วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ ๑๕ ฉบับที่ ๒ มีนาคม - เมษายน ๒๕๔๙

Journal of Health Science
Vol. 15 No. 2 March - April 2006

Original Article

นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาวิธี Dot-ELISA สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

ศราวุธ สุทธิรัตน์*
วันเพ็ญ น้อยอุทัย*
วิมลรัตน์ ไตรรัตนภักดี*
วัชระ หมันเหตุ*
ศันสนีย์ ตันติ์จธัม**

**คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ*
***ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*

บทคัดย่อ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธี Dot-ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึงพฤษภาคม ๒๕๔๘ เพื่อนำไปใช้ตรวจคัดกรองผู้ป่วยในภาคสนาม ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีดังกล่าวพบว่า ใช้ปริมาณแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *bratislavar* และ *autumnalis* ที่ระดับความเข้มข้น ๑.๗๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์ด้วย ๕% BSA ใช้ซีรั่มทดสอบที่เจือจาง ๑:๘๐ และความเข้มข้นของ goat anti-human IgG peroxidase conjugate ที่เจือจาง ๑:๑,๕๐๐ โดยทุกขั้นตอนจะล้างด้วย PBS-tween ๓ ครั้ง และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทดสอบในซีรั่ม ๕๘ ตัวอย่าง ที่ตรวจโดยวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน พบว่าวิธี Dot-ELISA มีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และความถูกต้องเป็นร้อยละ ๕๒.๙, ๖๓.๔, ๓๗.๕, ๗๖.๕ และ ๖๐.๓ ตามลำดับ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคซิฟิลิส โรคไข้หวัดนกและโรคสครับไทฟัส การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ยังจะต้องพัฒนาวิธีการและเพิ่มจำนวนตัวอย่างทดสอบให้มากขึ้นเพื่อให้ได้วิธีทดสอบที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ: **เลปโตสไปโรสิส, Dot-ELISA**

บทนำ

เลปโตสไปโรสิส เป็นโรคที่พบมากและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เป็นโรคหนึ่งที่จัดอยู่ในระบบการเฝ้าระวังโรคของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค[๑] จากข้อมูลของสำนักระบาดวิทยา พบว่ามีผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตที่เกิดจากการติดเชื้อดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้นทุกปี จำนวนผู้ป่วยเพิ่มจาก ๑๐๒ รายใน พ.ศ. ๒๕๓๖ เป็น ๖,๘๖๘ รายใน พ.ศ. ๒๕๔๕ และใน พ.ศ.

Scanned by CamScanner

๒๕๔๖ พบว่ามีผู้ป่วยจำนวน ๕,๗๐๗ รายและผู้เสียชีวิต ๕๐ ราย[๒] ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญเพราะโรคเลปโตสไปโรสิสมีอาการหลากหลายและคล้ายกับโรคอื่น ๆ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ เช่น สครับไทฟัส

เนื่องจากลักษณะและการระบาดของโรคส่วนใหญ่จะเกิดในกลุ่มเกษตรกรในท้องถิ่นทุรกันดาร การวินิจฉัยโรคเบื้องต้นจำต้องใช้วิธีการที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถทดสอบได้ง่ายในภาคสนาม รวมถึงความสะดวกในการนำส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงที สำหรับการตรวจคัดกรองในปัจจุบันพบว่านิยมตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อดังกล่าวจากซีรัม ได้แก่หลักการ ELISA ซึ่งมีความไว ความจำเพาะ สามารถใช้วัดระดับสารที่ต้องการตรวจได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดคือ ใช้เวลาในการตรวจค่อนข้างนานเพราะมีลำดับของการทำปฏิกิริยาหลายขั้นตอน น้ำยาที่ใช้ตรวจมีอายุการใช้งานจำกัดและเสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น รวมถึงปัญหาจากการขนย้ายอุปกรณ์ในการอ่านผล และไมโครเพลทที่ใช้จะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาทดสอบ[๓] นอกจากนี้ยังมีหลักการอื่นเช่น หลักการการเกาะกลุ่ม ซึ่งมีความสะดวกสำหรับนำมาใช้ในภาคสนามแต่พบว่ามีความไวไม่สูงมาก[๔] และมีปัญหาในการอ่านผล จึงได้มีการพัฒนาวิธีอื่น ๆ ขึ้นได้แก่วิธี Immunochromatography (IC) และวิธี Dot-ELISA โดยทั้งสองวิธีจะทำปฏิกิริยาบนกระดาษแต่จะแตกต่างกันที่วิธี IC จะมีราคาสูงกว่าวิธี Dot-ELISA[๕] ซึ่งมีหลักการที่เหมือนกับวิธี ELISA แตกต่างกันในส่วนของการใช้ substrate ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันและพื้นผิวยึดเกาะของปฏิกิริยาซึ่งวิธี Dot-ELISA จะใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสแทน ถึงแม้ว่าทั้งสองหลักการจะมีความคล้ายคลึงกัน แต่วิธี Dot-ELISA ก็มีข้อดีที่เหนือกว่าวิธี ELISA คือมีความสะดวกในการตรวจเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผลสูง รวมทั้งสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจในภาคสนามได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี Dot-ELISA โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (MAT)

