ศึกษาเปรียบเทียบการแยกทางซีรัมวิทยาของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Cross Agglutinin Absorption Test, Immunoblotting และ Microscopic Agglutination Test

นางสาวมยุรฉัตร เบี้ยกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2991-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE STUDY OF SEROLOGICAL CLASSIFICATION OF LEPTOSPIRA BY USING CROSS AGGLUTININ ABSORPTION TEST, IMMUNOBLOTTING AND MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST

Miss Mayurachat Biaklang

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Public Health
Department of Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
ISBN 974-14-2991-6
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศึกษาเปรียบเทียบการแยกทางซีรัมวิทยาของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Cross Agglutinin Absorption Test, Immunoblotting และ Microscopic Agglutination Test
โดย	นางสาวมยุรฉัตร เบี้ยกลาง
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ ปัทมาลัย)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณุวีร์ ประภัสระกูล)

.....กรรมการ
(นายสัตวแพทย์ ดร. ธราดล เหลืองทองคำ)

.....กรรมการ
(นางพิมพ์ใจ นัยโกวิท)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มยุรจัตร เบี้ยกลาง : ศึกษาเปรียบเทียบการแยกทางซีรัมวิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Cross Agglutinin Absorption Test, Immunoblotting และMicroscopic Agglutination Test (COMPARATIVE STUDY OF SEROLOGICAL CLASSIFICATION OF LEPTOSPIRA BY USING CROSS AGGLUTININ ABSORPTION TEST, IMMUNOBLOTTING AND MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST) อ. ที่ปรึกษา : ผศ.น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒน โภคิน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล 65 หน้า.ISBN 974-14-2991-6

โรคเลปโตสไปโรสิส เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญ มีสาเหตุจากเชื้อเลปโตสไปราซึ่งปัจจุบันสามารถจำแนกทางซีรัมวิทยาได้มากกว่า 200 ชนิด การตรวจจำแนกเชื้อดังกล่าวใช้วิธีMAT ร่วมกับ CAATซึ่งยับซ้อนและใช้เวลามาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเพื่อเปรียบเทียบวิธีการจำแนกเชื้อด้วยวิธี MAT, CAATและ Immunoblotting เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมต่อไป โดยนำเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวน 15 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยวิธี MAT, CAATและ Immunoblotting พบว่าวิธี MAT สามารถจำแนกเชื้อได้ แต่ยังพบว่าเชื้อหลายตัวยังคงให้ปฏิกิริยาการตกตะกอนข้ามกับซีโรวาร์อื่น ทำให้ไม่สามารถชี้จำเพาะว่าเป็นซีโรวาร์ใดๆ ได้ เมื่อทำการตรวจสอบต่อด้วยวิธี CAAT ทำให้สามารถชี้ชัดว่าเป็นเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ในซีโรวาร์ใดๆ แต่วิธี MAT และ CAAT มีความซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลาในการดำเนินการนานและยังต้องใช้เชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบอีกด้วย วิธี Immunoblotting จึงเป็นทางลือกใหม่ที่เหมาะสม แต่จำเป็นต้องทำการศึกษารูปแบบของเชื้อทุกซีโรวาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม.....

##4575581231 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEY WORD : Leptospira / MAT/ CAAT / Leptospira Test Panel

TEMPERATURE/ TIME/ THAILAND

MAYURACHAT BIAKLANG : (COMPARATIVE STUDY OF SEROLOGICAL CLASSIFICATION OF LEPTOSPIRA BY USING CROSS AGGLUTININ ABSORPTION TEST, IMMUNOBLOTTING AND MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST. THESIS ADVISOR : THANIS DAMRONGWATANAPOKIN, D.V.M., Ph.D.,THESIS COADVISOR NUVEE PRAPASARAKUL, D.V.M., Ph.D. 65 PP. ISBN 974-14-2991-6

Leptospirosis is an important zoonoses caused by leptospira. The leptospira can be grouped serologically into serovars. Up-to-date there are more than 200 serovars identified. To identify leptospira serovars, Microscopic Agglutination Test (MAT) and Cross Agglutination Absorption Test (CAAT) will be used. However, MAT and CAAT methods in identifying serovars is time consuming. It is also required a highly laboratory skilful personnel. The objective of this study is to compare MAT, CAAT and immunoblotting in order to find an efficient and relatively cheap methods to identify serovars of leptospira. Fifteen isolates of leptospira from patients with leptospirosis suspected cases were used in this study. The results showed that MAT could be used to identified leptospira serovars. But the MAT procedure alone could not identified all the study isolates due to the presentation of cross agglutination among the study isolates. The CAAT proved to be highly efficient in identifying specific serovars. All the study isolates could be identified via this method. Nonetheless, the CAAT methods is very laborious and required live leptospires in the process of identification. The live leptospires is considered as an occupational hazard which required high level of attention from laboratory personnel. If there are a method that could reduce the hazard and labor, Immunoblotting is one of the promising method. In this study, immunoblotting could be used to identified all the study isolates. But further investigation is need to observe the different in pattern of all identified serovars.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Veterinary Public Health Student's Signature.....

Field of Study Veterinary Public Health Advisor's Signature.....

Academic Year 2006 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณุวีร์ ประภัสระกูล ซึ่งได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เพื่อนๆ และพี่ๆ นิสิตปริญญาโท-เอก ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกๆท่าน ที่ช่วยให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณสุปิยา ฤกขะวุฒิกุล คุณธิติมา ไตรพิพัฒน คุณวารี นิยมธรรม และคุณสุภาพ เหมืองแก้ว ภาควิชาจุลชีววิทยาคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพิมพ์ใจ นัยโกวิท คุณวิมล เพชรกาญจนพงศ์ คุณปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ คุณอารี ทัตติยพงศ์ คุณอุมาพร สีนา คุณจุฑามาศ คำประวัติ คุณศศิธร แข็งแรง คุณศิริวรรณ ศรีฑาเวช คุณสถาปนา เจริญไชย ชาวกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาตลอด

ขอขอบพระคุณอาจารย์กัลลยาณี ดวงฉวี อาจารย์ อนุชัย นิเวศปฐมวัฒน์ คุณวรรณภา ฤทธิ์สน คุณวิไลรัตน์ ลิ่วคงสถาพร และน.สพ.ธีรศักดิ์ ชักนำ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัยที่ให้ความสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อเลปโตสไปโรสิส..... 3
2.2 การศึกษาทางจุลสัณฐานวิทยา..... 5
2.3 การจัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปรา..... 6
2.4 การเก็บตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส..... 11
2.5 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย..... 12
2.6 การจำแนกเชื้อเลปโตไปรา..... 13
2.7 ปัญหาจำแนกเชื้อเลปโตสไปราในประเทศไทย..... 15

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18
3.1 วิธีการศึกษา..... 18

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 25
4.1 ตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่ใช้ในงานวิจัย..... 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี
Microscopic Agglutinationtest (MAT)..... 26
4.3 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี
Cross agglutinin-absorption test (CAAT)..... 28
4.4 ผลการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี Immunoblot..... 30

บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ..... 41
5.1 อภิปรายผลสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 41

รายการอ้างอิง..... 45

ภาคผนวก..... 50
ภาคผนวก ก 51
ภาคผนวก ข 56
ภาคผนวก ค 60
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดงการจำแนกซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรค 8

2 แสดงสปีชีส์ของของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค..... 9

3 แสดงจีโนมสปีชีส์และซีโรกรุ๊ปของเชื้อเลปโตสไปรา..... 10

4 รายละเอียด hyperimmune rabbit antisera มาตรฐาน ที่ใช้ในการทดสอบ…… 21

5 การเปรียบผลทดสอบทางชีวเคมี ด้วยวิธีOxidase test และ Egg yolk reaction... 25

6 การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจาก hyperimmune rabbit antisera มาตรฐานกับ แอนติเจนมาตรฐานด้วยวิธี MAT..... 26

7 การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจาก hyperimmune rabbit antisera มาตรฐานกับ เชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยด้วยวิธี MAT..... 27

8 ผลการเปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีซีโรวาร์มาตรฐานและ..... 28 แอนติเจนซีโรวาร์ด้วยวิธี CAAT

9 ผลการเปรียบเทียบระหว่างแอนติบอดีซีโรวาร์มาตรฐานและเชื้อเลปโตสไปรา จากผู้ป่วย ด้วยวิธี CAAT..... 29

10 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน โดยวิธี SDS-PAG..... 31

11. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยก จากผู้ป่วยเทียบกับซีโรวาร์ Autumnalis โดยวิธี SDS-PAGE…… 33

12. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย เทียบกับซีโรวาร์ Pyrogenes โดยวิธี SDS-PAGE…… 36

13. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย เทียบกับSejroe โดยวิธี SDS-PAGE…… 39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์
Australis 12,000 เท่า..... 5
2. โครงสร้างของเชื้อเลปโตสไปรา..... 6
3. วิธีการดำเนินการศึกษา..... 19
4. แสดงผลลบและผลบวกด้วยวิธี MAT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด..... 22
5. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน
โดยวิธี SDS-PAGE 30
6. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย
โดยวิธี SDS-PAGE..... 32
7.แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera
ซีโรวารAutumnaliและตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธีImmunoblot 34
8. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย
กับ Pyrogenes โดยวิธี SDS-PAGE..... 35
9. แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera
ซีโรวาร์Pyrogenesและเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธีImmunoblot 37
10. แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย
กับซีโรวาร์ Sejroe โดยวิธี SDS-PAGE 38
11. แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera
ซีโรวาร์ Sejroe และเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Immunoblot..... 40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรสิสหรือไข้ฉี่หนู (Leptospirosis) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria) ชนิดสไปโรซีต (Spirochaete) สกุล (Genus) เลปโตสไปรา (*Leptospira*) จัดออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการก่อให้เกิดโรคคือ *Leptospira biflexa* เป็นกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ อาศัยอย่างอิสระในสิ่งแวดล้อม (free living saprophyte) และ *Leptospira interrogans* เป็นกลุ่มเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ปัจจุบันได้จัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปราทางซีรัมวิทยา (Serology) ออกเป็น 24 ซีโรกรุ๊ป (serogroups) และสามารถแบ่งย่อยเป็นซีโรวาร์ (serovars) ได้มากกว่า 200 ซีโรวาร์ นอกจากจะแบ่งเชื้อตามซีรัมวิทยายังมีการศึกษาที่แบ่งกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 17 จีโนมสปีชีส์ (Genomespecies) คือ *L. interrogans*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. borgpetersenii* เป็นต้น (ตารางที่ 2) (Levett, 2001)

เชื้อเลปโตสไปรามีสัตว์ฟันแทะ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดเป็นรังโรค (Reservoir host) เช่น หนู, สุกร, วัว, กระบือ และสุนัข เป็นต้น (Faine *et al*., 1999) เชื้อนี้จะถูกขับออกมากับปัสสาวะของสัตว์และปนเปื้อนอยู่ตามสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน เชื้อจะสามารถไชเข้าสู่ร่างกายคนโดยผ่านผิวหนังหรือบาดแผล เมื่อเชื้อเข้าสู่บาดแผลเชื้อจะเข้าไปแบ่งตัวในกระแสเลือดและแพร่กระจายไปทั่วร่างกายโดยเฉพาะที่ตับ ไต สมอง และระบบประสาทส่วนกลาง มีระยะฟักตัวของโรคเฉลี่ยประมาณ 10 วัน (ดาริกา, 2544) การรักษาโรคเลปโตสไปโรสิส มักจะรักษาตามอาการแทรกซ้อนเพื่อแก้ไขความผิดปกติและภาวะแทรกซ้อนร่วมกับการให้ยาปฏิชีวนะ เช่น penicillin หรือ doxycycline เป็นต้น อาการของโรคเลปโตสไปโรสิสในระยะแรกๆ ของการป่วยนั้นแยกจากโรคอื่นๆ ได้ยาก จึงต้องอาศัยการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งจะนำไปสู่การดูแลและรักษาผู้ป่วยได้ดียิ่งขึ้น (Faine *et al*., 1999; ขจรศักดิ์, 2544)

ปัจจุบันโรคฉี่หนูถือว่าเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยโรคหนึ่ง เนื่องจากมีอัตราการติดเชื้อและตายของประชากรเพิ่มสูงขึ้น จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ พ.ศ.2541 พบผู้ป่วย 2,226 ราย แล้วเพิ่มขึ้นเป็น 6,080 ราย ในปี พ.ศ.2542 ต่อมาเป็น 14,285 ราย ในปี พ.ศ.2543 ซึ่งเป็นปีที่พบผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสมากที่สุดเป็นประวัติการณ์ และเริ่มมีจำนวนผู้ป่วยลดลง เป็น 10,271 ราย ในปี พ.ศ.2544 ส่วนในปี 2545 จำนวนผู้ป่วยลดลงจากเดิมเหลือ 6,864 ราย ถึงปัจจุบันยังพบว่ามีการระบาดของโรคนี้อยู่แต่

จำนวนผู้ป่วยลดน้อยลง เนื่องจากมีวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติเพื่อแยกสาเหตุของโรคฉี่หนูออกจากโรคอื่น ๆ มากขึ้น

การจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราทางซีรัมวิทยา มักใช้วิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก(Faine et al., 1999) วิธีนี้สามารถจำแนกซีโรกรุ๊ป/ซีโรวาร์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุได้ แต่เป็นวิธีที่มีความไวต่ำและการตรวจมีความยุ่งยากมาก เนื่องจากต้องใช้เชื้อหลายซีโรวาร์ และเชื้อมักเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (Agglutination) กับซีโรกรุ๊ปอื่นๆ เช่น ซีโรกรุ๊ป Autumnalis อาจเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับซีโรกรุ๊ป Djasiman (ดวงพรและคณะ, 2543) ดังนั้นการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT มักจะทำควบคู่กับวิธีครอสแอคกลูตินินแอบซอร์บชั่นเทสต์ (Cross Agglutinin Absorption Test; CAAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน เพื่อลดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของซีโรกรุ๊ป/ซีโรวาร์ (Faine et al., 1999) วิธี CAAT เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่วิธีนี้มีความยุ่งยากมากกว่าวิธี MAT เทคนิคอิมมูโนบล็อตติ้ง (Immunoblotting) จะลดขั้นตอนยุ่งยากด้านการเตรียมเชื้อเลปโตสไปราที่จะต้องใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการตรวจวินิจฉัยได้ง่ายกว่า และเตรียมเก็บไว้ได้ล่วงหน้า และไม่เป็นต้องใช้เชื้อเป็นซึ่งอาจเกิดอันตรายกับผู้ปฏิบัติการในห้องทดสอบ และผลการทดสอบที่ได้จะอยู่บนแผ่นตรวจทำให้สามารถเก็บผลการทดสอบได้เป็นเวลานาน ดังนั้นการศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนบล็อตติ้ง จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการแยกซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปรา (Doungchawee G. et al, 2005)

การจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปรามีหลายวิธี ได้แก่ วิธี MAT, CAAT และ Immunoblotting วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ทดสอบหาซีโรวาร์ของเชื้อที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการของโรคเลปโตสไปโรสิส ดังนั้นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ วิธี CAAT, Immunoblotting และ MAT จึงน่าจะเป็นการศึกษาที่เพิ่มความจำเพาะ และความแม่นยำมากขึ้นในการแยกทางซีรัมวิทยา โดยเป็นพื้นฐานในงานวิจัยและการพัฒนาในการผลิตเป็นชุดทดสอบและวัคซีน (vaccine) ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบการแยกทางซีรัมวิทยาของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Cross Agglutinin Absorption Test, Immunoblotting และ Microscopic Agglutination Test

บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อเลปโตสไปโรสิส

โรคเลปโตสไปโรสิสหรือโรคฉี่หนูเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ชนิดสไปโรขีต ในสกุลเลปโตสไปรา ซึ่งเชื้อในสกุลนี้จะแบ่งได้เป็น 2 สปีชีส์ (Species) คือ *Leptospira biflexa* (*L. biflexa*) และ *Leptospira interrogans* (*L. interrogans*) *L. biflexa* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ในขณะที่ *L. interrogans* ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ การแพร่กระจายของเชื้อ *L. interrogans* เกิดจากสัตว์นำโรค หนู วัว ควาย สุกร สุนัข แพะ และแกะ ปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะ ทำให้เชื้อปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมทั้งแหล่งน้ำ ดิน พืช ผัก เชื้อสามารถไชเข้าสู่ร่างกายของคนและสัตว์ทางผิวหนังตามรอยแผลและรอยขีดข่วน เยื่อบุของปาก ตา จมูก คนมีโอกาสสัมผัสเชื้อ 2 วิธี คือ การติดเชื้อทางตรง (direct infection) เป็นการรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยไม่มีสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกลางหรือเป็นสื่อในการถ่ายโรค ซึ่งอาจเกิดได้จากที่คนสัมผัสกับสัตว์ ปัสสาวะ เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่แท้งหรือเลือดที่มีเชื้อปะปนอยู่ นอกจากนี้คนยังอาจจะติดเชื้อได้จากการถูกสัตว์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราเช่น หนู สุนัข หรือแมว กัด การติดเชื้อทางอ้อม (indirect infection) ได้แก่ การทำกิจกรรมที่ต้องแช่น้ำหรือการย่ำบริเวณที่ชื้นแฉะ เป็นเวลานานๆ เช่น การทำนา การว่ายน้ำ การหาปลา หรือล่องแก่ง (ธรรมวรรณ, 2545) เป็นต้น หรืออาจจะเกิดกับคนที่มีอาชีพที่เสี่ยงต่อการรับเชื้อเลปโตสไปราได้สูง เช่น ได้แก่ ชาวนา ชาวไร่อ้อย คนงานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ คนงานขุดลอก ท่อระบายน้ำ สัตวแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และนักท่องเที่ยว (ดาริกา, 2544)

