทดสอบ ICT test kit และผลการวินิจฉัยเดิมจาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล สำหรับตัวอย่างซีรัม 60 ตัวอย่างแรก	32
ภาคผนวก ตารางแสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย mass spectrometry	43

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

		หน้าที่
รูปที่ 1	แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot-blot ELISA	12
รูปที่ 2	แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดี LE1 ต่อ homogenates ของ pathogenic และ non-pathogenic <i>Leptospira</i> spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ด้วยวิธี Western-blot analysis	14
รูปที่ 3	แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดี LD5 ต่อ homogenates ของ pathogenic และ non-pathogenic <i>Leptospira</i> และแบคทีเรียอื่นๆ ด้วยวิธี Western-blot analysis	15
รูปที่ 4	แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดี LF9 ต่อ homogenates ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp. และ non-pathogenic <i>Leptospira</i> spp. ด้วยวิธี Western-blot analysis	16
รูปที่ 5	การทำเส้น test และ control lines โดยใช้เครื่องเสปรย์ (Bio-dot) และนำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	23
รูปที่ 6	การแช่เมมเบรนในบัฟเฟอร์ให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที และนำไปอบให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	23
รูปที่ 7	การประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit	24
รูปที่ 8	การตัดชุดประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit ด้วยเครื่องตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 4 มิลลิเมตร	24
รูปที่ 9	แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ ICT strip ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic <i>Leptospira</i> spp. และ non-pathogenic <i>Leptospira</i> spp. ด้วยวิธี immunochromatographic test	25
รูปที่ 10	แสดงผลการทดสอบหาความไวของ immunochromatographic test kit เมื่อทำการทดสอบด้วย homogenate ของ pathogenic <i>Leptospira</i> spp.: <i>L. Autumnalis</i>	26
รูปที่ 11	แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ ICT strip ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic <i>Leptospira</i> spp. ในซีรัม ด้วยวิธี immunochromatographic test	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
$\times g$	Gravity
$^{\circ}\text{C}$	Degree(s) Celsius
μg	Microgram(s)
μl	Microliter(s)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
cfu	Colony-forming unit(s)
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
GAM	Goat anti-mouse immunoglobulins
HRP	Horseradish peroxidase
ICT	Immunochromatographic test
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
ml	Milliliter(s)
mM	Millimolar(s)
NBT	Nitro blue tetrazolium
NC	Nitrocellulose membrane
ND	Negative deviation
PAb	Polyclonal antibodies
PBS	Phosphate buffered saline, pH 7.4
PBST	PBS containing 0.05% Tween-20
PD	Positive deviation
R^2	Coefficient of determination
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	Relative sensitivity
SP	Relative specificity
spp.	Species
TBST	Tris buffered saline containing 0.05% Tween-20
Tween-20	20 mole-ethoxylate of sorbitan monolaurate

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Certain arthropod borne infections, e.g., Dengue fever, malaria, encephalitis, Hanta virus infection, Rickettsial infections, have predilection for tropical areas like Thailand due to climatic conditions that favor flourish of their vectors including mosquitoes, mites, and ticks. Water-borne infections such as viral hepatitis, leptospirosis, typhoid and other salmonellosis, are also common due to water contamination especially during the monsoon floods. These life-threatening tropical diseases often have several overlapping clinical features. Fever and thrombocytopenia are common in Dengue, malaria and leptospirosis; coagulopathy is frequent in leptospirosis and viral hepatitis; hepato-renal syndromes are seen in leptospirosis, falciparum malaria and scrub typhus; pulmonary-renal syndrome is caused by falciparum malaria, leptospirosis, Hanta virus infection, and scrub typhus; fever with altered mental status is produced by Japanese encephalitis, cerebral malaria, typhoid encephalopathy and fulminant viral hepatitis (Kothari *et al.*, 2006). Therefore differential diagnoses based on the patients' inhabitats/history and their presented clinical pictures are inaccurate.

Laboratory diagnoses of many of the above mentioned tropical infections are made by demonstration of serum antibodies. These assays are frequently negative in the first week of illness and have less implication in treatment indication. Patients with individual diseases required similarly prompt treatment but different managements and/or pharmacologic drugs. Moreover, the patients from areas where these diseases share common endemicity may give positive results to many antibody based-assays caused by the antibodies that sustained from previous exposures. An accurate and early diagnosis would, not only permit the prompt initiation of proper therapy, but also avoid harm caused by inappropriate management and treatment as well as contribute to accurate epidemiological record which would provide correct information for rapid measures to intervene the further transmission of the disease.

According to the round table discussion of Thai medical research scientists who have had experiences on various attributions of tropical febrile illnesses, e.g., Dengue fever, leptospirosis, influenza, melioidosis, scrub typhus, etc., hosted by authorities of the Emerging Infectious Disease (EID) Program, BIOTEC, NSTDA, on October 9th, 2012, at the

NSTDA office, Yotee road, Bangkok, it was concluded that an antigen-based test kit for triple diagnosis of leptospirosis, DF and scrub typhus, should be developed in Thailand by using existing reagents (pathogenic isolates, their antigens and respective monoclonal and polyclonal antibodies) in various laboratories in the country. Nevertheless, after asking around it was found that there is a shortage of reagents for scrub typhus diagnosis and they await subsequent production. Therefore in this research, an antigen-based test kit based on immunochromatographic test (ICT) format for double diagnosis of leptospirosis and Dengue fever was invented by using the reagents that were available at the time of the project was commencement. The so-developed test kit was validated against patients' clinical samples in comparison with patient clinical features and conventional/standard laboratory results.

Leptospirosis

Leptospirosis is an important pyrogenic zoonosis of humans in temperate and tropical areas including Thailand (Faine, 1982). It is considered a re-emerging infectious disease, not only because of an increase in its incidence during the past few decades but also the more severity of the illness. This infectious disease is caused by pathogenic spirochetal bacteria of the genus *Leptospira*. Presently *Leptospira* bacteria are divided according to their genetic relatedness based on 16S rRNA into three clades including: **pathogenic** [*L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. kmetyi*, *L. noguchi*, *L. santarosii* and *L. weilii*], **intermediately pathogenic** (*L. broomii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. licerasiae* and *L. wolffii*) and **saprophytic** [*L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. terpstrae* (genomospecies 4), *L. vanthielii* (genomospecies 3), *L. wolbachii*, and *L. yanagawae* (genomospecies 5)] (Levett, 2008; Cerqueira and Picardeau, 2009; Cinco, 2010; Ricaldi *et al.*, 2012). Certain strains of the intermediately pathogenic clade, however, shared phenotypic characteristics of saprophytic and pathogenic species (Levett, 2008). Before 2008, some of the intermediately pathogenic *Leptospira* species were either classified as pathogenic *Leptospira* or they did not exist at the time (Levett, 2008).

Leptospira infection is usually associated with occupational or recreational exposures, such as rice farming, gardening, veterinary work, abattoir work, meat inspection, or wild water sport activities (Douglin *et al.*, 1997). Pets, livestock and wild animals, especially rats, are *Leptospira* reservoirs. Human infections occur either from direct exposures to the infected or reservoir animals or their products (urine, dead body/carcass)

or indirectly through contact with water or damp soil contaminated with the bacteria (Dupont *et al.*, 1997). *Leptospira* gains entry into the host through wounded, abraded or macerated skin and mucosae (oral, conjunctival and genital) (Faine, 1982). The disease has an incubation period of 2-26 days with an average of 10 days. Symptoms and severity of leptospirosis vary greatly from asymptomatic (only recognized retrospectively by the presence of serum antibody to *Leptospira* spp.), mild, flu-like illness to fatal (ictero) hemorrhagic form (Weil's syndrome) with severe involvement of vital organs such as kidney, lung and liver (Farr, 1995). Early and accurate differential diagnosis of leptospirosis from other illnesses is necessary for prompt and proper treatment, which is life-saving for patients especially those with severe disease. However, leptospirosis diagnosis based on clinical pictures is inaccurate, especially in tropical countries like Thailand where other similar acute febrile illnesses are common. Leptospirosis may be confused with rickettsial infections including scrub typhus and murine typhus, Dengue fever, typhoid, salmonellosis, influenza, Hanta virus infection, melioidosis, malaria, viral hepatitis, cancers, *etc.* (Galton *et al.*, 1958; Kothari *et al.*, 2006).

Laboratory diagnosis of leptospirosis is based primarily on either culture/isolation of the leptospires from specimen or demonstration of a rise in serum antibodies (Gussenhoven *et al.*, 1997). The former is laborious, expensive and may not be successful (low sensitivity). *Leptospira* spp. require delicate and complex culture medium, *i.e.*, the medium must contain several growth-promoting substances and selected anti-microbial agents for suppressing contaminants such as fungi or saprophytes. *Leptospira* spp. cell has long doubling time (6-8 hours or longer) in the artificial medium thus taking time to obtain the culture result. All of these limitations make *Leptospira* culture method too slow for early diagnosis. Direct demonstration of the spirochetes in specimen preparations by dark-field microscopy, direct immunofluorescence test, and immunohistochemistry were hampered by the lack of specificity due to non-specific background (Johnson and Harris, 1967). Several antibody based-assays have been developed for detecting the rise of serum antibodies. Among them, the microscopic agglutination test (MAT) is the World Health Organization (WHO) referenced method with which the other developing techniques should be compared for evaluating their diagnostic sensitivity, specificity and accuracy. However, the MAT encounters several drawbacks which limit its wide application in the developing parts of the world and remote areas where leptospirosis occurs more extensively. These include the requirements of a good microbiology

laboratory and special setting for maintaining a broad range of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* serovars for live antigen preparations, a panel of serotyping antisera, standard antisera, dark-field microscope, low temperature incubator, and technical expertise. Diagnosis of leptospirosis by MAT preferentially requires paired serum samples to look for a four-fold rise of the titer between acute and convalescent sera which delays the diagnosis and in many instances the paired sera are not available. A single MAT titer of >1:800 is diagnostic also but it took several days post-infection to reach or the titer has never reached (Kothari *et al.*, 2006). Moreover, false negative results are frequently reported when the causative *Leptospira* serovar has not been included in the panel of the typing organisms (Thiermann, 1984). Several alternatives of antibody detection assays were developed for diagnosis of acute leptospirosis. These included the hemolytic test (Cox *et al.*, 1957), the slide agglutination test (Galton *et al.*, 1958), the indirect hemagglutination assay (Sulzer *et al.*, 1975; Levett and Whittington, 1998), the indirect immunofluorescence test (Torton *et al.*, 1966), the microcapsule agglutination test (Arimitsu *et al.*, 1994), IgM indirect/membrane ELISA (Adler *et al.*, 1980; Milner *et al.*, 1985; Winslow *et al.*, 1997), the LEPTOstick (Gussenhoven *et al.*, 1997), the lateral flow assay (immunochromatography) (Smits *et al.*, 2001) and the multi-test strips (Watt *et al.*, 2005). While these methods are much simpler than the MAT and many of them are available commercially, they still need a lag period after infection before the antibodies become detectable; and once incited, the antibodies stay for a long time, even after the pathogenic organisms have been eliminated. IgM antibodies to *Leptospira* were detected by dot-ELISA in the infected subjects up to the 6th month, decreasing to 57% by the 10th month, and persisted in some subjects beyond the 12th month (de Silva *et al.*, 1997). These data indicate that the antibody detection assay is less sensitive during early infection, as IgM antibodies were not detected in many patients during the first few days of the acute phase of illness (de Silva *et al.*, 1997) and also imply that such assays cannot be used for monitoring the treatment efficacy. As for MAT, false negative results of these antibody tests may occur due to the absence of homologous antigen to the patient's causative serovar in the antigenic preparation used in the assays. Thus, by far and large, an early, simple and accurate diagnostic method for acute leptospirosis is needed and awaits development.