วิธีการศึกษา

ตัวอย่าง

จำนวนตัวอย่างสำหรับการคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องของวิธีที่พัฒนาขึ้น ประกอบด้วย ตัวอย่างควบคุมผลบวก และตัวอย่างควบคุมผลลบ รวม ๕๘ ตัวอย่าง โดยใช้ซีรั่มส่งตรวจจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ซึ่งเก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส ก่อนจะนำมาใช้สำหรับการทดสอบ โดยทำการศึกษาในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๔๘ กลุ่มตัวอย่างทั้งหมดประกอบด้วย

๑. ตัวอย่างควบคุมผลบวก คือ ซีรั่มผู้ป่วยที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT ที่เป็นวิธีมาตรฐาน จำนวน ๑๗ ตัวอย่าง

๒. ตัวอย่างควบคุมผลลบ ที่ให้ผลลบโดยวิธี MAT ประกอบด้วยซีรั่มผู้ป่วยโรคอื่น คือ ซิฟิลิส สครับไทฟัส และโรคไข้หวัดนก จำนวน ๖ ตัวอย่าง ซีรั่มคนปรกติที่พบว่าไม่มีอาการของโรคอื่นใด ณ เวลานั้น และเป็นผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส แต่ไม่ได้ตรวจการติดเชื้อโรคอื่น ๆ นอกเหนือจากเลปโตสไปโรสิส ซึ่งได้แก่กลุ่มประชากรจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ พิษณุโลก พิจิตร อุตรดิตถ์ สุโขทัย และตาก จำนวน ๓๕ ตัวอย่าง รวมจำนวนตัวอย่างควบคุมผลลบทั้งสิ้น ๔๑ ตัวอย่าง

วิธีการ

๑. การปรับหาสภาวะเหมาะสมของวิธี Dot-ELISA

โดยใช้ตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT เป็นตัวอย่างควบคุมผลบวก และซีรั่มที่ให้ผลลบโดยวิธี MAT เป็นตัวอย่างควบคุมผลลบอย่างละ ๑ ตัวอย่าง ในการ

Scanned by CamScanner

ศึกษาสภาวะเหมาะสม ปรับหาสภาวะเหมาะสมของขั้นตอนและปัจจัยต่าง ๆ ประกอบด้วย ความเข้มข้นของแอนติเจน ระดับความเจือจางของซีรั่ม ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ระยะเวลาในการบ่ม อุณหภูมิในการบ่ม แล้วนำสภาวะเหมาะสมที่ได้มาทดสอบกับตัวอย่างซีรั่มทดสอบจำนวน ๕๘ ตัวอย่าง

๒. Microscopic Agglutination Test (MAT)

เป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการของปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม โดยใช้เชื้อ *leptospira* ที่ซีโรวาร์ ต่างกันจำนวน ๑๒ ซีโรวาร์ มาทำปฏิกิริยากับซีรั่มผู้ป่วย และอ่านผลการเกาะกลุ่มเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สนามมืด (dark field microscope) ซึ่งจะสามารถจำแนกการติดเชื้อของผู้ป่วยได้อย่างจำเพาะถึงระดับซีโรวาร์[๖] และในการทดสอบนี้ใช้ซีรั่มผู้ป่วยและซีรั่มควบคุมที่ผ่านการตรวจยืนยันด้วยวิธี MAT