เชื้อเลปโตสไปราติดต่อสู่คน และสัตว์ได้โดยการไชผ่านเยื่อบุที่มีบาดแผล รอยถลอกหรือผิวหนังที่เปียกชุ่มจากการแช่น้ำนานๆ เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมงและกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ปอด ตับ ไต หัวใจ เยื่อหุ้มสมอง มดลูก เป็นต้น เนื่องจากเชื้อสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็ว จึงไม่พบการอักเสบที่ผิวหนังตำแหน่งทางเข้าของเชื้อ เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้สูงสุดภายใน 2 - 4 วัน หลังจากเข้าสู่ร่างกาย (ธรรมวรรณ, 2545) และใช้เวลาพักตัวของโรคประมาณ 2 - 20 วัน ก่อนแสดงอาการของโรคสามารถตรวจหาการตรวจเชื้อเลปโตสไปราในระยะที่มีเชื้อในกระแสโลหิต (leptospiremia phase) สามารถตรวจหาได้จากเลือด น้ำไขสันหลัง น้ำในช่องม่านตา น้ำนม และเนื้อเยื่อจากอวัยวะภายในร่างกาย หลังจากติดเชื้อประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา(immune phase) ในระยะนี้เชื้อเลปโตสไปราจะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของ

ร่างกายยกเว้นในบริเวณท่อไตส่วนต้นทำให้เชื้อส่วนหนึ่งจะอยู่ในท่อไตส่วนต้นและเชื้อจะถูกขับออกมากับปัสสาวะเป็นครั้งคราวหรือต่อเนื่องกัน ซึ่งจำนวนและระยะเวลาที่เชื้อถูกขับออกมามากน้อยเพียงใดจะสัมพันธ์กับชนิดสัตว์และชนิดของเชื้อ จากกระบวนการขับเชื้อของร่างกายดังกล่าวจึงทำให้สิ่งแวดล้อมเกิดการปนเปื้อนและการสะสมของเชื้อ ซึ่งเป็นแหล่งที่จะทำให้เชื้อแพร่สู่สัตว์อื่นๆ และคนต่อไปได้

สำหรับผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสอาจมีอาการดังนี้ ไข้สูง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง โดยเฉพาะบริเวณขาและน่อง ตาแดง (หลอดเลือดแดงแผ่ซ่านเป็นตาข่าย) ไอแห้งๆ หรือไอมีเสมหะปนเลือด บางรายอาจมีอาการทางระบบประสาท เช่น ปวดศีรษะชนิดรุนแรง คอแข็ง การรับรู้และสติเปลี่ยนแปลง เป็นต้น ในรายที่มีอาการรุนแรงอาจมีไตวาย ปัสสาวะออกน้อยหรือไม่ออก การหายใจล้มเหลว อาจมีภาวะ Refractory hypoxemia อาการดีซ่าน (สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข, 2546) เนื่องจากอาการของโรคเลปโตสไปโรสิสคือมีไข้ จึงทำให้มีอาการคล้ายคลึงกับอาการของโรคติดเชื้ออื่นๆ เช่น โรคเมลิออยโดสิส สครับไทฟัส ไข้เลือดออกชนิดเดงกี หรือไข้ไทฟอยด์ เป็นต้น (วราลักษณ์, 2544) ทำให้การจำแนกโรคนี้จากโรคอื่นได้ยาก หากไม่มีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมายืนยัน

สำหรับอาการที่พบในสัตว์ เชื้อเลปโตสไปราก่อให้เกิดโรคในสัตว์ได้หลายชนิด และในแต่ละซีโรวาร์ของเชื้อก็ก่อให้เกิดลักษณะอาการของโรคในสัตว์แตกต่างกันออกไป การเกิดโรคในสัตว์ไม่มีลักษณะอาการจำเพาะที่จะสามารถแยกจากโรคอื่นได้ เช่น โรคพยาธิในเม็ดเลือดบาบีเซีย หรืออนาพลาสโมซิส (ธรรมวรรณ, 2545) อาการที่พบได้ทั่วไปในสัตว์ ได้แก่ มีไข้สูง ซึม เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ เยื่อบุตาขาวอักเสบ ภาวะดีซ่าน เป็นต้น ซึ่งอาการเหล่านี้จะรุนแรงหรือไม่รุนแรงขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ การเกิดโรคในสัตว์นี้จะทำให้เกิดความเสียหายอย่างมาก โดยเฉพาะในปศุสัตว์ และเนื่องจากอาการการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์ก็ไม่เด่นชัดเช่นเดียวกับในคน การจำแนกโรคนี้ออกจากโรคอื่นๆ จึงมีความจำเป็นอย่างสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 การศึกษาทางจุลสัณฐานวิทยา

เชื้อเลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดสไปโรขีตที่ต้องอาศัยออกซิเจน มีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นเกลียวบางยาว 6 - 20 ไมโครเมตร กว้าง 0.1 ไมโครเมตร มีปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างงอเป็นตะขอ (hook) แต่อาจพบเชื้อเป็นเส้นตรง ซึ่งมักจะหมุนหรือเคลื่อนไหวได้ช้ากว่า เชื้อมีเยื่อหุ้ม (membrane) 3 - 5 ชั้นและมีสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) และโปรตีนหลายชนิดเป็นส่วนประกอบของผนังชั้นนอกซึ่งเป็นแอนติเจนสำคัญที่นำมาใช้ในการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรคนี้ เชื้อนี้หากตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (Dark-field microscopy) จะเห็นเป็นเส้นเล็กๆ เคลื่อนไหวรวดเร็วโดยการหมุน หรือการโค้งงอ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) (Faine et al, 1999) จะเห็นลักษณะของตัวเชื้อชัดเจน (ภาพที่ 1)และทำให้เห็นโครงสร้างภายในของเชื้อเลปโตสไปรา

ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ Australis 12,000 เท่า

การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทำให้แยกเชื้อเลปโตสไปราออกจากสไปโรขีตชนิดอื่นๆได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปลักษณะของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคและไม่ก่อให้เกิดโรคได้

เชื้อเลปโตสไปรามีส่วนประกอบของโครงสร้างดังนี้ (ภาพที่2)

1. ผนังส่วนนอก (Outer envelope; OE) ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน และไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีองค์ประกอบที่สำคัญคือไลโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นส่วนสำคัญของแอนติเจนที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจจำแนกเชื้อออกเป็น ซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ต่างๆ

2. เปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan Complex) เป็นส่วนถัดจากเปลือกนอกเข้าไป จะเป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นท่อแบนๆ ประกอบขึ้นจากเส้นใยขนาดเล็กมาก ซึ่งเส้นใยขนาดเล็กเหล่านี้

ประกอบขึ้นมาจากสารไกลโคโปรตีน ขนาดน้ำหนักโมเลกลุ 72 กิโลดัลตัน (kDa) เป็นส่วนโครงสร้างหลักของเชื้อ

3. เยื่อหุ้มชั้นใน (Cytoplasmic membrane) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 76, 62 และ 45 kDa (Hygia et al., 2001)

4. แฟลกเจลลา (Flagella) เชื้อเลปโตสไปรามีแฟลกเจลลา 2 อัน อยู่ที่ปลายของแต่ละด้าน โครงสร้างของแฟลกเจลลาทั่วไปคล้ายกับแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ประกอบด้วยแกนกลาง ซึ่งเป็นสารโปรตีนที่เรียงตัวเป็นแนวตรงหรือแบบขดลวด โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลามีน้ำหนักโมเลกุล 35 kDa (Biswas et. al., 2005) และเนื่องจากเชื้อเลปโตสไปรามีแฟลกเจลลา 2 อัน ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่ทำให้สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราจาก Spirochaete ชนิดอื่นๆ ที่มีแฟลกเจลลา 4 อัน เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

5. ส่วนประกอบภายในเซลล์ (Cell Contents) ประกอบด้วยสารคล้ายเส้นใย นิวเคลียส ไมโตรครอนเดีย และออร์แกนเนล ต่างๆ