Dengue fever (DF)

DF is an arthropod-borne virus infection caused by Dengue viruses of the family *Flaviviridae*. Dengue viruses comprise of four antigenically distinct serotypes, 1-4 (Simmons *et al.*, 1931). DF is transmitted by the bite of the *Aedes* spp. mosquito carrying the virus. Endemic area of DF has been expanding during the last two decades. Thailand is endemic for DF which is reported every year since its first found in 1949. The first DF outbreak was in 1958, during which 2,158 cases and 300 deaths occurred. There were two large epidemics in 1987 and 1998 when 174,285 and 129,954 cases were reported, respectively. The case fatality rates during both epidemics were 0.58 and 0.2%. The majority of cases were in children below 14 years of age. All four serotypes of the Dengue virus have been isolated in the Thailand and *Aedes aegypti* is the principal vector. Each year, the maximum DF transmission occurs during July to September (WHO/SEARO Report, 2007).

After the mosquito bite, the virus initially replicates in the skin and lymph nodes before dissemination in the blood stream (Wu *et al.*, 2000; Wilder-Smith and Schwartz, 2005). The virus has an incubation period of 4-7 days, though can range from 3-14 days. Usually it is a non-specific febrile illness but certain factors can predispose to severe manifestations like dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). These factors are: infection with dengue virus serotype-2 (Sangkawipa *et al.*, 1984); age less than 11 years (Guzman *et al.*, 1990); good nutritional status (since severe manifestations are related to the host immune response, malnourished individuals are less prone to a vigorous immune reaction to the virus) (Thisyakorn *et al.*, 1993); subsequent infection with a different viral serotype due to antibody dependant enhancement (ADE) of viral entry into monocytes, increased antigen-antibody complexes with subsequent vascular injury and increased T cell responses with immune activation (Wu *et al.*, 2000; Zivna *et al.*, 2002). ADE is believed to occur due to persistence of cross-reacting antibodies from the previous infection. These antibodies are unable to neutralize viruses from different serotypes but after binding to the viruses enhance uptake *via* the Fc receptors on monocytes. The cascade of cytokines then causes endothelial injury, platelet and clotting factor consumption and increased vascular permeability. Predictors of DSS in children include: younger age, altered sensorium, paralytic ileus and significantly deranged prothrombin time. DSS causes high fatality rate which could be as high as 17% (Shah *et al.*, 2004). There are three main clinical subsets of dengue infection (Wilder-Smith

and Schwartz, 2005). Classic dengue presents with fever, severe headache and particularly myalgias; thus it is given the name of 'Break-bone fever' (Rigau-Perez, 1998). There may be associated lymphadenopathy, pharyngeal and ocular congestion and respiratory or gastro-intestinal symptoms. The fever lasts for 4-5 days and around the time of defervescence about half of patients develop a macula-papular rash that lasts 2-3 days and may be pruritic. Rarely there may be myocarditis, hepatitis, pneumonitis and bleeding into internal organs. Dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) occur due to increased capillary permeability and vasodilatation 3-7 days after starting of the illness, caused by mediators like TNF- α and IL-1 released from infected monocytes and macrophages. The capillary leak causes the rise in the hematocrit, periorbital edema pleural effusions and ascites. The capillary leak and thrombocytopenia may give a positive capillary test which is more than 20 petechiae in an area of one inch² when the blood pressure cuff is inflated midway between systolic and diastolic blood pressure for 5 minutes (Kalayanarooj and Vaughn, 1997). Shock often occurs 24 hours before or after defervescence supporting a role for immune mediated injury. The shock lasts for a day or two and patients either die or get better. Encephalopathy, GBS and acute transverse myelitis have also been associated with dengue virus infection (Patey *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 2000). Leukopenia occurs due to a direct suppressant effect on the bone marrow. Thrombocytopenia occurs mainly due to increased platelet destruction by adsorption of virus or antigen-antibody complexes on the platelet surface with subsequent immune (complement mediated-) destruction (Rigau-Perez, 1998). A coagulopathy may occur due to consumption of coagulation factors due to disseminated intravascular coagulopathy (DIC), liver dysfunction and molecular mimicry between the viral proteins and coagulation factors. Liver injury may occur due to direct invasion by the virus or due to immune mediated injury.

Current diagnostic methods for primary DF include: 1) detection of antibodies by hemagglutination inhibition assay showing at least a four-fold rise in titer of neutralizing antibody in paired serum samples; 2) ELISA for specific IgM antibodies particularly to the non-structural protein-1 (NS1 protein) which appear around the 6th day of illness and last from 1 to 3 months; and 3) ELISA for detecting IgG antibodies that appear after 7-10 days of the illness and last for months to years. The antibody assays for DF diagnosis are facing similar limitations to those for leptospirosis. Virus isolation techniques are not easily available as they are laborious, time consuming and not always successful. RT-PCR

detects the virus within 1-2 days of manifestations and the test being negative later in the illness. Diagnosis of acute infection based on antigen detection is not available.

Rationale of antigen-based assays for detecting antigenemia

During the acute phase of systemic infections, such as leptospirosis and DF, respective pathogens are found in the patient's blood circulation. The innate immune response is alarmed by pathogen associated molecular patterns (PAMPs) through the pattern recognition receptors including acute phase serum proteins, complement receptors, Toll-like receptors, scavenger receptors and NOD-like receptors. Inflammation (fever, tissue edema, pain, blood congestions and organ dysfunction) causes recruitment of innate cells including phagocytes (neutrophils, monocytes, tissue macrophages) and natural killer cells. A fraction of the invading pathogens are destroyed by the host innate immunity. The pathogen may be lysed by complement and their antigens should be in the blood circulation before being excreted with the urine. Besides, the pathogens may be engulfed by the circulating phagocytes into the phagosome and were killed in the subsequently formed phagolysosomes. In this instance, antigenic determinants (epitopes) of the pathogens will be contained in the phagolysosome for subsequently assembling into peptide grooves of MHC class-II molecules while the smallest chemical units (amino acid, sugars and fatty acids) are reused by the host. Therefore, blood phagocytes are rich sources of materials for antigen and DNA based-diagnostic assays. Several antigen based-immunodiagnostic assays, such as indirect/dot ELISAs, have been used successfully in our laboratory for early diagnosis of infections such as leptospirosis (Saengjaruk *et al.*, 2002), filariasis (Wongkamchai *et al.*, 2002) and typhoid (Chaicumpa *et al.*, 1988, 1992).

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลัก (Ultimate objective)

To produce a ready to use immunochromatographic test (ICT) kit for double diagnosis of leptospirosis and Dengue fever by means of antigen detection

วัตถุประสงค์เชิงกิจกรรม (Specific objectives)

1. To collect clinical samples of patients with febrile illnesses, esp. leptospirosis and Dengue fever
2. To prepare antigens (whole cell homogenates) of *Leptospira* spp. and polyclonal and monoclonal antibodies specific to *Leptospira* spp.

3. To evaluate suitability of the monoclonal and polyclonal antibodies to be used as diagnostic reagents in immunochromatographic test kit
4. To prepare immunochromatographic test (ICT) kit for double diagnosis of leptospirosis and Dengue fever
5. To perform an in-house validation of the ICT kit
6. To validate the ICT test kit using clinical samples and to determine diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and positive and negative predictive values of the ICT kits in diagnosis of leptospirosis and Dengue fever

ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์

ชุดตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันเพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราที่ยังไม่มีจำหน่าย ส่วนชุดตรวจหาแอนติเจนไวรัสเด็งกีที่มีจำหน่าย แต่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ การผลิตชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราและไวรัสเด็งกีขึ้นใช้เองในประเทศ ที่ตรวจได้รวดเร็ว และใช้งานได้ง่าย จะเป็นการลดการนำเข้าชุดตรวจจากต่างประเทศ พึ่งตนเองได้ ประหยัดราคาค่าตรวจ และสามารถพัฒนาผลิตจำหน่ายในต่างประเทศเพื่อเป็นการเพิ่มรายได้ของประเทศอีกด้วย

ผลกระทบเชิงสังคม

มีชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราและไวรัสเด็งกีที่ราคาไม่แพง ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือราคาแพง สามารถใช้ได้สถานพยาบาลระดับชุมชนซึ่งประชาชนส่วนใหญ่มาใช้บริการและอาจพบว่ามีกระบาดของโรค เนื่องจากผู้ป่วยมาด้วยอาการไข้ที่ไม่จำเพาะ จำเป็นต้องใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรค การวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว จะทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้องเหมาะสมได้อย่างทันท่วงที เป็นการลดอัตราทุพพลภาพและเสียชีวิตได้ และเป็นผลดีด้านเศรษฐกิจและสังคม

เป้าหมาย/ผลงานหลักของโครงการ

มีชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราและไวรัสก่อโรคไข้เด็งกี เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยกรณีที่สงสัยผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสและ/หรือไข้เด็งกี และวินิจฉัยแยกจากอาการมีไข้เพราะสาเหตุอื่น

เนื้อเรื่อง (Main Body)

กิจกรรมการวิจัยที่เสนอไว้ สำหรับการพัฒนา ICT test kit เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปโรซิส มีดังนี้

กิจกรรมที่ 1: เตรียม reagents สำหรับการประเมินเพื่อคัดเลือกว่าแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับทำชุดตรวจ Leptospirosis (สำหรับแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับทำชุดตรวจ Dengue NS1 มาจากโครงการ HBM167)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; Mab) ที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปโรซิส มาจากห้องปฏิบัติการสองแห่ง คือจาก ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล (โครงการย่อยที่ 1) และจาก ผศ. พญ. กนิษฐา ภัทรกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (โครงการย่อยที่ 2)

โครงการย่อยที่ 1

โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มาจากห้องปฏิบัติการของ ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา มีความจำเพาะต่อ epitopes ที่ต่างกันของโปรตีน LipL32 ของเชื้อเลปโตสไปรา (Saengjaruk *et al.*, 2002; Maneewatch *et al.*, 2008, 2009, 2014).