๓. Dot Enzyme Immunosorbent Assay (Dot-ELISA)

ทดสอบตัวอย่างซีรั่มผู้ป่วย และซีรั่มควบคุมด้วยวิธี Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น จำนวน ๕๘ ตัวอย่าง นำผลการทดสอบของทั้งสองวิธี มาเปรียบเทียบเพื่อคำนวณหาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และความถูกต้องของวิธีทดสอบ โดยให้วิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐาน[๖]

๔. สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

ทดสอบความตรง (validation) ของวิธีการโดยคำนวณจากความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value, PPV) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value, NPV) และความถูกต้องของการทดสอบ (accuracy)

ผลการศึกษา

๑. สภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Dot-ELISA

การศึกษาสภาวะเหมาะสมของวิธี Dot-ELISA จะใช้ตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT ที่ระดับ titer ๑:๑๐๐, ๑:๒๐๐, ๑:๔๐๐, ๑:๘๐๐, ๑:๑,๖๐๐, ๑:๓,๒๐๐, ๑:๖,๔๐๐ และซีรั่มที่ให้ผลลบโดยวิธี MAT นำมาทดสอบโดยอ้างอิงวิธีการของ Tansuphasiri และคณะ[๗] ซึ่งประกอบด้วยความเข้มข้นของแอนติเจน, ความเข้มข้นของสารที่ใช้ป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์, ความเข้มข้นของซีรั่ม, ความเข้มข้นของคอนจูเกต

๑.๑ ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมความเข้มข้นของแอนติเจน

การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira serovar bratislavar* และ *autumnalis* โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อใน neopeptone + ๘% rabbit serum บ่มที่อุณหภูมิห้อง ๗-๑๐ วัน นำเชื้อที่ได้มาปั่นล้าง ๑๐,๐๐๐ รอบต่อนาทีนาน ๒๐ นาที ที่ ๔°ซ แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -๒๐°ซ เป็นเวลา ๘ ชั่วโมง ผ่านคลื่นเสียงที่ ๔๕ kHz เป็นเวลา ๕ นาที โดยทั้งสามขั้นตอนของการเตรียมแอนติเจน (ปั่นล้าง + แช่แข็ง + sonicate) จะทำซ้ำ ๒ ครั้ง จากนั้นทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ได้โดยวิธี Bradford ซึ่งพบว่าได้ความเข้มข้นของโปรตีนรวมของเชื้อทั้งสองซีโรวาร์เป็น ๘.๗๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สำหรับใช้ dot บนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยนำมาปรับใช้ความเข้มข้นของแอนติเจนตั้งแต่ ๑.๑- ๒.๒ ไมโครกรัม/มิลลิลิตรต่อปริมาตร ๑ มิลลิลิตร จากนั้นตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อด้วยวิธี Dot-ELISA[๗] แล้วอ่านผลการเกิดสี

๑.๒ ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมของสารที่ใช้ในการป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์

ได้ศึกษาโดยใช้สารป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์ ๒ ชนิด คือ ๕%BSA และ ๑%skim milk พบว่า ๑%skim milk จะให้ค่าพื้นหลังที่ไม่ติดสี แต่เกิดผลบวกปลอมกับซีรั่ม กลุ่มควบคุมผลลบ ในขณะที่ ๕%BSA ไม่เกิดผลบวกปลอมดังกล่าว

๑.๓ ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมของความเข้มข้นของซีรั่ม