ภาพที่ 2 โครงสร้างของเชื้อเลปโตสไปรา (ดัดแปลงจาก ดวงใจ สุวรรณเจริญ, 2544)

2.3 การจัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อเลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียซึ่งมีการจัดกลุ่ม (Taxonomy) อยู่ใน ชั้น (Class) : Schizomycetes ตระกูล (Order) : Spirochaetales วงศ์ (Family) : Spirochaetales สกุล (Genus) : *Leptospira* การจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราประกอบด้วยการแบ่งกลุ่มด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

2.3.1 การแบ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคและไม่ก่อให้เกิดโรค

การทดสอบทางเคมี (biochemical tests) เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกกลุ่มเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค *(L.interrogans)*และเชื้อไม่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์*(L. biflexa*) การทดสอบมีหลายวิธีคือ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส กลุ่มเชื้อไม่ก่อโรคจะเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (Faine et al, 1999 ;Ratnam, 1994)
2. Oxidase test ถ้าเป็นเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อให้เกิดโรคจากผลการทดสอบจะเปลี่ยนสี indicator เป็นสีน้ำตาลออกแดง (pale reddish brown) ในขณะที่เชื้อเลปโตสไปราที่ไม่ก่อโรคจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ (dark brown or blackish brown Colour) (Ratnam, 1994)
3. Egg yolk reaction เชื้อเลปโตสไปราที่ไม่ก่อให้เกิดโรค จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเน่าเสียของอาหาร (rapid decomposition) ภายในวันที่ 2 - 3 ซึ่งจะรวดเร็วกว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อการเน่าเสียในวันที่ 3 - 12 หรือไม่เกิดการเน่าเสียเลย (Ratnam, 1994)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 8-azaquanine สำหรับกลุ่มเชื้อไม่ก่อโรคจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารชนิดนี้ (Faine et al, 1999 ; Ratnam, 1994)

2.3.2 การแบ่งทางซีรัมวิทยา (Serological Classification)

เลปโตสไปราสามารถจัดจำแนกทางซีรัมวิทยา (Dikken and Kmety 1978) ในปัจจุบัน *L. biflexa* ซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปรา ที่อาศัยอย่างอิสระ ในสภาพแวดล้อม พบทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล เชื้อในกลุ่มนี้สามารถจัดจำแนกได้มากกว่า 60 ซีโรวาร์ ส่วนเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์คือ *L.interrogans* จัดจำแนกเป็น 24 ซีโรกรุ๊ป ซึ่งแบ่งย่อยเป็นซีโรวาร์ได้อีกมากกว่า 200 ชนิด (Levett, 2001) (ตารางที่1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1 แสดงการจำแนกซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรค

Serogroup	Serovar
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

ที่มา : Paul N. Levett.., 2001

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3 การแบ่งทางยีโนทัยป์ (Genotyping Classification)

การจัดแบ่งเลปโตสไปราโดยอาศัยความสัมพันธ์ของสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค DNA hybridization ทำให้จัดแบ่งเชื้อชนิดนี้ออกเป็นกลุ่มที่แตกต่างจากการแบ่งทางซีรัมวิทยา โดยพวกที่ก่อให้เกิดโรคและไม่ก่อให้เกิดโรคอาจจัดอยู่ในสปีชีส์ เดียวกัน และพบว่าซีโรวาร์ที่แตกต่างกันทางซีรัมวิทยา เมื่อศึกษาทางยีโนทัยป์อาจไม่พบความแตกต่างของจีโนมสปีชีส์ได้ ปัจจุบันการจำแนกเชื้อโดยวิธีนี้พบว่า เชื้อในสกุลนี้มี 17 จีโนมสปีชีส์ (genospecies) (Levett, 2001) ดังตารางที่ 2 และ3

ตารางที่ 2 แสดงสปีชีส์ของของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค

Pathogenic	Non-pathogenic	of unknown
L. interrogans	*L. parva*	*Genomospecie 1*
L. noguchii	*L. wolbachii*	*Genomospecie 3*
L. santarosai	*L. biflexa*	*Genomospecie 4*
L. borgpetersenii		*Genomospecie 5*
L. kirschneri		
L. weilii		
L. inadai		
L. meyeri		
L. alexanderi		
L.fainei		

ที่มา : Paul N. Levett.., 2001

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงจีโนมสปีชีส์และซีโรกรุ๊ปของเชื้อเลปโตสไปรา

Species	Serogroups
L. interrogans	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
L. noguchii	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djusiman, Pomona
L. santarosai	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
L. meyeri	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini, Javanica
L. wolbachii	Codice
L. biflexa	Semaraga, Andamana
L. fainei	Hurstbridge
L. borgpetersenii	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
L. kirachneri	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
L. weilii	Cellidoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe

ที่มา : Paul N. Levett.., 2001

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 การเก็บตัวอย่างเพื่อการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากต้องปฏิบัติให้ถูกวิธี ต้องคำนึงถึงวิธีการตรวจวิเคราะห์ ชนิดของตัวอย่าง การปนเปื้อนและช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย การนำส่งต้องคำนึงถึงความปลอดภัย อุณหภูมิที่เหมาะสม และต้องส่งให้ถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็ว การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสสามารถจำแนกออกได้ดังนี้

2.4.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อเพาะเชื้อ ตัวอย่างที่สามารถเก็บเพื่อเพาะเชื้อมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีวิธีการเก็บเฉพาะที่แตกต่างกัน หลักเกณฑ์ดังนี้ (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พลูสุขสมบัติ, 2544)

ก. ตัวอย่างเลือดและน้ำไขสันหลัง ควรเก็บก่อนให้ยาปฏิชีวนะ และควรเก็บภายใน 10 วัน วันหลังสัตว์หรือคนเริ่มแสดงอาการ หลังจากเก็บตัวอย่างควรนำมาเพาะแยกเชื้อทันทีเพื่อเพิ่มโอกาศในการแยกเชื้อจากตัวอย่างให้สูงที่สุด ถ้าหากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ทันที ควรเก็บเลือด 5 มิลลิลิตร ใน 1% โซเดียมออกซาเลต (Sodium oxalate) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด ควรหลีกเลี่ยงการใช้หลอดเก็บเลือดที่มีสารละลายซิเตรทเพราะพบว่าซิเตรทเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ควรเก็บไว้ในอุณหภูมิห้องไม่เย็นจัดหรือร้อนจัดเกินไป และควรจะรีบนำส่งทางห้องปฏิบัติการเพื่อนำมาเพาะแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง และไม่ควรเก็บเลือดนานเกินกว่า 1 สัปดาห์

ข. ตัวอย่างปัสสาวะ ควรเก็บหลังจากสัตว์หรือคนไม่ได้แสดงอาการป่วยมามากกว่า 1 สัปดาห์ และควรเก็บปัสสาวะจากช่วงกลาง (Midstream) ของการขับถ่าย จากนั้นนำมาเพาะแยกเชื้อทันที การเก็บปัสสาวะต้องระมัดระวังอย่างมากเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจึงจะมีโอกาสเพาะแยกเชื้อได้ ถ้าหากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ทันที ควรเจือจางน้ำปัสสาวะในสารละลาย PBS ที่มี pH อยู่ระหว่าง 7.2-7.8 เนื่องจากเลปโตสไปรามีชีวิตอยู่ได้ไม่นานในปัสสาวะที่มีสภาพเป็นกรด

ค. ตัวอย่างจากผู้เสียชีวิต สามารถเพาะแยกเชื้อได้จากเนื้อเยื่ออวัยวะจากตับ ไต และสมอง ควรเก็บตัวอย่างทันทีและเพาะแยกเชื้อภายใน 4 ชั่วโมง

ง. ตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำในพื้นที่ระบาด ควรเก็บตัวอย่างในภาชนะปราศจากเชื้อ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องและส่งเพาะแยกเชื้อภายใน 72 ชั่วโมง

2.4.2 การเก็บซีรัมเพื่อส่งตรวจแอนติบอดี มีหลักเกณฑ์ดังนี้

ควรเจาะเก็บเลือดผู้ป่วยที่สงสัยว่าติดเชื้อเลปโตสไปโรซิส 2 ครั้ง โดยเก็บครั้งแรกและครั้งที่สองห่างกัน 1 สัปดาห์ ปั่นแยกซีรัมทันทีเพื่อป้องกันเม็ดเลือดแดงแตก ใส่ในหลอดซีรัม ติดฉลากที่มี

รายละเอียดครบถ้วน จัดส่งห้องปฏิบัติการทันที ถ้าหากไม่สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการได้ทันที ควรเก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ แบ่งได้เป็น 3 วิธี คือ