การเพาะเลี้ยง *Leptospira*

คณะผู้วิจัยได้รวบรวมและเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium (10% albumin-polysorbate-80 *Leptospira* enrichment) (Difco, MI, USA) ที่อุณหภูมิ 30°C incubator ใน aerobic condition เมื่อเชื้อเจริญถึง late log phase ได้นำ bacterial suspension ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มล. ปั่นเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ความเร็วรอบ 3,500 × g เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วย phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) ปั่นล้างเซลล์เพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียออกให้หมด แล้วนำตะกอนเซลล์ไป suspend ด้วย sterile distilled water ปริมาตร 1 ml จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง นำ whole cell homogenates ที่เตรียมได้ไปวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยวิธี Bradford และวัดค่า dry weights

การเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ *Leptospira* spp.

ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า ไฮบริโดมาที่ Secrete โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับ *Leptospira* spp. ได้มาจากห้องปฏิบัติการวิจัยสองแห่งด้วยกัน คือจากห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรสิตวิทยา และศูนย์วิจัยเป็นเลิศด้านโปรตีนรักษาและพันธุวิศวกรรมแอนติบอดี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 3 clones และจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย รศ. พญ. กนิษฐา ภัทรกุล 3 clones รายละเอียดมีดังนี้

โมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับ *Leptospira* spp. จาก ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรสิตวิทยา และศูนย์วิจัยเป็นเลิศด้านโปรตีนรักษาและพันธุวิศวกรรมแอนติบอดี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะผู้วิจัยได้ทำการเลี้ยงไฮบริโดมาโคลน LE1 (IgG2a), LD5 (IgG1) และ LF9 (IgG1) (Saengjaruk *et al.*, 2002) ซึ่งหลังโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จับจำเพาะกับ LipL32 protein ของ pathogenic *Leptospira* spp. (clones LE1 และ LD5) และ all *Leptospira* spp. (clone LF9) โดยนำเซลล์ไฮบริโดมาดังกล่าวไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรัม (serum-free medium) ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศ 5% CO₂ จนเซลล์หลังแอนติบอดีออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ในปริมาณหนึ่งลิตร จากนั้นนำแอนติบอดีนี้ไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วย Amicon PM10 จนแอนติบอดีมีเหลือเพียง 10 มิลลิลิตร ทำการ dialysis ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต จากนั้นแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (IgG) ด้วย Protein G Sepharose resin ดังนี้

นำแอนติบอดีที่เตรียมข้างต้นไปผ่านคอลัมน์โปรตีนจี (Protein G Sepharose column) หลังจากล้าง unbound materials ที่ไม่จับกับโปรตีนจีออก ด้วย binding buffer แล้ว ทำการ elute แอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ปรับสภาพ pH ให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl, pH 9.0 นำ purify IgG antibody ที่เตรียมได้ไปทำการ dialysis ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต จากนั้นปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้เป็น 1.5 mg/ml ทำการวัดแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA และตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot-blot ELISA และ Western-blot analysis

การวัดแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA

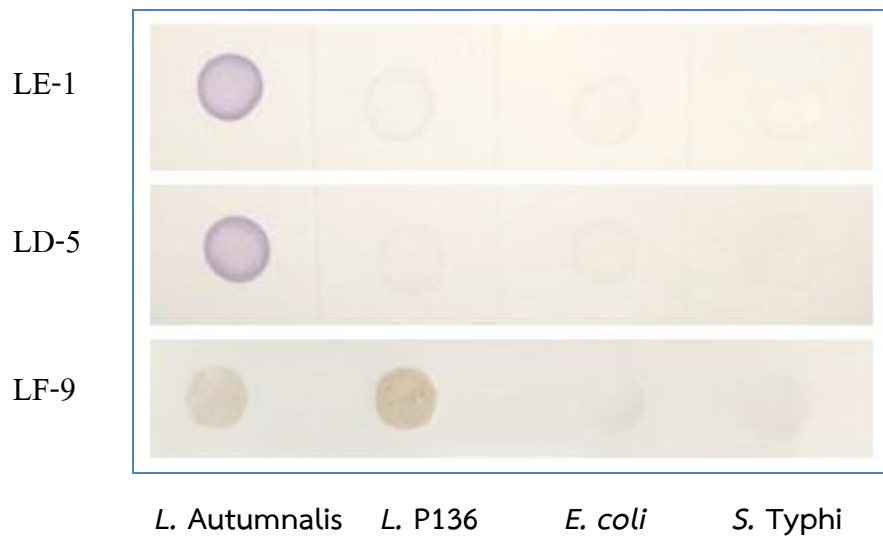
คณะผู้วิจัยได้ทำการวัดแอนติบอดีไตเตอร์ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยนำ whole cells homogenate ของ *Leptospira* serovar Autumnalis ไปทำการเคลือบหลุมทดสอบที่ความเข้มข้น 10 µg/ml บ่มไว้ให้แห้งในตู้ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ล้าง plate ด้วย washing buffer (0.01 M PBST, pH 7.4) จากนั้นทำการ block ที่ว่างในหลุมทดสอบด้วย blocking buffer (1% bovine serum albumin; BSA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างหลุมทดสอบ ด้วย washing buffer เติม โมโนโคลนาลแอนติบอดี (purified IgG) โดยเริ่มต้นความเข้มข้นที่ 200 µg/ml และเจือจางลงเท่าตัวในแต่ละหลุมทดสอบถัดไป จนถึงหลุมสุดท้าย เก็บ plate ไว้ 1 ชั่วโมง ล้างหลุมทดสอบ ด้วย washing buffer แล้วเติม secondary antibody (anti-isotype)-HRP conjugate เก็บไว้ 1 ชั่วโมง ล้างหลุมทดสอบ ด้วย washing buffer เติม substrate (ABTS) เก็บไว้ 10 นาทีในที่มืด ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

จากการวัดแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าโมโนโคลนาลแอนติบอดี LE1, LD5 และ LF9 มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์เท่ากับ 1:128; 1:128,000 และ 1:2 หรือ 1,280; 1,280,000 และ 20 ELISA units/ml ตามลำดับ

การตรวจความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot-blot ELISA

คณะผู้วิจัยทำการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot-blot ELISA โดยนำ whole cells homogenates ของ *Leptospira* spp. และ heterologous bacteria ไปทำการ

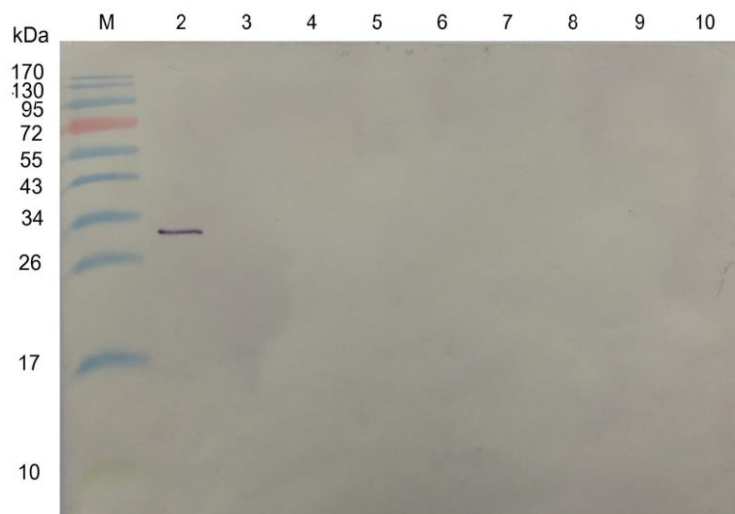
หยดลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NC) ที่ความเข้มข้น dry weight 10 µg/dot ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer จากนั้นทำการ block ที่ว่างบนแผ่น NC ด้วย blocking buffer (3% bovine serum albumin) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer (0.02 M TBST) เติมนิโคตินแอนติบอดีลงไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer จากนั้นเติม goat-anti-mouse immunoglobulin-alkaline phosphatase conjugate ที่ dilution 1:3,000 แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer จากนั้นเติม substrate (BCIP/NBT) เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาโดยล้างแผ่น NC ด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น



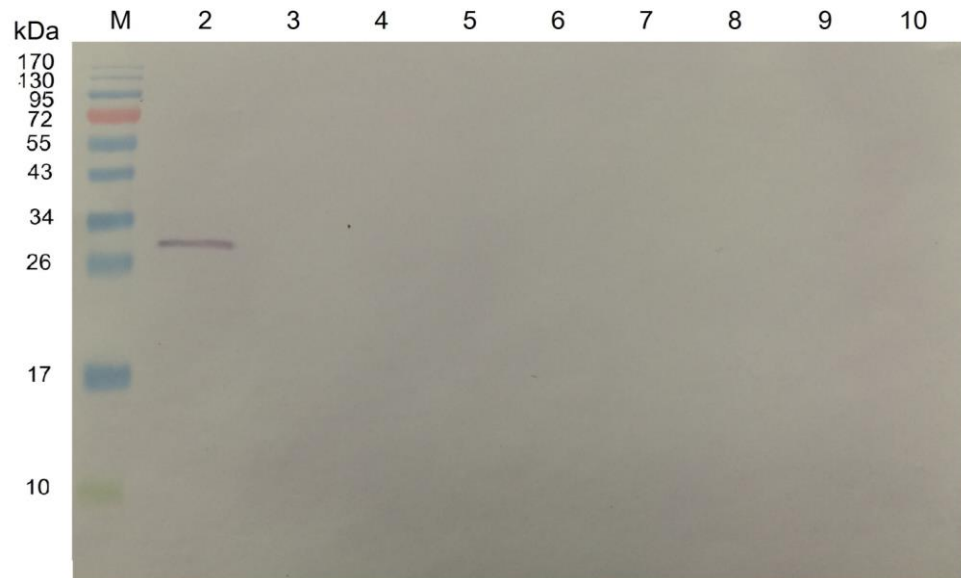
รูปที่ 1: แสดงตัวอย่างผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดีด้วยวิธี Dot-blot ELISA จะเห็นว่าโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษานี้ (LE1 และ LD5) ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ whole cells homogenates ของ homologous bacteria (pathogenic *L. Autumnalis*) แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ non-pathogenic *Leptospira* (*L. P136*) และ heterologous bacteria (แสดงผลเพียง *E. coli* และ *S. Typhi*) ส่วนแบคทีเรียอื่นๆ (ไม่ได้แสดงผล) และโมโนโคลนัลแอนติบอดี LF9 ทำปฏิกิริยาทั้ง pathogenic & non-pathogenic *Leptospira* spp.