Scanned by CamScanner

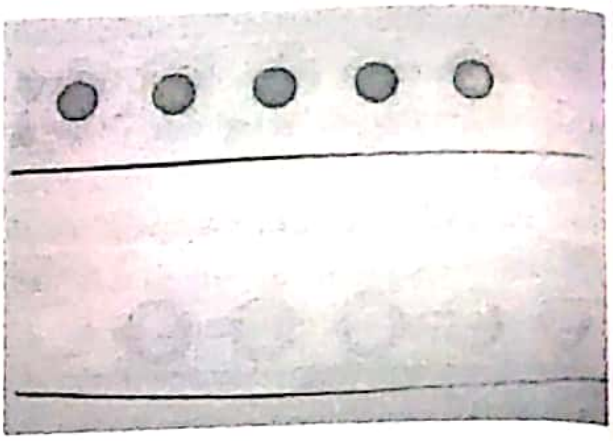
จากการเจือจางตัวอย่างซีรั่มตั้งแต่ ๑:๔๐, ๑:๑๐๐, ๑:๑๖๐, ๑:๒๐๐, ๑:๓๒๐ และ ๑:๖๔๐ แล้วนำมาทดสอบโดยใช้สภาวะของแอนติเจนที่มีความเข้มข้น ๐.๗๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ ๕% BSA เป็นสารป้องกันการจับตัวของสารไม่พึงประสงค์

๑.๔ ผลการศึกษาสภาวะเหมาะสมความเข้มข้นของคอนจูเกต

เมื่อใช้ความเข้มข้นของคอนจูเกต (goat anti-human IgG-horesradish peroxidase conjugated) ตั้งแต่ ๑:๕๐๐, ๑:๑,๐๐๐, ๑:๑,๕๐๐, ๑:๒,๐๐๐ และ ๑:๔,๐๐๐ สำหรับการทดสอบ โดยใช้สภาวะการทดสอบที่ได้ทดสอบสภาวะเหมาะสมไปแล้ว

ดังนั้น เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี Dot-ELISA จึงสามารถสรุปขั้นตอนการทดสอบโดยวิธีดังกล่าวได้ ซึ่งแสดงดังตารางที่ ๑ และแสดงการทดสอบผลบวกและลบ ดังรูปที่ ๑

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นโดยการทำ checkerboard titration พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนที่ใช้ในการเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส คือ ๐.๗๕ ไมโครกรัม/๑๐๐ ไมโครลิตร สารป้องกันการจับตัวของสารไม่พึงประสงค์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคือ ๕%BSA ระดับความเจือจางของซีรั่มที่เหมาะสมคือ ๑:๔๐ และระดับความเข้มข้นเหมาะสมของคอนจูเกตคือ ๑ : ๑,๕๐๐



รูปที่ ๑ ผลบวก (แผ่นบน) และลบ (แผ่นล่าง) โดยหลักการ Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นจุดสุดท้ายในแต่ละแผ่นคือ reagent control

ตารางที่ ๑ ขั้นตอนของการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* โดยวิธี Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น

ขั้นตอน	สภาวะ, ความเข้มข้น ที่เหมาะสม
๑. การ Dot แอนติเจน	๐.๗๕ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
๒. ล้างด้วย PBS - tween	๒๐๐ ไมโครลิตร, ๓ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที
๓. เติม ๕% BSA	๑๐๐ ไมโครลิตร เวลา ๓๐ นาที
๔. เติมซีรั่ม	๑๐๐ มิลลิลิตร, ๑:๔๐ นาน ๓๐ นาที
๕. ล้างด้วย PBS -tween	๒๐๐ ไมโครลิตร, ๓ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที
๖. เติม ๕% BSA	๑๐๐ ไมโครลิตร นาน ๓๐ นาที
๗. เติม คอนจูเกต	๑:๑,๕๐๐ นาน ๓๐ นาที
๘. ล้างด้วย PBS -tween	๒๐๐ ไมโครลิตร, ๓ ครั้ง ๆ ละ ๕ นาที
๙. เติม Substrate	๑ มิลลิลิตร นาน ๕ นาที
๑๐. เติมน้ำกลั่น	๕ นาที

ผลการทดสอบสภาวะเหมาะสมสำหรับวิธี Dot-ELISA โดยใช้ตัวอย่างควบคุมผลบวกและลบ พบว่าให้จุดสีเกิดขึ้นในตัวอย่างควบคุมผลบวกและไม่เกิดสีในตัวอย่างควบคุมผลลบอย่างชัดเจน โดยจุด reagent control ซึ่งใช้ PBS แทนตัวอย่างซีรั่มก็ให้ผลลบคือไม่เกิดจุดสีเช่นเดียวกัน