2.5.1 การตรวจหาเชื้อหรือแอนติเจน

เป็นการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปรา จากสิ่งส่งตรวจสามารถดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด หรือกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา หลังจากการย้อมด้วยสี Gimsa staining ,Fontana's method of staining smears, Immunoperoxidase staining เป็นต้น(Ratnam, 1994) การแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อกับสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ โดยเฉพาะตัวอย่างปัสสาวะทำได้ยากจึงต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์และความชำนาญเป็นพิเศษ (Boonyod and Chirathaworn, 2002)

2.5.2. การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา

ในประเทศไทยนั้นยังอาศัยการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นหลัก การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาเป็นการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย องค์การอนามัยโลกกำหนดวิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold Standard) สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส หลักการของ MAT คือ การเกิดปฏิกิริยา Agglutination ของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานกับซีรัมของผู้ป่วยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ผลบวกเกิดจากการเกาะกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งจะมีลักษณะเป็น lysis ball หรือ star (การตรวจทุกครั้งควรทำ Positive และ Negative control ด้วยทุกครั้ง) ในประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่ระบาดการตัดสินว่าคนไข้ติดเชื้อเลปโตสไปราหรือไม่ให้ดูจากผลบวกของ MATที่ ไตเตอร์ 1:400 ขึ้นไป (Chaifoo, 1997)

นอกจากนั้นยังมีชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อใช้สำหรับตรวจคัดกรองเบื้องต้น เช่น Enzyme linked immunosorbent assay (Mulla S. et al, 2006) ,Indirect immunofluorescent antibody Technique (Petchclai B., et al. 1992) และ Latex Agglutination test (Pimjai N. et al,2001) เป็นต้น

2.5.3 การตรวจทางชีวโมเลกุล

การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่าง เลือด ปัสสาวะ และน้ำไขสันหลังโดยตรง สามารถทำได้หลายวิธีเช่น polymerase chain reaction (PCR) (อลงกรณ์, 2543) , Multiplex polymerase chain reaction (Kositanont et.al , 2005) การตรวจทางชีวโมเลกุลนี้ใช้ในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในระยะ 2-3 วันแรกของการรับเชื้อ

2.6 การจำแนกเชื้อเลปโตไปรา ทำได้หลายวิธีดังนี้

2.6.1 การจำแนกเชื้อโดยการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา (Isolation of Leptospires)

การเพาะเชื้อเลปโตสไปราจากสิ่งส่งตรวจ สำหรับ เลือดจะสามารถแยกเชื้อได้ในระยะที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด สำหรับตัวอย่างปัสสาวะ ควรเก็บหลังจากสัตว์หรือคนไม่ได้แสดงอาการป่วยมามากกว่า 1 สัปดาห์ ควรทำทันทีโดยปั่นปัสสาวะแล้วละลายตะกอนด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) เป็นต้น (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พลูสุขสมบัติ, 2544) จากนั้นนำตัวอย่างใส่ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมี 5-fluorouracil เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปราสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ในอาหารชนิดนี้ และเป็นการยับยั้งไม่ให้แบคทีเรียตัวอื่นเจริญเติบโตได้ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ทุกสัปดาห์ เมื่อแยกได้แล้วจึงทำการแยกซีโรวาร์และซีโรกรุ๊ป ด้วยวิธีการต่างๆ

2.6.2 การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราทางน้ำเหลืองวิทยา (Serological Classification)

ก. การจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี MAT

MAT หลักการคือ การนำเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยมาทำปฏิกิริยา Agglutination กับ hyperimmune rabbit antisera มาตรฐาน ผลบวกคือการเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีนี้มีข้อจำกัดคือต้องใช้ rabbit hyperimmune antisera มาตรฐาน จำนวนหลายซีโรวาร์เพื่อให้ครอบคลุมสำหรับการจำแนกเชื้อ และในบางตัวอย่างแปลผลยากเนื่องจากให้ผลบวกมากกว่า 1 ซีโรวาร์ (Boonyod and Chirathaworn, 2002) นอกจากนี้ยังต้องการผู้ที่มีประสบการณ์และความชำนาญเป็นพิเศษในการจำแนกตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย

ข. การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Cross Agglutinin Absorption Test (CAAT)

CAAT หลักการคือ การนำเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย ทำปฏิกิริยาปฏิกิริยา Agglutination กับ rabbit hyperimmune antisera มาตรฐาน ปั่นเก็บส่วนน้ำใส (absorped serum) มาทดสอบการตกตะกอนอีกครั้ง กับ homologous และ heterologous antigen (Ratnam, 1994) ซึ่งวิธี CAAT มีข้อดีกว่าวิธี MAT คือสามารถลดการเกิดเกิดปฏิกิริยาการข้ามเกี่ยว (Cross reaction) ในซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ (Faine et.al, 1999) และมีความจำเพาะสูงกว่า แต่วิธีนี้มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากกว่ามากวิธี MAT นอกจากนี้ยังต้องการผู้ที่มีประสบการณ์และความชำนาญเป็นพิเศษและไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีนี้ต้องใช้ rabbit hyperimmune antisera ที่จำเพาะจำนวนหลายซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ เพื่อให้ครอบคลุมและมีความถูกต้องมากขึ้น

ค.การจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี Immunoblotting

หลักการคือ Immunoblotting จะศึกษาถึงคุณสมบัติโปรตีนของแอนติเจนโดยใช้หลักการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะได้โครงสร้างของโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อ จากนั้นนำโปรตีนหรือแอนติเจนผ่านลงสู่แผ่นกระดาษจำเพาะที่มีคุณสมบัติดูดซึมโปรตีนได้ดี นำแอนติบอดีที่ต้องการศึกษามาเกาะกับแอนติเจน และติดฉลากเพื่อตรวจหาปริมาณของแอนติบอดี ความแตกต่างของแอนติเจน และรูปแบบของปฏิกิริยา วิธีนี้เป็นวิธีการหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา (Doungchawee et.al., 2005)

Immunoblotting มีขั้นตอนที่สำคัญ คือ

- SDS-PAGE
- การ blotting

SDS-PAGE คือ การจำแนกชนิดของแอนติเจนหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า หลักการคือโปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ถูกแยกเป็นชิ้นเปปไทด์ด้วย solubizing agent เช่น SDS, urea หรือ Mercaptoethanol จะถูกแยกตามขนาดบน Acrylamide gel (SDS-PAGE) (Laemmli (1970) และ Ochiai et al., 1997) จึงมีการนำวิธีนี้มาใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรา

การ blotting คือ หลังจากทำ SDS-PAGE เรียบร้อยจึงนำโปรตีนที่สนใจผ่านลงสู่แผ่นกระดาษจำเพาะ นำแอนติบอดีที่ต้องการศึกษามาเกาะกับแอนติเจน และติดฉลากเพื่อตรวจหาปริมาณของแอนติบอดี

Biswas และคณะ (2005) ทำการศึกษา Whole cell ของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า Major Protein ที่ตำแหน่ง 67, 65, 45, 43, 35, 32 และ18 kDa เมื่อทำการ blotting ด้วย rabbit hyperimmune antisera พบว่ามีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ตำแหน่ง 67,65,60, 45, 43, 41และ32 kDa ตำแหน่งที่ 32 เป็นตำแหน่งหลักที่พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

Hygia และคณะ (2001) จากการศึกษาด้วยวิธี Immunoblotting พบว่าตำแหน่งที่ 82, 58,48 และ 44 kDaเป็น ตำแน่งของ Inner membrane ; ตำแหน่ง76,62 และ 45 kDa เป็นตำแหน่งของ Cytoplasm; ตำแหน่ง37และ 25 kDa เป็นตำแหน่งของ Periplasm ; ตำแหน่ง32และ 31 kDa เป็นตำแหน่งของ Outer membrane

Niwetpathomwat และ Doungchawee (2006) ใช้วิธี Immunoblotting โดย การผสมเชื้อมาตรฐาน 10 ซีโรวาร์ ทำการ blotting ด้วย rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ต่างๆ ผลพบการตำแหน่ง 15-20 ,23-24,41 และ 45 kDa

Doungchawee และคณะ (2005) ศึกษาการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblotting กับ rabbit hyperimmune antisera ผลพบว่าเกิด Smearlike band (ตำแหน่ง 20-30

kDa) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้บ่งบอกซีโรวาร์ของเลปโตสไปรา และจากการศึกษายืนยันตำแหน่งนี้กับโมโนโคนัลแอนติบอดี พบว่าเดียวกันกับ Smearlike band สามารถยืนยันซีโรวาร์

การตรวจวินิจฉัยเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblotting เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้จำแนกซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปรา (Doungchawee et.al., 2005) ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือเมื่อได้รูปแบบของปฏิกิริยาของโปรตีนที่จำเพาะต่อ rabbit hyperimmune antisera ทำให้ทราบว่าเป็นซีโรวาร์อะไร และสามารถเก็บผลการทดลองในรูปแบบปฏิกิริยาบนแผ่นตรวจไว้ได้นาน ข้อดีของวิธี Immunoblotting คือการเตรียมเชื้อที่จะต้องใช้แอนติเจนได้ง่ายกว่าและเตรียมเก็บไว้ได้ล่วงหน้า สามารถเตรียมใช้จากเชื้อที่ไม่มีชีวิต จึงลดขั้นตอนยุ่งยากและภาระการเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องยาวนาน (Subculture) และตัดปัญหาการสลับสายพันธุ์ที่มักเกิดขึ้นกับการเลี้ยงเชื้อพร้อมๆกันหลายๆสายพันธุ์ และเตรียมให้เพียงพอสำหรับการทดสอบพร้อมกันได้ในคราวเดียวกัน

2.6 ปัญหาจำแนกเชื้อเลปโตสไปราในประเทศไทย

รายงานการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส เริ่มตั้งแต่ พ.ศ. 2539 การระบาดเกิดในช่วงฤดูฝน ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคมของทุกปี ปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคยังมีอยู่อย่างต่อเนื่องส่วนใหญ่มักจะอยู่ในจังหวัดต่างๆทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่จังหวัดอุดรธานี บุรีรัมย์ สุรินทร์ ชัยภูมิ มหาสารคาม นครราชสีมา ขอนแก่น เลย กาฬสินธุ์ และร้อยเอ็ด (สาธารณสุข, 2547) เชื้อเลปโตสไปราที่พบระบาดในช่วงปี พ.ศ. 2545-2548 มีหลายซีโรกรุ๊ป ต่างๆ ดังนี้ เช่น Australis (28.7%), Sejroe (17.7%), Shermani (8.5%), Panama (7.9%), Javanica (6.7%), Cynopteri (5.5%), Mini (5.5%), Bataviae (3%), Grippotyphosa (3%) และลำดับสุดท้าย Autumnalis (2.0%) (วิมล, 2549) ส่วนโรคเลปโตสไปโรสิส ที่มีรายงานในพื้นที่ 5 จังหวัด ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าโคเนื้อมีอัตราการติดเชื้อ 74.5 % กระบือมีอัตราการติดเชื้อ 81.8% และสุกรมีอัตราการติดเชื้อ 61.3% โคและกระบือส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อเชื้อซีโรวาร์ Sarmin, Ranarum, Sejroe และ Ballum สุกรพบการติดเชื้อซีโรวาร์ Sarmin, Ranarum, Australis และ Pomona ซึ่งในสุกรพบการติดเชื้อคล้ายคลึงกับโคและกระบือ (ดวงใจ และคณะ ,2000) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสที่ตรวจโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่ามีซีโรวาร์ Sejroe และ Australis เหมือนกัน

Khusum และคณะ (2005) เพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างส่งตรวจที่ได้จากผู้ป่วยจังหวัดสุรินทร์ จำนวน 22 ตัวอย่าง และทำการทดสอบวิธี MAT พบว่ามีซีโรวาร์ Autumnalis ที่ระดับ

ไตเตอร์สูงสุด และเกิดปฏิกิริยาข้ามเกี่ยวกับซีโรวาร์ Djasiman นอกจากนั้น ดวงพร และคณะ (2543) ได้ส่งเชื้อที่เพาะได้จากหนูในประเทศไทย ไปตรวจที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงเลปโตสไปโรสิส ประเทศออสเตรเลีย (WHO/FAO Leptospirosis Reference Laboratory, Brisbane, Australia) พบว่าเป็นซีโรวาร์ Australis, Autumnalis, Bataviae, Javanica , Pyrogenes และ Sejroe ซึ่งการค้นพบนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการเตรียมแอนติเจน เพื่อให้ครอบคลุมการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย นอกจากนี้การจำแนกชนิดซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้ เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมากทางระบาดวิทยาและการตรวจคัดกรองโรคโดยข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำมาใช้ในแง่การคัดเลือกสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการตรวจเพื่อให้ครอบคลุมเชื้อที่มีการระบาดในประเทศ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดย WHO สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในห้องปฏิบัติการ ซึ่งการตรวจวิธีนี้สามารถบอกให้ทราบเป็นซีโรวาร์ แต่มักเกิดปฏิกิริยาการข้ามเกี่ยว(Cross reaction) ในซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์(Faine et.al, 1999) นอกจากนั้นยังมีข้อจำกัดหลายประการ คือเครื่องมือ ได้แก่กล้องจุลทรรศน์พื้นมืดมีราคาแพง (พิมพ์ใจ และดวงพร, 2544) ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญและสามารถทำตรวจได้ในบางห้องปฏิบัติการ (พิมพ์ใจ และดวงพร, 2544) เชื้อเลปโตสไปราที่ใช้ทดสอบมีจำนวนมาก และต้องเป็นเชื้อมีชีวิตและอันตราย การเพาะเลี้ยงและการควบคุมคุณภาพของเชื้อทำได้ยากมาก (Faine et.al, 1999) วิธี MATเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงแต่ความไวต่ำ เมื่อทำการตรวจด้วยวิธีนี้จึงต้องตรวจด้วย ซีรัม 2 ครั้งและห่างกันประมาณ 5-7 วัน (พิมพ์ใจ และดวงพร, 2544) เพื่อเพิ่มความไวขึ้น ถ้าเกิดการระบาดการตรวจด้วยวิธีนี้อาจใช้เวลานานกว่าจะทราบผล (Brendan Flannery et al.,2001) การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี CAAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานอีกวิธีหนึ่ง เพื่อจำแนกซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธี MATคือ สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาการข้ามเกี่ยว(Cross reaction) ในซีโรกรุ๊ปและระหว่างซีโรวาร์ได้(Faine et.al, 1999) แต่วิธีนี้ต้องใช้ Rabbit hyperimmune antisera ที่จำเพาะจำนวนหลายซีโรกรุ๊ปและซีโรวาร์(Vijayachari et.al., 2004) ซึ่งมีราคาแพงมากเพื่อให้ครอบคลุมและมีความถูกต้องมากขึ้น วิธีนี้ก็มีข้อจำกัดหลายประการซึ่งเหมือนกับวิธี MAT ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาวิธี Immunoblotting เพื่อการจำแนกเชื้อที่เพาะได้จากผู้ป่วย ซึ่งวิธีนี้จะช่วยลดขั้นตอนทียุงยากของการเตรียมเชื้อเลปโตสไปราและใช้เวลาไม่ในการศึกษา สามารถเก็บผลที่ได้นี้ไว้เปรียบเทียบกับผลการทดสอบที่จะเกิดขึ้นในอนาคตต่อไปได้ เพื่อดูรูปแบบที่เปลี่ยนไปของปฏิกิริยาได้และทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเชื้อเกิดขึ้นหรือไม่ ซึ่งวิธี Immunoblotting มีประโยชน์อย่างมากทางด้านระบาดวิทยา

การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะได้จากผู้ป่วยนั้น จะทดสอบด้วยวิธี MATและยืนยันความถูกต้องอีกครั้งด้วยวิธี CAATเพื่อจำแนกระหว่างซีโรกรุ๊ป/ซีโรวาร์ แต่เนื่องจากทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่

ยุ่งยาก ต้องใช้แอนติบอดีและเชื้อเลปโตสไปราที่มีชีวิตจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเพื่อเปรียบเทียบวิธีการจำแนกเชื้อด้วยวิธี MAT, CAATและ Immunoblotting จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการแยกซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อเป็นพื้นฐานในงานวิจัยและการพัฒนาวัคซีน (vaccine) ต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เนื่องจากต้องการแยกเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสให้ได้มากที่สุดเพื่อที่จะนำมาศึกษาวิจัย จึงเลือกพื้นที่ที่พบว่ามีคนไข้ที่ต้องสงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสมากที่สุด 3 จังหวัด คือ บุรีรัมย์ ขอนแก่น และสุรินทร์

3.1 วิธีการศึกษา

เริ่มต้นเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์ ขอนแก่น และสุรินทร์ ในปี พ.ศ. 2544-2545 เพื่อนำมาแยกเชื้อเลปโตสไปราโดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) เมื่อมีเชื้อเจริญเติบโตขึ้น และมีลักษณะคล้ายสไปโรขีต ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ว่าใช่เชื่อเลปโตสไปราหรือไม่ โดยการศึกษาทางจุลสัณฐานวิทยาซึ่งประกอบไปด้วยการย้อมสีเพื่อดูรูปร่าง และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดเพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อเลปโตสไปรา จากนั้นนำเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้มาตรวจสอบทางชีวเคมีด้วยวิธี Oxidase test และ Egg yolk reaction test เพื่อแยกระหว่างเชื้อที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค หลังจากแยกเชื้อที่ก่อโรคและเชื้อไท่ก่อโรคออกแล้ว จะนำเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคมาศึกษา และเปรียบเทียบการจำแนกอกเป็นซีโรวาร์ต่าง ๆ ด้วยวิธี MAT, CAAT และ Immunoblotting (ภาพที่ 3)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 3 วิธีการดำเนินการศึกษา