การตรวจ antigenic specificity ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีโดย Western-blot analysis

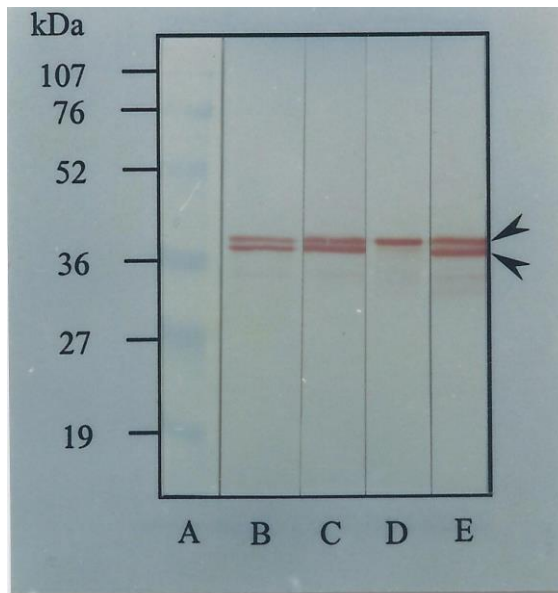
นำ whole cells homogenates ของ *Leptospira* spp. ไปแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้ว ย้าย separated components จากเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (NC) ด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer ทำการ block ที่ว่างบนแผ่น NC ด้วย blocking buffer (3% bovine serum albumin ใน PBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer เติมโมโนโคลนาลแอนติบอดี จาก clones LE1, LD5 และ LF9 ลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer จากนั้น เติม goat-anti-mouse immunoglobulin-alkaline phosphatase conjugate ที่ dilution 1:3,000 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่น NC ด้วย washing buffer เติม substrate (BCIP/NBT) เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาโดยล้าง แผ่น NC ด้วยน้ำกลั่น ตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น **รูปที่ 2 รูปที่ 3 และ รูปที่ 4** แสดงผลการตรวจสอบ ความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดีจาก clones LE1, LD5 และ LF9 ตามลำดับ ด้วยวิธี Western-blot analysis จะเห็นได้ว่าโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำปฏิกิริยากับ component ใน pathogenic *Leptospira* homogenate ที่มีขนาด 30-32 kDa



รูปที่ 2: แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดี **LE1** ต่อ homogenates ของ pathogenic และ non-pathogenic *Leptospira* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ด้วยวิธี Western-blot analysis. Lane 1, Standard protein marker; lane 2, *L. Autumnalis*; Lane 3, Non-pathogenic *Leptospira* spp. P136; lane 4, *E. coli*; lane 5, *Klebsiella pneumoniae*; lane 6, *Proteus vulgaris*; lane 7, *Pseudomonas aeruginosa*; lane 8, *Salmonella* group B; lane 9, *Shigella flexineri*; and lane 10, *Staphylococcus aureus*.



รูปที่ 3: แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนาลแอนติบอดี LD5 ต่อ homogenates ของ pathogenic และ non-pathogenic *Leptospira* และแบคทีเรียอื่นๆด้วยวิธี Western-blot analysis. Lane 1, Standard protein Marker; lane 2, *L. Autumnalis*; Lane 3, Non-pathogenic *Leptospira* spp. P136; lane 4, *E. coli*; lane 5, *Klebsiella pneumoniae*; lane 6, *Proteus vulgaris*; lane 7, *Pseudomonas aeruginosa*; lane 8, *Salmonella* group B; lane 9, *Shigella flexineri*; and lane 10, *Staphylococcus aureus*.



รูปที่ 4: แสดงผลการตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนัลแอนติบอดี **LF9** ต่อ homogenates ของ pathogenic *Leptospira* spp. และ non-pathogenic *Leptospira* spp. ด้วยวิธี Western-blot analysis. Lane A, Protein Marker; Lane B, pathogenic *L. Icterohaemorrhagiae*; Lane C, pathogenic *L. Andamana*; Lane D, non-pathogenic *L. Patoc*; and Lane E, pathogenic *L. Djasiman*

การผลิตโพลีโคลนาลแอนติบอดีต่อ whole cell homogenate ของ *Leptospira* spp.

คณะผู้วิจัยได้นำ whole cell homogenate ของ *Leptospira* spp. serovar Autumnalis ไปผสมกับ alum (adjuvant) ในอัตราส่วน 3:1 จากนั้นนำแอนติเจนที่เตรียมได้มาฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อของกระต่ายสายพันธุ์ชาวนิวซีแลนด์ ทำการฉีดซ้ำอีกสองครั้ง ห่างกันครั้งละสองสัปดาห์ หลังจากนั้นทำการเจาะเลือดกระต่าย นำเลือดที่ได้มาปั่นแยกซีรัม และแบ่งเก็บซีรัมเป็น aliquots ที่อุณหภูมิ -20°C ทำการตรวจสอบแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า ซีรัมที่เก็บได้มีแอนติบอดีไตเตอร์ $\geq 1:60,000$ ต่อ whole cell homogenate ของ *Leptospira* spp. ทำการตกตะกอนแอนติบอดีออกจากซีรัมโดยเติมสารละลายอิมมูโนโมเนียมซัลเฟตลงในซีรัมที่เตรียมไว้ ให้ได้ความเข้มข้น 40% ของสารละลายอิมมูโนโมเนียมซัลเฟตออก วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

การ purify rabbit polyclonal IgG ด้วย Protein A Sepharose resin

นำตะกอนโปรตีนที่ละลายด้วย PBS มาผ่านคอลัมน์โปรตีนเอ (Protein A Sepharose resin column) ล้าง unbound protein ที่ไม่จับกับโปรตีนเอออกด้วย binding buffer จากนั้นจึงทำการ elute แอนติบอดีออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer ปรับสภาพ pH ให้เป็นกลางด้วย Tris-HCl, pH 8.0 นำ purify rabbit polyclonal IgG (PAb) ที่เตรียมได้ไปทำการ dialyze ในสารละลาย PBS จากนั้นปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีให้เป็น 1 mg/ml

โครงการย่อยที่ 2:

การเตรียมโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ *Leptospira* spp.

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล ได้เลือก hybridomas จำนวน 3 โคลน (Nos. 3, 81 และ 82) ซึ่งได้ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยผ่านการทดสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าจับกับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค แต่ไม่จับกับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ไม่ก่อโรคและเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ทั้งชนิดเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*

รศ. กนิษฐา ภัทรกุลและคณะ นำ culture supernatants ของ hybridomas จากแต่ละโคลนมาสกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยอาศัย protein G affinity chromatography เพื่อนำไปคัดเลือกในขั้นตอนต่อไป

กิจกรรมที่ 2: การประเมิน reagents โดยวิธีการ spike เชื้อ *Leptospira* และ การใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วย เพื่อคัดเลือกคู่ของแอนติบอดีที่เหมาะสมเฉพาะ Leptospirosis (สำหรับ Dengue NS1 จะได้แอนติเจนและ monoclonal antibody pool มาจากโครงการ HBM167 โดย ดร. ธัญญา พุทธิจันทร์)

2.1 การคัดเลือกคู่ของโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็น ICT kit (งานในส่วนนี้ทำโดย ห้องปฏิบัติการที่สาม โดย รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น)

รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ได้ทำการทดสอบเพื่อประเมินว่าโมโนโคลนาลแอนติบอดีใดจากทั้งสองห้องปฏิบัติการ สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ได้ดีกว่า หรือมีความไวมากกว่า ในการทำการทดสอบด้วยวิธี dot ELISA โดยทำการ dot แอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* spp. serovars Manilai และ Autumnalis ทั้งที่เตรียมด้วยวิธี heat killed (HK), formalin killed (FK) หรือ sonicated cells ที่ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อนี้โดยใช้ monoclonal antibodies (MAb) ต่างๆ จากกิจกรรมที่ 1 ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ได้ถูกประเมินมาแล้วด้วยนักวิจัยผู้ผลิต MAb เพื่อดูว่า MAb ไດสามารถตรวจได้ไวที่สุด โดยการเติม biotinylated-rabbit anti mouse Igs และ alkaline phosphatase-streptavidin conjugate เพื่อให้เกิดจุดสี และทำการอ่านผลโดยใช้เกณฑ์ เป็น + ถึง ++++ ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปตามตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 1-3 แสดงผลจากการใช้ MAb จากห้องปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ภาควิชาปรสิตวิทยา และศูนย์วิจัยเป็นเลิศด้านโปรตีนรักษาและพันธุวิศวกรรมแอนติบอดี คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งผลิตโดย ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภาและคณะ

ตารางที่ 1: MAbLD5 (conc. 0.2 µg in PBS 100 µl)

Conc. (ng)	Manilai (HK)		Autumnalis L752 (HK)		Autumnalis UT180 (HK)	
500	++	++	++	++	++	++
100	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 2: MAbLE1 (conc. 0.2 µg in PBS 100 µl)