๒. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี Dot-ELISA

จากตัวอย่างทดสอบ ๕๘ ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT ๑๗ ตัวอย่าง และให้ผลลบโดยวิธี MAT ๔๑ ตัวอย่าง เมื่อนำผลการทดสอบของทั้งสองวิธีมาเปรียบเทียบกัน โดยให้วิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐาน ได้ค่าความไว ความจำเพาะของวิธี Dot-ELISA เป็นร้อยละ ๕๒.๙ และ ๖๓.๔ ตามลำดับ โดยแสดงผลดังตารางที่ ๒ และ ๓

Scanned by CamScanner

ตารางที่ ๒ ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบวิธี Dot-ELISA

ประเภทตัวอย่างซีรั่มทดสอบ	จำนวน (ตัวอย่าง)
MAT ผลบวก	๑๗
MAT ผลลบ ได้แก่	๔๑
- กลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดี และผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด จำนวน ๓๕ ตัวอย่าง	
- กลุ่มผู้ป่วยโรคอื่น ยกเว้นโรคเลปโตสไปโรสิส ประกอบด้วยโรคสครับไทฟัส ซิฟิลิส และไข้หวัดนก จำนวน ๖ ตัวอย่าง	
รวม	๕๘

ความไว = ร้อยละ ๕๒.๙ ความจำเพาะ = ร้อยละ ๖๓.๔

ค่าทำนายผลบวก = ร้อยละ ๓๗.๕ ค่าทำนายผลลบ = ร้อยละ ๗๖.๕ ความถูกต้อง = ร้อยละ ๖๐.๓

ความไว $= \frac{๙ \times ๑๐๐}{๑๗}$ = ร้อยละ ๕๒.๙

ความจำเพาะ $= \frac{๒๖ \times ๑๐๐}{๔๑}$ = ร้อยละ ๖๓.๔

ค่าทำนายผลบวก $= \frac{๙ \times ๑๐๐}{๒๔}$ = ร้อยละ ๓๗.๕

ค่าทำนายผลลบ $= \frac{๒๖ \times ๑๐๐}{๓๔}$ = ร้อยละ ๗๖.๕

ความถูกต้อง $= \frac{๙ + ๒๖}{๕๘}$ = ร้อยละ ๖๐.๓

ตารางที่ ๓ เปรียบเทียบการตรวจซีรั่มด้วยวิธี MAT กับวิธี Dot-ELISA

		MAT		
		+	-	รวม
Dot-ELISA ผล	+	๙	๑๕	๒๔
ผล	-	๘	๒๖	๓๔
	รวม	๑๗	๔๑	๕๘

วิจารณ์

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่อง (preliminary study) สำหรับวิธี Dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ*เลปโตสไปรา*พบว่าระดับความไวและความจำเพาะยังไม่สูงมากนัก ซึ่งอาจจะมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการทดสอบได้แก่

- ปัจจัยจากกระดาษไนโตรเซลลูโลส

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสหลายชนิดซึ่งพบว่าการดูดซับโปรตีนแอนติเจนมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด และจะมีผลต่อการตรวจสอบโดยวิธี Dot-ELISA ซึ่งนภาธร บานชื่น[๗] ได้ศึกษาถึงวัสดุสำหรับยึดติดแอนติเจนหรือแอนติบอดีพบว่า ถ้าแอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับวัสดุได้ไม่ดีพอ จะมีผลทำให้การทดสอบมีความไวลดลงและพบได้บ่อยว่า เป็นเหตุให้การทดสอบนั้นมีค่าพื้นหลังสูงขึ้นด้วย และจากการศึกษาของ Kaur พบว่าการเลือกกระดาษไนโตรเซลลูโลส จะส่งผลถึงการจับที่เหมาะสมของเซลล์ และอาจทำให้เซลล์ที่ดูดซึมสามารถ สลายไปได้[๘]