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยง และแยกเชื้อเลปโตสไปรามี 3 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดเหลว (liquid media) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อจากผู้ป่วยที่ต้องสงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส, อาหาร EMJH ชนิดกึ่งเหลว (semisolid media) ใช้สำหรับการ maintain เชื้อเมื่อแยกเชื้อได้แล้ว ส่วนอาหาร EMJH ชนิดแข็ง (solid media) และ Gellan gum media ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปโรสิสเพื่อแยกโคโลนีเดี่ยวสำหรับการตรวจสอบขั้นต่อไป (ภาคผนวก ข)

3.1.2 การศึกษาทางจัลสัณฐานวิทยา

3.1.2,1 การศึกษาทางจุลสัณฐานวิทยา ประกิบด้วย 2 วิธี คือ วิธีการย้อมสี ขั้นตอนนี้จะนำเชื้อเลปโตสไปรามา Smear บนพื้นสไลด์แก้ว ทำไป fix ด้วย absolute methanol นาน 3 นาที ย้อมด้วยสี Giemsa stain แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นจะตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อดูลักษณะทั่วไปของเชื้อ

3.1.2.2 วิธีการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด เริ่มจากการหยดเชื้อลงบนสไลด์ จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด จะเห็นรูปร่างของเลปโตสไปราเป็นรูปเกลียว และมีส่วนปลายงอเหมือนตะขอ

3.1.3 การจำแนกเชื้อชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรคโดนวิธีทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อที่ก่อโรค และไม่ก่อโรคครั้งนี้ ประกอบด้วย 2 วิธีหลัก ๆ คือ Oxidase test และ Egg yolk reduction test

3.1.3.1 Oxidase test โดยนำเชื้อเลปโตสไปรามาเพาะเลี้ยงในอาหาร korthof media ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-14 วัน จากนั้นทำ media ที่มีเชื้อมาจำนวน 4 มิลลิลิตร มาเติม 1 % p-phenylenediamine solution จำนวน 3 หยด ทิ้งไว้ 5 นาที ถ้าเป็นเชื่อเลปโตสไปราที่ก่อให้เกิดโรค media จะออกเป็นสีน้ำตาลออกแดง (pale reddish brown) ถ้าเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าที่ไม่ทำให้เกิดโรค media จะมีน้ำตาลดำ (dark brown or blackish brown color) (Fugi and Csoka, 1961)

3.1.3.2 Egg yoke reaction test วิธีนี้ทดสอบโดยนำเชื้อเลปโตสไปรามาเพาะเลี้ยงในอาหาร Korthof media ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 วัน จากนั้นจึงนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Nutrient agar media ที่มีส่วนผสมดังนี้คือ 1 % peptone 2% agar และ 5% egg yolk ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ถ้าเป็นเชื้อเลปโตสไปราที่ไม่ก่อให้เกิดโรคจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจะเน่า

เสีย (rapid decomposition) ภายใน 2-3วัน แต่ถ้าเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เน่าเสียภายใน 3-12 วัน หรือไม่ เน่าเสียเลยจนครบ 4 สัปดาห์

3.1.4 การศึกษาเปรียบเทียบการจำแนกเชื้อออกเป็นซีโรว์ ต่าง ๆ การศึกษาเปรียบเทียบประกอบด้วยการศึกษามี 3 วิธี

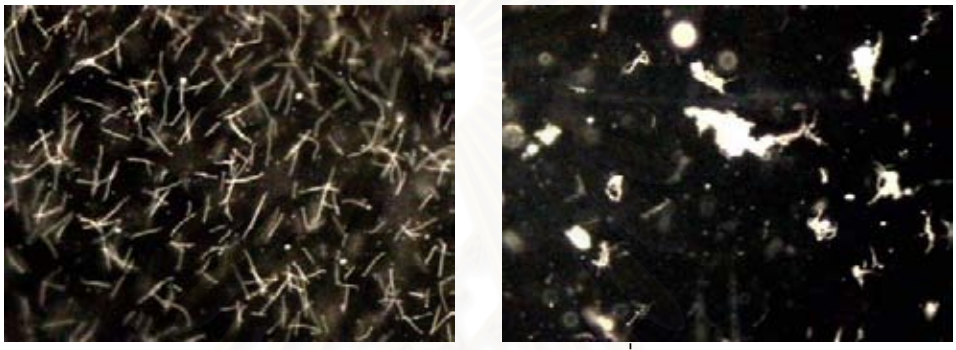
3.1.4.1 Micro Agglutination test (MAT) การศึกษาด้วยวิธี MAT นี้ จะดูปฏิกิริยาการเกิดตะกอน (Agglutination) ของเชื้อตัวอย่างกับ Rabbit hyperimmune serum ภายใต้กล้องจุลทรรศ์พื้นมืด (Faine, et al. 1999) Rabbit hyper immune serum ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย serum มาตรฐานจำนวน 10 ซีโรวาร์ ดังนี้ Bangkinang, Bratislava, Autumnalis, Rachmati , Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Sejroe, Saigon, Australis และ Patoc I (ตารางที่4)

ตารางที่4 รายละเอียด hyperimmune rabbit antisera มาตรฐาน ที่ใช้ในการทดสอบ

Species	Serogroups	Serovars
L.interrogans	Autumnalis	Autumnalis
		Bangkinang
		Rachmati
	Australis	Australis
		Bratislava
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
	Pyrogenes	Pyrogenes
	Louisiana	Saigon
	Sejroe	Sejroe
L.biflaxa	Semarange	Patoc I

เชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานจำนวน 10 ซีโรวาร์ ซึ่งเป็นซีโรวาร์ที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ Bangkinang, Bratislava, Autumnalis, Rachmati, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Sejroe, Saigon, Australis และ Patoc I

เริ่มจากการเจือจาง rabbit hyperimmune antisera ที่นำมาใช้จำนวน 10 ซีโรวาร์ เป็น 2-fold dilution จากนั้นใส่แอนติเจน ซึ่งเป็นตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะได้จากผู้ป่วยที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดเหลว อายุประมาณ 4 - 6 วัน ปรับปริมาณเชื้อ $1X10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร(Faine et.al, 1999) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ห้องนาน 90 นาที อ่านผลการเกาะกลุ่มกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด ผลบวกจะเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มมากกว่าหรือเท่ากับ 50% agglutination (ภาพที่ 4)



ผลลบ กำลังขยาย 300 เท่า ผลบวก ที่กำลังขยาย 300 เท่า

ภาพที่ 4 แสดงผลลบและผลบวกด้วยวิธี MAT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด

3.1.4.2 Cross agglutinin absorption test (CAAT)

การจำแนกชนิดของซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปโรสิส CAAT ตามวิธีของ (Ratnam, 1994; Prapasarakul, 2003)

การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราในอาหาร EMJH ชนิดเหลว อายุประมาณ 4 - 6 วัน บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ปั่นเก็บตะกอนที่10,000 g นาน 25 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เติม Physiological saline เตรียม hyperimmune rabbit antisera ที่ไตเตอร์ 1 : 1000 หลังจากนั้นค่อยๆหยดแอนติเจนลงไปจนเพียงพอเขย่าเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 g นาน 25 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า absorbed serum มาทดสอบ Homologous antigen ด้วยวิธี MAT เริ่มเจือจางซีรัมให้เป็น 2-fold dilution เริ่มตั้งแต่ไตเตอร์ 1 : 100 จนถึง 1 : 25,600 เติมเชื้อเลปโตสไปรา บ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที สังเกตปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

3.1.4.3 Immunoblotting

ศึกษาถึงคุณสมบัติโปรตีนของแอนติเจนโดยใช้หลักการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะได้โครงสร้างของโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อ จากนั้นนำโปรตีนหรือแอนติเจนผ่านลงสู่แผ่นกระดาษจำเพาะที่มีคุณสมบัติดูดซึมโปรตีนได้ดี นำแอนติบอดีที่ต้องการศึกษามาเกาะกับแอนติเจนและติดฉลาก เพื่อตรวจหาปริมาณของแอนติบอดี ความแตกต่างของแอนติเจนและรูปแบบของปฏิกิริยา