Conc. (ng)	Manilai (HK)		Autumnalis L752 (HK)	
500	+++	+++	+++	+++
100	++	++	++	++
20	+	+	+	+
4	+	+	+	+

ตารางที่ 3: MAbLF9 (conc. 0.2 µg in PBS 100 µl)

Conc. (ng)	Manilai (FK)		Autumnalis L752 (SO)	
500	+	+	+	+
100	+	+	+	+
20	-	-	-	-
4	-	-	-	-

ตารางที่ 4-6 ใช้ MAb ที่ผลิตโดย รศ. แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุลและคณะ

ตารางที่ 4: MAb: No. 3 (1:5,000)

Conc. (ng)	Manilai (HK)		Autumnalis L752 (HK)		Autumnalis UT180 (HK)	
500	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 5: MAb: No. 81 (1:1,000)

Conc. (ng)	Manilai (FK)		Autumnalis L752 (SO)	
500	+	+	+	+
100	+	+	+	+
20	-	-	-	-
4	-	-	-	-

ตารางที่ 6: MAb: No. 82 (1:5,000)

Conc. (ng)	Manilai (FK)		Autumnalis L752 (SO)	
500	+++	+++	++++	++++
100	++	++	+++	+++
20	+	+	++	++
4	+	+	+	+

ผลจากการประเมินโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดย รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และจากการประชุมเพื่อเสนอความก้าวหน้าของผลการทดลองโดย รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ที่ประชุมมีความเห็นให้คัดเลือกแอนติบอดี โคลน LE1 จาก ศ. วันเพ็ญ และ โคลน no. 82 จาก รศ. กนิษฐา ที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดใกล้เคียงกันเพื่อนำไปทำการศึกษาต่อไป

เนื่องจากมติจากที่ประชุมได้มีความเห็นให้ทดสอบความไว MAb LE1, LD5 และ No. 82 ที่ labeled ด้วย biotin แล้วใช้ detect *Leptospira* antigen โดยตรง ด้วยวิธี Dot- ELISA โดยเจือจาง antigen ที่ความเข้มข้น 500, 100, 20, และ 4 ng โดยให้ รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน เป็นผู้ทำการทดสอบ ซึ่งได้ผลดังแสดงใน ตารางที่ 7-9

สรุปได้ว่า MAb LE1, LD5 และ no. 82 มีความไวต่อ *Leptospira* Serovar Manilae มากกว่า Serovar Autumnalis strain L847 และ Grippotyphosa strain 8368 โดย MAb LE1 และ LD5 ให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกันดังผลแสดงในตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7: MAbLE1 (Conc. 50 µg/ml)

Concentration (ng)	Heat killed- <i>L.</i> Manilae	Formalin killed- <i>L.</i> Manilae	Heat killed- <i>L.</i> Autumnalis L847	Heat killed- <i>L.</i> Grippotyphosa 8368
<u>500</u>	++++	+++++	++	++
<u>100</u>	+++	++++	++	++
<u>20</u>	++	+++	++	++
<u>4</u>	++	++	±	±

ตารางที่ 8: MAbLD5 (Conc. 50 µg/ml)

Concentration (ng)	Heat killed- <i>L.</i> Manilae	Formalin killed- <i>L.</i> Manilae	Heat kill- <i>L.</i> Autumnalis L847	Heat kill- <i>L.</i> Grippotyphosa 8368
<u>500</u>	++++	+++++	++	++
<u>100</u>	+++	++++	++	++
<u>20</u>	++	+++	++	++
<u>4</u>	++	++	±	±

ส่วน MAb no. 82 ไม่สามารถ detect *L. Autumnalis* strain L847 และ *L. Grippotyphosa* strain 8368 ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ PBS ซึ่งเป็น control ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9: MAb No. 82 (Conc. 50 µg/ml)

Concentration (ng)	Heat killed- <i>L. Manilae</i> WT	Formalin killed- <i>L. Manilae</i> WT	Heat kill- <i>L. Autumnalis</i> L847	Heat kill- <i>L. Grippotyphosa</i> 8368
500	+++	+++++	=	=
100	++	+++	=	=
20	++	++	=	=
4	±	=	=	=

กิจกรรมที่ 3: การเก็บตัวอย่างซีรัมของผู้ที่มีไข้ สำหรับประเมิน ICT kit

ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการ HBM142 ซึ่งเป็น frozen Sera ซึ่ง ศ. พญ. ยุพิน ศุภธรรมคงเก็บไว้ ได้รับครั้งแรก 60 ตัวอย่าง โดยไม่ทราบว่ามีมาจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อใด ต่อมาเมื่อทดสอบด้วยชุด ICT test kit ที่พัฒนาขึ้นแล้ว จึงทราบว่า แบ่งเป็น ซีรัมของผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส 14 ตัวอย่าง ไข้เด็งกี 30 ตัวอย่าง และสครับไทฟัส 16 ตัวอย่าง

ครั้งที่สอง 248 ตัวอย่าง

กิจกรรมที่ 4: การพัฒนาและผลิต ICT kit

การเตรียม Gold conjugated IgG

ทำการติดฉลาก IgG ของ MAbLE1 ด้วยอนุภาคทองคำคอลลอยด์ โดยนำ IgG ของ MAbLE1 ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารแขวนลอยอนุภาคทองคำคอลลอยด์ (colloidal gold particles) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากวนด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ลงไปให้มีความเข้มข้น 10% กวนเบาๆ อีก 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG-gold particles ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสทิ้งแล้ว suspend ตะกอน gold particles ด้วย storage buffer, pH 8.2 ให้มีปริมาณ 800-1000 ไมโครลิตร เติม sucrose และ trehalose ในอัตรา 1 และ 0.5% ตามลำดับ เขย่าเบาๆ ให้เป็น homogeneous suspension

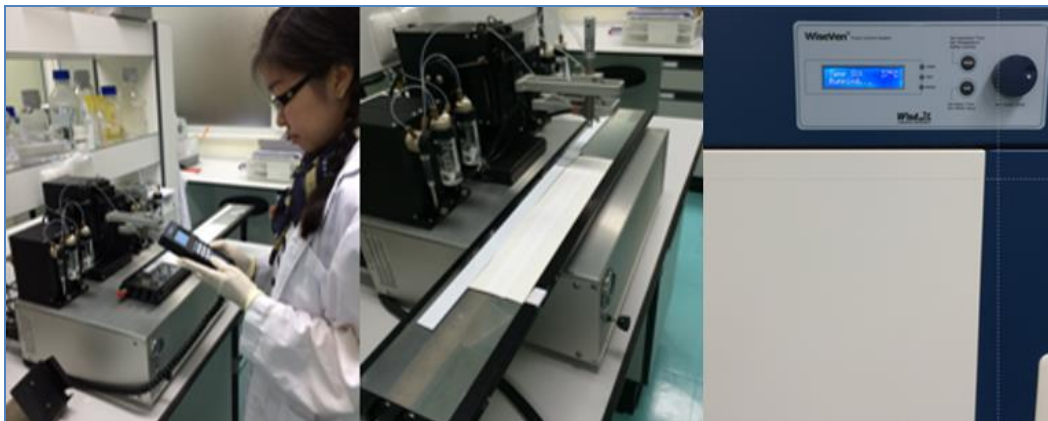
การทำเส้น test และ control lines ลงบนชั้นเมมเบรน

นำแผ่นเมมเบรน (FF60/100, pore size 8 ไมโครเมตร) ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 30 เซนติเมตร ทำการ spray anti-mouse immunoglobulin GAM (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ control line และ MAbLD5 (1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ test line โดยมีระยะห่างระหว่างทั้งสอง lines เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร นำเมมเบรนไปอบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ในบัฟเฟอร์ให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที และนำไปอบให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

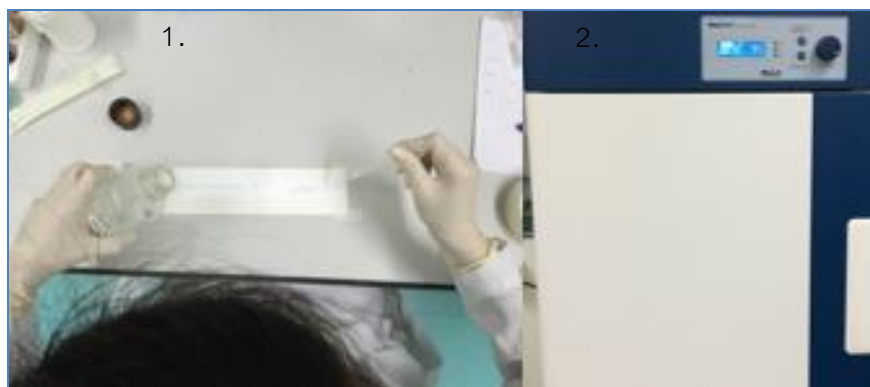
1.

2.

3.