- การศึกษาการป้องกันการจับตัวของสารไม่พึงประสงค์

จากการทดสอบสารที่ใช้ในการป้องกันการจับตัว

Scanned by CamScanner

ของสารไม่พึงประสงค์ ๒ ชนิด คือ ๕%BSA และ ๑%skim milk พบว่า skim milk ให้ผลของค่าฟื้นหลังน้อยกว่า ๕%BSA แต่เกิดผลบวกปลอม จึงเลือกใช้ ๕%BSA อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างโรคอื่นอาจจะมีการจับกันของแอนติบอดีหรือโปรตีนที่ไม่จำเพาะในตัวอย่างซีรั่มของผู้ป่วยเอง จึงทำให้เกิดผลบวกปลอมขึ้นหรือจากปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์ เช่น คุณหภูมิ หรือเวลา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ธาวารัชต์ ธารากุล ที่พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์ นอกจากชนิดของสารป้องกันการจับของสารไม่พึงประสงค์ แล้วยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้อีกด้วย

- สภาวะความเข้มข้นของคอนจูเกต

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้คอนจูเกตชนิด Anti-human IgG ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดผลลบปลอม เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรสิสมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันชนิด IgM ในปริมาณที่สูง และสามารถคงอยู่ได้นานกว่าชนิด IgG ดังที่ Adler และคณะ[๗] ได้ศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเชื้อ *เลปโตสไปรา* พบว่า IgM จะตอบสนองได้สูงกว่า IgG โดยปรากฏได้นานหลายเดือน ในขณะที่ Tong และคณะ[๑๐] ศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในโรคเลปโตสไปโรสิส โดยนำผู้ป่วย ๓ ราย ที่มีอาการสัมพันธ์กับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ พบว่าเมื่อนำซีรั่มมาทดสอบจะพบปริมาณของ IgM ในการทดสอบของทั้ง ๓ ปฏิกิริยา จากนั้นเมื่อนำมาเจือจางในระดับสองเท่าหรือสี่เท่า จะพบปริมาณ IgM สูงกว่า IgG กับ IgA และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Natarajaseenivasan[๑๑] ที่ศึกษาปริมาณโปรตีนของโรคนี้ ในระยะ acute และระยะ convalescent พบว่าระดับ IgM จะเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ convalescent ในขณะที่ระดับของ IgG จะลดลง ดังนั้น วิธีการตรวจโดยใช้คอนจูเกตที่เป็นแอนติบอดีต่อ IgG เพียงอย่างเดียวอาจจะไม่เพียงพอต่อการตรวจวินิจฉัยในระยะเริ่มแรก

สำหรับในการศึกษาครั้งนี้พบว่าให้ผลลบปลอมจำนวน ๘ ตัวอย่าง ซึ่งเมื่อเทียบกับผลการตรวจโดยวิธี MAT พบว่าเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าไตเตอร์ต่ำ และเป็นการตรวจหาเฉพาะแอนติบอดีชนิด IgG เท่านั้น ซึ่งจะต้องมีการปรับปรุงวิธีการตรวจตามวัตถุประสงค์ที่เหมาะสม เช่น ในกรณีการตรวจกรอง โดยพัฒนาเป็นวิธี IgM Dot-ELISA ซึ่งจะให้ความไวสูงสำหรับตัวอย่างส่งตรวจในระยะ acute phase ดังเช่น Silva และคณะ[๑๒] ได้ศึกษาวิธี Dot-ELISA โดยทำการตรวจหาแอนติบอดีทั้งชนิด IgG, IgA และ IgM เทียบกับวิธี MAT พบว่า วิธี IgM Dot-ELISA จะให้ความไวสูงถึงร้อยละ ๙๘ ในขณะที่การตรวจหา IgG หรือ IgA จะให้ความไวที่ต่ำกว่า นอกจากนี้อาจจะใช้วิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อที่ต้องใช้คอนจูเกตทั้งชนิดที่เป็นแอนติบอดีต่อ IgG และ IgM ร่วมกัน อย่างไรก็ตามถ้าเป็นการตรวจหาเฉพาะ IgM มีรายงานการศึกษาของ Ayi และคณะ[๑๓] ที่พบว่า IgG สามารถแย่งจับกับ IgM ทำให้เกิดผลลบปลอมเกิดขึ้นได้ ส่วนผลบวกปลอมในการศึกษานี้พบว่ามี ๑๕ ตัวอย่าง และอยู่ในกลุ่ม endemic area ทั้งหมดซึ่งให้ผล MAT เป็นลบ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเป็นซีรั่มของผู้ที่เคยติดเชื้อ*เลปโตสไปรา*มาก่อนทำให้มีระดับของแอนติบอดีในปริมาณน้อยกว่าความไวของวิธี MAT ที่สามารถตรวจพบได้[๑๓] หรืออาจจะเป็นผู้ที่ติดเชื้อในกลุ่มโรคอื่นที่สามารถให้ผลบวกข้ามกลุ่มในโรคเลปโตสไปโรสิสได้ เช่น กลุ่มพาหะของไวรัสตับอักเสบบี[๑๔] ไข้เลือดออก[๗] ซึ่งอาจจะเป็นผู้ที่ไม่มีอาการแสดงชัดเจนและผู้วิจัยไม่ได้ตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือโรคอื่น ๆ ในกลุ่มดังกล่าว