รูปที่ 5: การทำเส้น test และ control lines โดยใช้เครื่องสเปรย์ (Bio-dot) (1 และ 2) และนำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส (3) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



รูปที่ 6: แช่เมมเบรนในบัฟเฟอร์ให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที (1) และนำไปอบให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส (2) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

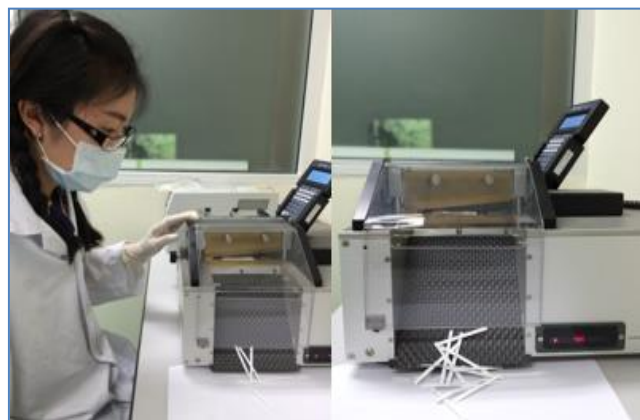
การประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit

นำแผ่น Backing card ที่เคลือบกาไวท์หนึ่งด้าน ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ เมมเบรนออกแล้ววางแผ่นเมมเบรนแนบลงไปให้เรียบ ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Conjugate pad ออก และวางแผ่น conjugate pad ให้เกยเมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ และ ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ sample pad ออก และวางแผ่น sample pad ให้เกยทับ conjugate pad ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Wick ออก และวางแผ่น wick ให้เกยเมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ จากนั้นตัดด้วยเครื่อง ตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 4 มิลลิเมตร เก็บ ICT strips ไว้ในถุง Aluminium foil ที่มีช่องดูความชื้น และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง (ห้องที่กำจัดความชื้น)



รูปที่ 7: การประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit

1. เตรียม Wick, conjugate pad, และ sample pad ประกอบชุดตรวจสอบ
2. วางแผ่น Conjugate pad ให้เกยเมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ
3. วางแผ่น Sample pad ให้เกยทับ conjugate pad ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ
4. วางแผ่น Wick ให้เกยเมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ

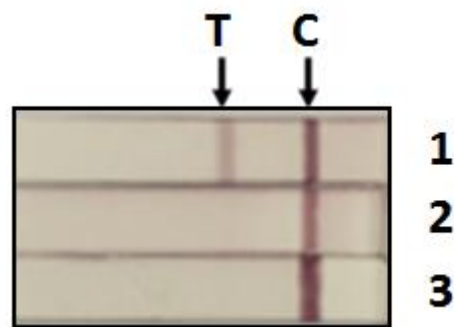


รูปที่ 8: การตัดชุดประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit ด้วยเครื่องตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 4 มิลลิเมตร

กิจกรรมที่ 5: To perform an in-house validation of the ICT kit

ทำการทดสอบความจำเพาะของ ICT test kit ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ *Leptospira* spp. คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความจำเพาะของ ICT test kit ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. และ non-pathogenic *Leptospira* spp. ดังแสดงใน รูปที่ 9 ซึ่งให้ผลบวกกับ *L. Autumnalis* (pathogenic *Leptospira* spp.) และให้ผลลบกับ *L. biflexa* (non-pathogenic *Leptospira* spp.) และ buffer (PBS-T)

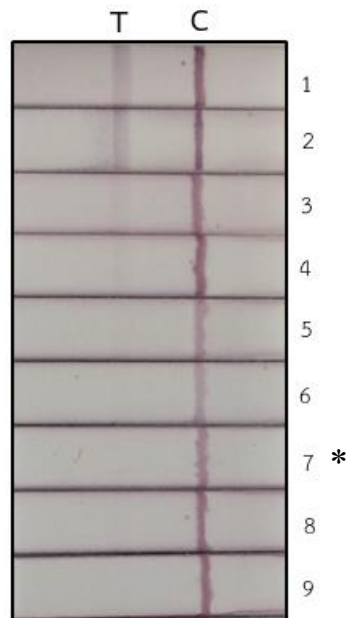
จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทดสอบหาความไวของการทดสอบซึ่งพบว่า ICT test kit ที่ผลิตขึ้นสามารถตรวจเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp.: *L. Autumnalis* และ *L. Canicola* ได้น้อยที่สุดที่ ปริมาณของแอนติเจนที่นำมาทดสอบ 0.375 ไมโครกรัม ดังแสดงใน รูปที่ 10



รูปที่ 9: แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ ICT test kit ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. และ non-pathogenic *Leptospira* spp.

หมายเลข 1-3 แสดงแอนติเจนที่นำมาทดสอบ: Lane 1, *L. Autumnalis*; Lane 2, *L. biflexa* และ Lane 3, PBS-T

T, test line; C, control line



รูปที่ 10: แสดงผลการทดสอบหาความไวของ immunochromatographic test kit เมื่อทำการทดสอบด้วย homogenate ของ pathogenic *Leptospira* spp.: *L. Autumnalis*

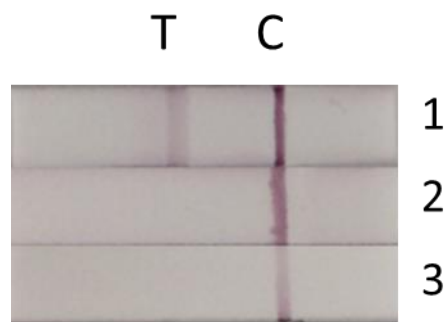
หมายเลข 1-9 แสดงความเข้มข้นของแอนติเจนที่นำมาทดสอบ:

Lanes (จากบนไปล่าง) 1, 12 $\mu\text{g}/\text{strip}$; 2, 6 $\mu\text{g}/\text{strip}$; 3, 3 $\mu\text{g}/\text{strip}$; 4, 1.5 $\mu\text{g}/\text{strip}$; 5, 0.75 $\mu\text{g}/\text{strip}$; 6, 0.375 $\mu\text{g}/\text{strip}$; และ 7, 8 และ 9; 0 $\mu\text{g}/\text{strip}$ ตามลำดับ

* ในเมมเบรนแผ่นจริงสามารถมองเห็น line ที่ T ได้

การทดสอบความจำเพาะของ ICT test kit ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ *Leptospira* spp. ในซีรัม (spike sample)

คณะผู้วิจัยได้ทดสอบความจำเพาะของ ICT test kit ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. ในตัวอย่างซีรัม โดยการใส่เชื้อ *L. Autumnalis* (pathogenic *Leptospira* spp.) ลงในซีรัมปกติ (normal serum) โดยนำตัวอย่างซีรัมเจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ในสัดส่วน 1:10 จากนั้นทดสอบหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในตัวอย่าง



รูปที่ 11: แสดงผลการทดสอบหาความจำเพาะของ ICT strip ที่ผลิตขึ้นในการตรวจเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. ในซีรัม ด้วยวิธี immunochromatographic test ซึ่งจะให้ผลบวกกับ *L. Autumnalis* (strip 1) และให้ผลลบกับ *L. biflexa* (non-pathogenic *Leptospira* spp.) และ normal serum sample (strips 2 และ 3 ตามลำดับ)

กิจกรรมที่ 6: To validate the ICT test kit using clinical samples and to determine diagnostic sensitivity, specificity, accuracy and positive and negative predictive values of the ICT kits in diagnosis of leptospirosis and Dengue fever

6.1 คณะผู้วิจัยทำการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุภธรรมงคล ครั้งที่ 1 จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยภายหลังทราบว่าเป็นซีรัมของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *Leptospira* spp. จำนวน 14 ราย ติดเชื้อ Scrub Typhus จำนวน 16 ราย และติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก จำนวน 30 ราย

จากการทดสอบด้วยชุดตรวจ *Leptospira* antigen ICT test kit ที่ผลิตขึ้นพบว่าให้ผลบวกกับซีรัมจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *Leptospira* spp. ทั้งหมด 14 ราย ให้ผลลบกับซีรัมจากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก 27 จาก 30 ราย เกิดผลบวกปลอมในซีรัมของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสไข้เลือดออก จำนวน 3 จาก 30 ราย และเกิดผลบวกปลอมในซีรัมของผู้ป่วยติดเชื้อ Scrub Typhus จำนวน 11 จาก 16 ราย (ตารางที่ 10)

อย่างไรก็ดี คณะผู้วิจัยได้ส่ง Reactive proteins ที่ test line ของ serum samples ที่ original diagnosis เป็น scrub typhus 3 ราย (3 strips) แต่ให้ผลบวกกับ leptospirosis ICT test kit ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วย mass spectrometry ผลปรากฏว่าพบ *Leptospira* peptides (ภาคผนวก) แต่ไม่พบ peptides ของ Rickettsiae ดังนั้น serum samples เหล่านี้จึงไม่น่ามาจากผู้ป่วยที่เป็น scrub typhus แต่ผู้ป่วยน่าจะติดเชื้อ *Leptospira* มากกว่า

ตารางที่ 10: ผลการทดสอบตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยจำนวน 60 รายที่ได้รับจาก ศ. พญ. ยุพิน ศุพุทรมงคล ในคราวแรกและการวินิจฉัย

No.	Code	Lepto ICT test kit	Diagnostic	Leptospira IFA	
				IgM	IgG
1	844000524	+	Leptospirosis	1:50	>1:50
2	44-1470	+	Leptospirosis	>1:50	>1:50
3	44-2452	+	Leptospirosis	-	-
4	45-1495	+	Leptospirosis	1:400	1:200
5	46-1802	+	Leptospirosis	1:800	>1:50
6	47-1067	+	Leptospirosis	1:3200	1:1600
7	6334	+	Leptospirosis	1:800	1:400
8	5274	+	Leptospirosis	1:400	1:800
9	5228	+	Leptospirosis	$\geq 1:6400$	$\geq 1:6400$
10	5026	+	Leptospirosis	1:400	1:50
11	4305	+	Leptospirosis	1:100	1:3200
12	44 - 1263	+	Leptospirosis	1:400	>1:50
13	44 - 2480	+	Leptospirosis	>1:50	>1:50
14	45 - 2078	+	Leptospirosis	-	-
No.	Code	Lepto ICT	Diagnostic	Scrub typhus IFA	
				IgM	IgG
15	844000084	-	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	1:800
16	844000356	+	Scrub typhus	1:3200	$\geq 1:6400$
17	844000455	+	Scrub typhus	1:200	1:800
18	844000666	+	Scrub typhus	1:3200	1:3200
19	844000044	-	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	1:200
20	844000032	-	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	$\geq 1:6400$
21	744001121	-	Scrub typhus	>1:50	1:400
22	744001128	+	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	$\geq 1:6400$
23	963	+	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	$\geq 1:6400$
24	979	+	Scrub typhus	1:1600	1:3200
25	988	+	Scrub typhus	1:50	1:1600
26	1003	+	Scrub typhus	1:100	1:1600
27	1045	-	Scrub typhus	1:3200	1:1600
28	744001302	+	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	$\geq 1:6400$
29	744001335	+	Scrub typhus	$\geq 1:6400$	1:800
30	744001365	+	Scrub typhus	1:50	$\geq 1:6400$

ตารางที่ 10: (ต่อ)