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาปฏิกิริยาข้ามกลุ่มของวิธี Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นพบว่าไม่มีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเกิดขึ้นในกลุ่มโรคสำคัญสามโรคคือ สครับไทฟัส, ซิฟิลิส และไข้หวัดนก ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่มีอาการคล้ายคลึงกับโรคเลปโตสไปโรสิสและมีรายงานถึงปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคดังกล่าวในการทดสอบวิธีอื่น ได้แก่ ELISA, IFA และ MAT[๑๕,๑๖]

Scanned by CamScanner

เนื่องจากการวิจัยนี้ได้ใช้วิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐานอ้างอิงเปรียบเทียบกับวิธี Dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าวิธี MAT แม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับในด้านของความจำเพาะ แต่ในส่วนของความไวแล้วยังมีค่าไม่สูงมาก รวมถึงปัญหาในด้านต่าง ๆ เช่น ความยุ่งยากในการทดสอบและการอ่านผล[๑๗,๑๘] โดยเฉพาะในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อที่พบว่าความไวจะมีค่าเพียงร้อยละ ๔๑ และจะสูงขึ้นเป็นร้อยละ ๘๓.๓ ในสัปดาห์ต่อมา[๑๘,๑๙] และตัวอย่างทดสอบที่เก็บส่งมาที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกก็จัดอยู่ในกลุ่ม acute phase serum ซึ่งการปรากฏของระดับ IgG อาจจะต่ำอยู่ ดังนั้นการเลือกวิธีมาตรฐานเพื่อ เปรียบเทียบหาค่าความไวความจำเพาะอาจจะต้องผนวกทั้งผลการตรวจโดยวิธี MAT และผลการวินิจฉัยอาการทางคลินิกจากแพทย์ร่วมกัน สำหรับวิธี Dot-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้ สามารถแยกกลุ่มผลบวกและลบได้ชัดเจนในกลุ่มควบคุม แต่ก็มีปัญหาจากการนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้กับกลุ่มตัวอย่างสำหรับการนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจกรองยังมีความจำเป็นต้องนำวิธีไปศึกษามาพัฒนา หรือปรับปรุงเพื่อแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น เช่น การนำ recombinant antigen มาใช้แทน crude antigen รวมถึงการเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างให้เหมาะสมสำหรับการทดสอบในระดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อาจารย์ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือการเขียนบทคัดย่อสำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ และขอขอบคุณ คุณรัชณีพร คำมินทร์ จากสำนักป้องกันควบคุมโรค จังหวัดพิษณุโลก ที่ช่วยอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

๑. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารบก กรมแพทย์ทหารบก. รายงานโครงการวิจัยประจำปี ๒๕๔๑. กรุงเทพมหานคร: อรุณการพิมพ์; ๒๕๔๒.

๒. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ๒๕๔๕. กรุงเทพมหานคร: องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์; ๒๕๔๗.

๓. นภาธร บานชื่น. ELISA ทฤษฎีและปฏิบัติ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน; ๒๕๓๖.

๔. ศราวุธ สุทธิรัตน์, เกษรากรณ์ เลื่อมสำราญ, ณัฐมน ตั้งตรงวัฒนา, จีรนันท์ อารีรอบ, ศันสนีย์ ตันตีจรัม. การเปรียบเทียบวิธีอินไดเร็คอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และลาเทกซ์แอกกลูติเนชั่นสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา. วารสารวิชาการสาธารณสุข ๒๕๔๕; ๑๑:๘๖๓-๘.