No.	Code	Lepto ICT	Diagnostic	Dengue test		
				IgM	IgG	NS1
31	4-0027-4	-	Dengue fever	-	-	+
32	4-0087-1	+	Dengue fever	-	-	+
33	4-0381-7	-	Dengue fever	-	-	+
34	4-0416-6	-	Dengue fever	-	-	+
35	4-0527-9	-	Dengue fever	-	-	+
36	4-0006-1	-	Dengue fever	+	-	+
37	4-0034-2	-	Dengue fever	+	-	+
38	4-0130-8	-	Dengue fever	+	-	+
39	4-0154-5	-	Dengue fever	+	-	+
40	4-0177-1	-	Dengue fever	+	-	+
41	4-0286-2	-	Dengue fever	+	-	+
42	4-0391-8	-	Dengue fever	+	-	+
43	4-0511-2	+	Dengue fever	+	-	+
44	4-0906-1	-	Dengue fever	+	-	+
45	4-0948-7	-	Dengue fever	+	-	+
46	4-1147-8	-	Dengue fever	+	-	+
47	4-1300-8	-	Dengue fever	+	-	+
48	4-0179-3	-	Dengue fever	+	-	+
49	4-1178-3	-	Dengue fever	+	-	+
50	4-0051-1	-	Dengue fever	+	+	+
51	4-0631-5	-	Dengue fever	+	+	+
52	4-0757-5	-	Dengue fever	+	+	+
53	4-0987-1	+	Dengue fever	+	+	+
54	4-0015-1	-	Dengue fever	-	-	+
55	4-0163-5	-	Dengue fever	-	-	+
56	4-0446-9	-	Dengue fever	-	-	+
57	4-0734-9	-	Dengue fever	-	-	+
58	4-0855-4	-	Dengue fever	-	-	+
59	4-0216-4	-	Dengue fever	-	-	+
60	4-0546-1	-	Dengue fever	-	-	+

6.2 คณะผู้วิจัยทำการตรวจตัวอย่างซีรัมที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล ครั้งที่ 2 จำนวน 248 ตัวอย่างแบบ blind และได้ส่งผลการตรวจด้วย ICT test kit กลับไปให้ ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล เพื่อเปรียบเทียบกับ original diagnosis แล้ว แต่ยังไม่ได้รับผลเปรียบเทียบกลับมา จึงยังไม่สามารถคำนวณ sensitivity, specificity, accuracy, และ predictive values ของ ICT test kit ได้

จากนั้นคณะผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ความไว (Sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ความถูกต้อง (accuracy) ความเบี่ยงเบนทางบวก (positive deviation) และความเบี่ยงเบนทางลบ (negative deviation) ของชุดตรวจแบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีที่พัฒนาขึ้น โดยคำนวณดังนี้

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบผลของชุดทดสอบ ICT test kit และผลการวินิจฉัยเดิมจาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล สำหรับตัวอย่างซีรัม 60 ตัวอย่างแรก

ICT Kit	Positive result from Prof. Yupin's lab (R+)	Negative result from Prof. Yupin's lab (R-)
ICT Positive (A+)	14 +/+ positive agreement (PA)	14 -/+ positive deviation (PD) (R-/A+)
ICT Negative (A-)	0 +/- negative deviation (ND) (A-/R+)	32 -/- negative agreement (NA)

$$\text{Relative accuracy: AC} = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

$$\text{Relative specificity: SP} = \frac{NA}{N-} \times 100\%$$

$$\text{Relative sensitivity: SE} = \frac{PA}{N+} \times 100\%$$

โดย N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (PA + ND + PD + NA)

N- คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมดของวิธีอ้างอิง (NA + PD)

N+ คือ จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดของวิธีอ้างอิง (PA + ND)

พบว่าชุดตรวจ *Leptospira* antigen ICT test kit ที่พัฒนาขึ้นมีความไว (Sensitivity) 100% ความจำเพาะ (specificity) 70% และความถูกต้อง (accuracy) 77% เมื่อเทียบกับผลตรวจจากห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล

การวิเคราะห์ความเบี่ยงเบนทางบวก (Positive deviation) และความเบี่ยงเบนทางลบ (Negative deviation) ของชุดตรวจแบบอิมมูโนโครมาโตกราฟีที่พัฒนาขึ้น

$$\text{อัตราผลบวกปลอม (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้งหมด}}$$

$$\text{อัตราผลลบปลอม (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบปลอม} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด}}$$

พบว่าชุดตรวจเชื้อ *Leptospira* antigen ICT test kit ที่พัฒนาขึ้นมีอัตราผลบวกปลอม (False positive) เป็น 30% และผลลบปลอม (False negative) เป็น 0% เมื่อเทียบกับผลตรวจจาก ศ. แพทย์หญิง ยุพิน ศุพุทธมงคล

การพัฒนา ICT test kit เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสเด็งกี

คณะผู้วิจัยได้รับโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ NS1 ของ Dengue virus และ NS1 protein ทั้ง 4 serotypes จาก ดร. ชัญญา พุทธิชัน หน่วยวิจัยไข้เลือดออก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

การเตรียม Gold conjugated IgG

ทำการติดฉลาก IgG ของ MAbs SI4 (ประกอบด้วย MAb 4 ชนิดที่จำเพาะกับ NS1 ทั้ง 4 serotypes; MAb 2 clones เป็น IgG1 และอีก 2 clones เป็น IgG2b) ด้วยอนุภาคทอง โดยนำ IgG ของ MAbs SI4 ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม ผสมกับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมากวนด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10% กวนเบาๆ อีก 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน IgG ที่ติดสลาด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled IgG) ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตู้น้ำใส่ทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย gold storage buffer, pH 8.2 ให้มีปริมาณ 800-1000 ไมโครลิตร เติม sucrose และ trehalose ในอัตรา 1 และ 0.5% เขย่าเบาๆ ให้ละลายจนหมด

การทำเส้น Test และ Control lines

นำแผ่น Membrane (วัสดุเป็น FF60/100) ขนาดกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 30 เซนติเมตร ทำการ spray โดยระยะห่างระหว่าง Control line (anti-mouse immunoglobulin GAM 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Test line [MAb SI1 (IgM) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร] เป็น 0.5 เซนติเมตร นำไปอบให้แห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที และนำไปอบให้แห้งที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การประกอบชุดตรวจสอบ ICT kit

นำแผ่น Backing card ที่เคลือบกาวไว้ 1 ด้าน ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Membrane ออกแล้ววางแผ่น membrane แนบลงไปให้เรียบ ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Conjugate pad ออก และวางแผ่น conjugate pad เกย membrane 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ และลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ sample pad ออก และวางแผ่น sample pad เกยทับ conjugate pad 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ ลอกกระดาษปิดกาวตรงตำแหน่งของ Wick ออก และวางแผ่น wick เกย membrane 1-2 มิลลิเมตร แนบลงไปให้เรียบ จากนั้นตัดด้วยเครื่องตัดกระดาษให้มีความกว้างเป็น 4 มิลลิเมตร เก็บ ICT strip ไว้ในถุง Aluminium foil ที่มีซองดูดความชื้น และเก็บที่อุณหภูมิห้องที่แห้ง (ห้องที่กำจัดความชื้น)

ขณะนี้คณะผู้วิจัยอยู่ระหว่างการรอรับตัวอย่างโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ NS1 ของ Dengue virus และ NS1 protein ของทั้ง 4 serotypes จาก ดร. ชัญญา พุทธิชัน หน่วยวิจัยไข้เลือดออกเพิ่มเติม เพื่อใช้ในการทดสอบ condition ในการตรวจหา NS1 protein ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย

ที่ติดเชื้อ Dengue virus ซึ่งคาดว่าจะได้รับโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ NS1 ของ Dengue virus และ NS1 protein ภายในเดือนตุลาคม และจะนำมาหา optimal condition ของชุดตรวจและพัฒนาต่อไป

ข้อวิจารณ์ สรุปและข้อเสนอแนะ (Discussion, Conclusion and Recommendation)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ mouse monoclonal antibodies คือ MAbLD5 และ MAbLE1 ที่จำเพาะต่อ pathogenic *Leptospira* spp. ที่ได้รับการประเมินโดยบุคคลที่สามแล้วว่ามีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้พัฒนาเป็นชุดตรวจแบบ ICT เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ pathogenic *Leptospira* ในตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีไข้และสงสัยว่าจะติดเชื้อ *Leptospira* ซึ่งในการวิจัยนี้ได้รับการกำหนดว่าตัวอย่างจากผู้ป่วยต้องเป็นซีรัม ความจริงแล้วทางคณะผู้วิจัยเคยพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรค leptospirosis โดยใช้ MAb ทั้งสอง clones เป็นตัวตรวจจับแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะของผู้ป่วยและเคยใช้วินิจฉัยผู้ป่วยได้อย่างแม่นยำมาก่อน (Saengjaruk *et al.*, 2002) เช่นที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยขอนแก่น และ Nursing Home กรุงเทพฯ ด้วยวิธี dot-blot ELISA โดยใช้เครื่อง slot blot machine หยด ปัสสาวะ ปริมาตร 300 μ l ลงบน nitrocellulose membrane หลังจาก block membrane ด้วย unrelated proteins แล้ว ทำการ probe หาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ด้วย MAbLD5 หรือ MAbLE1 แล้ว develop สี ด้วย anti-mouse immunoglobulin-peroxidase conjugate และ chromogenic substrate ซึ่งวิธีดังกล่าวใช้เวลาประมาณสองชั่วโมงก็จะทราบผล อย่างไรก็ตาม dot-blot ELISA ยังคงต้องทำในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงมีความต้องการการวินิจฉัยที่รวดเร็วยิ่งขึ้นเพื่อใช้เป็น therapeutic guideline ทางคลินิก อันเป็นที่มาของการพัฒนาชุดตรวจแบบ immunochromatography หรือ ICT ของงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ ยังมีความต้องการการวินิจฉัยแยกโรคของผู้ป่วยที่มีอาการไข้สามโรคที่มีกลุ่มอาการทางคลินิกคล้ายกันออกจากกันคือ leptospirosis, Dengue virus infection และ scrub typhus แต่เนื่องจากแอนติบอดีต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของ scrub typhus ยังไม่มี จึงได้มีการตกลงกันว่าจะพัฒนาชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* และ Dengue virus ก่อน โดยใช้ reagents ที่มีอยู่แล้วในห้องแล็บต่างๆในประเทศไทยและใช้ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยที่มีไข้ซึ่งจะได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ยุพิน ศุภุทธมงคล จากภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ชุดตรวจแบบ ICT เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ที่พัฒนาขึ้นมี sensitivity 100% และผลลบปลอม (False negative) เป็น 0% ในการตรวจหาแอนติเจนในซีรัมของผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ *Leptospira* จากการทดสอบแบบ blind อย่างไรก็ตามซีรัมของผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อ Dengue virus 3 ใน 30 ราย และซีรัมของผู้ป่วยที่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น scrub typhus 11 จาก 16 ราย ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วย ICT test kit ที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ดังนั้น ICT test kit จึงถูกคำนวณว่ามี specificity 70%, accuracy 77% และผลบวกปลอม 30% สำหรับซีรัมที่ได้รับมา 60 รายในครั้งแรก อย่างไรก็ตามเนื่องจากซีรัมชุดเดียวกันบางตัวอย่าง ก็ให้ผลไม่ตรงกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อก่อโรค scrub typhus และไข้เด็งกี โดย รศ. ดร. อุไรวรรณ โสรัตนานนท์ ที่ได้รับทุนวิจัยให้ตรวจหาแอนติบอดีของเชื้อ *Leptospira*, Rickettsiae และ Dengue virus ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยัน

คณะผู้วิจัยจึงได้นำโปรตีนที่ Test lines ของ strips จำนวน 3 strips (มีเหลือเพียง 3 strips เพราะได้ส่งคืนซีรัมที่เหลือของชุดแรกให้ ศ. ยุพินไปหมด) ที่ให้ผลบวกด้วย *Leptospira* ICT test kit แต่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นซีรัมของผู้ป่วย scrub typhus ไปวิเคราะห์หาโปรตีนด้วย mass spectrometry (ทำการทดสอบโดย ผศ. ดร. อรภัค เรียมทอง คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ซึ่งมีความเชี่ยวชาญเรื่อง proteomics และ mass spectrometry โดยเฉพาะ) ปรากฏว่าไม่พบโปรตีนของเชื้อ *Orientia tsutsugamushi* ที่เป็นสาเหตุของ scrub typhus แต่พบ proteins หลายชนิดของ *Leptospira* จึงทำให้เชื่อว่าผู้ป่วยน่าจะติดเชื้อ *Leptospira* มากกว่า และผลบวกปลอมก็น่าจะแปลว่าเป็นผลบวกจริงมากกว่า อนึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบซีรัมของชุดที่สองที่อาจให้ผลไม่ตรงกันด้วยวิธีทั้ง mass spectrometry และ quantitative real-time PCR เพื่อยืนยันการวินิจฉัย ต่อไป เมื่อได้รับผลเปรียบเทียบกับกลับมาจากแล็บของ ศ. ยุพิน แล้ว

คณะผู้วิจัยจะดำเนินการพัฒนาชุดตรวจ Dengue virus infection แบบ ICT test kit ให้สำเร็จเมื่อได้รับ monoclonal antibodies และ antigens ที่พอเพียงจาก ดร. ชัญญา พุทธิขันธ

เอกสารอ้างอิง (References)

- Adler B, Murphey AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 1980; 11: 452-7.
- Arimitsu Y, Kmet E, Anayina Y., *et al.* Evaluation of one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis. Bull W.H.O. 1994; 72: 395-9.
- Aronoff DM, Watt G. Prevalence of relative bradycardia in *Orientia tsutsugamushi* infection. Am J Trop Med Hyg 2003; 68(4): 477-9.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol 2009; 9: 760-8.
- Chaicumpa W, Thin-inta W, Khusmith S, *et al.* Detection with monoclonal antibody of *Salmonella* Typhi antigen 9 in specimens from patients. J Clin Microbiol 1988; 26: 1824-30.
- Chaicumpa W, Ruangunaporn Y, Burr D, *et al.* Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella* Typhi in urine. J Clin Microbiol 1992; 30: 2513-5.
- Cinco M. New insight into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. New Microbiologica 2010; 33: 283-92.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas 1960; 20: 37-46.
- Cox CD, Alexander AD, Murphy LC. Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. J Infect Dis 195; 101: 201-18.
- Daniel WN. Biostatistics: a foundation for analysis in the health science. 6th edition. John Wiley & Sons Inc. Singapore 1995; pp 147-200.
- de Silva MV, Nakamura PM, Carmargo ED, *et al.* Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 650-5.
- Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. Emer Infect Dis 1997; 3: 78-80.
- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, *et al.* Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. Clin Infect Dis 1997; 25: 720-4.
- Faine S. Guidelines for the Control of Leptospirosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1982

- Farr RW. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 1-8.
- Galen RS. The predictive values and efficiency of laboratory testing. Pediatr Clin N Am 1980; 27: 861-9.
- Galton MM, Powers DK, Hall AM, Cornell RG. A rapid microscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. Am J Vet Res 1958; 19: 505-12.
- Gussenhoven GC, van de Hoorn MAWG, Goris MGA, et al. LEPTO Dipstick: a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J Clin Microbiol 1997; 35: 92-7.
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. Am J Trop Med Hyg 1990; 42: 179-84.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. J Bacteriol 1967; 94: 27-31.
- Kalayanaroj S, Vaughn DW, Mimmarnnitya S. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. J Infect Dis 1997; 176: 313-21.
- Kothari VM, Karnad DR, Bichile LS. Tropical infections in ICU. JAPI 2006; 54: 291-8.
- Levett PN. International Committee on systematic of prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of Leptospiraceae. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58: 1049-50.
- Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 11-4.
- Maneewatch S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, et al. Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous *Leptospira* spp. challenge. Hybridoma 2008; 27: 453-65. doi:10.1089/hyb.2008.0056.
- Maneewatch S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, et al. Humanized-monoclonal antibody against heterologous *Leptospira* infection. PEDS 2009; 22: 305-12.
- Maneewatch S, Adisakwattana P, Chaisri U, Saengjaruk P, Srimanote P, Thanongsaksrikul J, Sakolvaree Y, Pongpan P, Chaicumpa W. Therapeutic epitopes of *Leptospira* LipL32 protein. PEDS 2014; 27: 135-144.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, et al. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin. Microbiol 1992; 30: 2219-24.
- Milner AR, Jackson KB, Woodruff K, Smart IJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. J Clin Microbiol 1985; 22: 539-42.

- Patey O, Ollivaud L, Breuil J. Usual neurological manifestations occurring during dengue fever infection. *J Trop Med Hyg* 1993; 48: 793-802.
- Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD, *et al.* Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLOS NTD* 2012; 6: e1853
- Rigau-Perez JG. The early use of break bone fever (*Quebranta huesos*, 1771) and dengue (1801) in Spanish, *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 272-4.
- Saengjaruk P, Chaicumpa W, Watt G, *et al.*, Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 480-9.
- Sangkawipa N, Rojanasuphot S, Ahandrick S. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. 1. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 1984; 120: 653-69.
- Shah I, Deshpande GC, Targeja PN. Outbreak of dengue in Mumbai and predictive markers for dengue shock syndrome. *J Trop Med Pediatr* 2004; 50: 301-5.
- Silpajakul K, Varachit P. Pediatric scrub typhus in Thailand: a study of 73 confirmed cases. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 354-9.
- Simmons JS, St John JH, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. *Philippine J Sci* 1931; 44: 1-247.
- Smits HL, Eapen CK, Sugathun S, *et al.* Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8: 166-9.
- Solomon T, Dung NM, Vaughn DW. Neurological manifestations of dengue infection. *Lancet* 2000; 355: 1053-9.
- Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones WLJ, Fris M. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 218-21.
- Suwimonteerabutr J, Chaicumpa W, Saengjaruk P, *et al.* Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp. in bovine urine samples. *Am J Vet Res* 2005; 66: 762-6.
- Thiermann AB. Leptospirosis: current development and trends. *J Am Vet Med assoc* 1984; 184: 722-5.
- Thisyakorn U, Nimmarnnit S. Nutritional status of children with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 295-7

- Torton M, Shenberg E, van de Horden J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect dis* 1966; 166: 537-43.
- Watt G, Jongsakul K, Ruangvirayuth R, *et al.* Short report: Prospective evaluation of a multi-test strip for diagnoses of scrub typhus and murine typhus, leptospirosis, Dengue fever and *Salmonella* Typhi infection. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 10-2.
- WHO/SEARO Report, 2007
- Winslow WE, Merry DJ, Pirc ML. 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.
- Wilder-Smith A, Schwartz E. Dengue in travelers. *NEJM* 2005; 353: 924-32.
- Wongkamchai S, Choochote W, Jitpuckdee A, *et al.* An antigen detection assay for diagnosing filariasis. *Asian Pacific J Allergy Immunol* 2003; 21: 241-51.
- Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W. Human skin Langerhans cells as target of Dengue virus infection. *Nat Med* 2000; 6: 816-20.
- Zivna I, Green S, Vaughn DW. T cell response to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol* 2002; 168: 5959-65.

ภาคผนวก

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วย mass spectrometry

Protein No.	Accession No.	Protein	Score	Protein mass	Peptide sequences
1	gi 476497264	GHKL domain protein [<i>Leptospira terpstrae</i> serovar Hualin str. LT 11-33 = ATCC 700639]	49	103363	IKNDVEIHK
2	gi 514181153	sulfate ABC transporter, ATP-binding protein [<i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge str. BUT 6]	40	40254	ELNLLPGEK
3	gi 514181847	hypothetical protein LEP1GSC058_2147 [<i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge str. BUT 6]	39	31873	VIYKEVTK
4	gi 293385562	putative holliday junction endodeoxyribonuclease protein [<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai str. 56601]	37	18597	LLLNVELLK
5	gi 410792802	hypothetical protein LEP1GSC163_3339 [<i>Leptospira santarosai</i> str. CBC379]	25	8250	IFCLELVLESCLK
6	gi 24197463	methylamine utilization protein [<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai str. 56601]	25	11856	GFTVESLKIK
7	gi 167775648	Methyl-accepting chemotaxis protein [<i>Leptospira biflexa</i> serovar Patoc strain ~Patoc 1 (Ames)~]	25	77439	NQLERNDEIGGMAK
8	gi 463326212	putative lipoprotein [<i>Leptospira alstonii</i> serovar Sichuan str. 79601]	22	45228	NSNSNAVGNMACVLYSL
9	gi 384115590	acyltransferase [<i>Leptospira licerasiae</i> serovar Varillal str. VAR 010]	22	42784	FDSMIAGMLLAEYVDYRPVGESLGK
10	gi 514170332	hypothetical protein LEP1GSC103_0666 [<i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar Javanica str. UI 09931]	20	82131	MAKALGISETQLNK