5. ธารารัชต์ ธารากุล. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยาภูมิคุ้มกันการวิจัยและพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูป. กรุงเทพมหานคร: บางกอกบล็อก; ๒๕๔๕.

6. กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. กรุงเทพมหานคร: ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย; ๒๕๔๔.

7. Tansuphasiri U, Deepradit S, Phulsuksombati D, Tangkanakul W. A test strip IgM dot-ELISA assay using leptospiral antigen of endemic strains for serodiagnosis of acute leptospirosis. J Med Assoc Thai 2005; 88:391-8.

๘. Kaur R, Dikshit KL, Raje M. Optimization of immunogold labeling TEM: an ELISA-based method for evaluation of blocking agents for quantitative detection of antigen. J Histochem Cytochem 2002; 50:863-73.

๙. Adler B, Fain S. The antibodies involved in the human immune response to leptospiral infection. J Med Microbiol 1978; 11:387-400.

๑๐. Tong MJ, Rosenberg EB, Votteri BA, Tsai CC. Immunological response in leptospirosis. Report of three cases. Am J Trop Med Hyg 1971; 20:625-30.

๑๑. Natarajaseenivasan K, Prabhu N, Selvanayaki K, Raja SS, Ratnam S. Human leptospirosis in Erode, South India: serology, isolation, and characterization of the isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. J Infect Dis 2004; 57:193-7.

๑๒. Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, 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.

๑๓. Ari MD, Lingappa J, Neville B, Wannemuehler K, Plikaytis B, Bragg SL. Potential problems associated with the use of IgM assays for diagnosis of acute leptospirosis. Proceedings of the 4th Leptospirosis; Disarming the threat; 2005 Nov 14-16; Central Duangtawan Hotel, Chiang Mai. Chiang Mai: International Leptospirosis Society; 2005. p. 66-7.

๑๔. Pol Sae S, Bharadwaj Renu S. P-50: A new HPLC purified candidate antigen. Proceedings of the 4th Lep-

Scanned by CamScanner

tospirosis; Disarming the threat; 2005 Nov 14-16; Central Duangtawan Hotel, Chiang Mai. Chiang Mai: International Leptospirosis Society; 2005. p. 72-3.

๑๔. Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific Dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. Am J Trop Med Hyg 1985; 34:346-54.

๑๕. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC. Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J Infect Dis 1987; 156: 183-8.

๑๖. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gen Microbiol 1985; 131:377-85.

๑๗. Chimsumang S, Chettanadee S, Jitrathai S, Wongchotigul V. Indirect Immunoperoxidase test for the diagnosis of leptospirosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2005; 36:296-301.

๑๘. Sehgal S, Vijayachari P, Sharma S, Sugunan A. Lepto dipstick : a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 96:161-4.

Abstract **Development of Dot-ELISA for Diagnosis of Leptospirosis**

Sarawut Suttirat*, Wanpen Noiutai*, Wimonrat Trirattanapakdee*, Watchara Manhet*, Sansanee Tanjatham**

*Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, **Regional Medical Sciences Center Phitsanulok

Journal of Health Science **2006; 15:225-32.**

Dot-ELISA method for detection of leptospiral antibody was developed for screening in field trial during February-May, 2005. The optimized conditions were consisting of using pools of *Leptospira interrogans* serovar *bratislavar* and *autumnalis* antigens 1.75 µg/ml, 5% BSA for blocking, 1:80 serum dilution, a 1:1,500 goat anti-human IgG peroxidase conjugate, washed three times with PBS-tween in each washing step and incubated at room temperature. In all, 58 serum samples tested by MAT were used for this comparative study as the gold standard method. The sensitivity of specificity 63.4 percent, positive predictive value of 37.5 percent, negative predictive value of 76.5 percent and accuracy of 52.9 percent and 60.3 percent were reported. Cross reactions with syphilis, avian flu and scrub typhus were not found. This method would have a diagnostic potential under certain conditions. However more samples are needed in further evaluation of this test method.

Key words: **Leptospirosis, Dot-ELISA**

Scanned by CamScanner