การเตรียมแอนติเจน

เชื้อเลปโตสไปรานำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร EMJH ชนิดเหลว อายุประมาณ 7 - 10 วัน ปั่นแยกตะกอนที่ 10,000 g นาน 30 นาที ล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS pH 7.2 ย่อยโปรตีนจากเซลล์ด้วย dye buffer (0.125M Trizma base, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.2% bromphenol blue) เขย่า แล้วนำตัวอย่างไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปปั่นที่เครื่องปั่นความเร็วสูงอีกครั้ง และนำสารละลายส่วนบนไปวิเคราะห์ส่วนของโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Prapasarakul, 2002)

การเตรียมเจลและวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

การเตรียมเจลและวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสด้วยวิธี SDS-PAGE ตามเทคนิคของ Laemmli (1970) และ Ochiai et al, 1997 เจลประกอบด้วย 2 ส่วนคือ [10% separating gel (1.125M Tris-HCL, Acrylaminde-bis 30 : 0.8, Distill water(DW), 10% SDS, 10% Ammonium persulfate (APS), *N*, *N*, *N'*, *N'*-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)] และ 4.5% stacking gel (0.625 Tris-HCL, Acrylamide-bis, DW, 10% APS, TEMED) ใส่ตัวอย่างผ่านตัวกลางที่เป็นเจลในสารละลายอิเลคโตรโฟลิซีส (186 mM glycine, 2.5 mM tris aminomethane, 0.1% SDS) หลังสิ้นสุดวิธีการทำการย้อมโปรตีนด้วย Silver Stain Plus Kit (Bio-rad) ทำ

การคำนวณน้ำหนักของโปรตีนที่สนใจด้วย Vilber Lourmat ประเทศฝรั่งเศส

เทคนิค Blotting

เทคนิค Blotting ถูกนำมาใช้ตามวิธีของ Ochiai, 1998 นำเจลที่ได้มาประกบกับแผ่น nitrocellulose membrane โดยใช้เครื่อง semidry type blotter และผ่านกระแสไฟฟ้า นำแผ่น membrane ที่ได้จุ่มลงในสารละลาย PBS pH 7.2 ที่ผสม Skin mill 5% และ 0.05% Tween20 แช่ที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำ rabbit hyperimmune antisera ที่ไตเตอร์1: 2000 มาทำปฏิกิริยากับแผ่น membrane และทำปฏิกิริยาอีกครั้งด้วย peroxidase-conjugated antibody ที่ไตเตอร์1: 2000 และตรวจสอบรูปแบบของปฏิกิริยาด้วย substrate solution(Diaminobenzidine (DAB)) (Prapasarakul, 2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่ใช้ในงานวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยในจังหวัด บุรีรัมย์ ขอนแก่น และสุรินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545เพื่อทำการเพาะแยกเชื้อ จำนวน 420 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อจากผู้ป่วยได้เป็นจำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง (จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง) เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบทางชีวเคมี ให้ผลบวกด้วยวิธี Oxidase test และ Egg yolk reaction ดังนั้นเชื้อทั้ง15 ตัวอย่าง จึงสามารถจำแนกเป็นเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรค (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การเปรียบผลทดสอบทางชีวเคมี ด้วยวิธีOxidase test และ Egg yolk reaction

No.	Oxidase test	Egg Yolk Reaction
Unknown 1	+	+
Unknown 2	+	+
Unknown 3	+	+
Unknown 4	+	+
Unknown 5	+	+
Unknown 6	+	+
Unknown 7	+	+
Unknown 8	+	+
Unknown 9	+	+
Unknown 10	+	+
Unknown 11	+	+
Unknown 12	+	+
Unknown 13	+	+
Unknown 14	+	+
Unknown 15	+	+
Patoc I(Negative)	-	-
Autumnalis(Positive)	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Microscopic Agglutinationtest (MAT)

การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้ rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานทำการทดสอบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน ด้วยวิธี MATผลการทดสอบพบว่า homologous titer มีค่าสูงที่สุด เช่น เชื้อเลปโตสไปราซีโรวาร์ Autumnalis เมื่อทำปฏิกิริยากับ rabbit hyperimmune antisera ต่อ Autumnalis ให้ระดับไตเตอร์ 1:12,800 เป็นไตเตอร์สูงสุด สูงกว่าเมื่อทำปฏิกิริยากับซีโรวาร์ Bangkinang, Rachmati, Patoc I (ไตเตอร์เท่ากับ 1:1600,1:3200 และ1:3200 ตามลำดับ) และให้ผลลบกับซีโรวาร์ Austalis, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Saigon และSejroe (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจาก rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานกับแอนติเจนมาตรฐานด้วยวิธี MAT

Antigen	Antibody									
	Autumnalis	Bangkinang	Rachmati	Austalis	Bratislava	Icterohae-morrhagiae	Pyrogenes	Saigon	Sejroe	Patoc I
Autumnalis	1:12800	1:1600	1:3200	-	-	-	-	-	-	1:3200
Bangkinang	1:800	1:12800	1:800	1:800	1:1600	1:400	-	-	-	-
Rachmati	1:3200	1:3200	1:12800	-	-	-	-	-	-	-
Australis	1:800	1:800	1:100	1:12800	1:400	1:400	1:400	-	-	-
Bratislava	1:1600	1:800	-	-	1:12800	-	-	1:100	-	-
Icterohae-Morrhagiae	1:800	1:400	1:100	1:100	-	1:3200	1:100	-	-	-
Pyrogenes	1:100	-	-	-	-	1:100	1:6400	-	-	-
Saigon	-	-	-	-	-	-	-	1:6400	-	-
Sejroe	-	-	-	-	-	-	-	-	1:12800	-
Patoc I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:12800

หมายเหตุ

1. แถบเข้มคือ homologous titer
2. ซีโรกรุ๊ป Autumnalis ประกอบด้วยซีโรวาร์ Autumnalis, Bangkinang และ Rachmati

   ซีโรกรุ๊ป Austalis ประกอบด้วยซีโรวาร์ Austalis และ Bratislava

   ซีโรกรุ๊ป Icterohaemorrhagiae ประกอบด้วยซีโรวาร์ Icterohaemorrhagiae

   ซีโรกรุ๊ป Pyrogenes ประกอบด้วยซีโรวาร์ Pyrogenes

   ซีโรกรุ๊ป Saigon ประกอบด้วยซีโรวาร์ Saigon

   ซีโรกรุ๊ป Sejroe ประกอบด้วยซีโรวาร์ Sejroe

   ซีโรกรุ๊ป Patoc I ประกอบด้วยซีโรวาร์ Patoc I

เมื่อนำ rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานมาทำปฏิกิริยากับเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย 15 ตัวอย่าง (unknown 1-15) ผลพบว่า unknown1 ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มโดยให้ระดับไตเตอร์สูงสุดกับซีโรวาร์Autumnalis(1:12800), unknown 2-9 ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ Autumnalis, Bangkinang,และ Rachmati ที่ระดับไตเตอร์สูงสุดใกล้เคียงกัน, unknown 10, 11 และ 12 ให้ระดับไตเตอร์สูงสุดกับ Pyrogenes และunknown 13, 14 และ 15 ให้ระดับไตเตอร์สูงสุดกับ Sejroe (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจาก rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานกับเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยด้วยวิธี MAT

Antigen	Antibody									
	Autumnalis	Bangkinang	Rachmati	Austalis	Bratislava	Icterohae-morrhagiae	Pyrogenes	Saigon	Sejroe	Patoc I
unknown 1	1:12800	1:800	1:3200	-	-	-	-	-	-	-
Unknown 2	1:3200	1:3200	1:800	-	-	-	-	-	-	-
unknown 3	1:12800	1:12800	1:12800	-	-	1:400	-	-	-	-
unknown 4	1:12800	1:12800	1:12800	-	-	-	-	-	-	-
unknown 5	1:12800	1:12800	1:3200	-	-	-	-	-	-	-
unknown 6	1:12800	1:12800	1:12800	-	-	1:100	-	-	-	-
unknown 7	1:12800	1:12800	1:12800	1:100	-	1:400	-	-	-	-
unknown 8	1:12800	1:12800	1:12800	-	1:400	1:1600	-	-	-	-
unknown 9	1:3200	1:800	1:6400	-	-	-	-	-	-	-
unknown 10	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-	-
unknown 11	-	-	-	-	-	-	1:800	-	-	-
unknown 12	-	-	-	-	-	1:100	1:1600	-	-	-
unknown 13	-	-	-	-	-	-	-	-	1:12800	-
unknown 14	-	-	-	-	-	-	-	-	1:1600	-
unknown 15	-	-	-	-	-	-	-	-	1:1600	-

หมายเหตุ

ซีโรกรุ๊ป Autumnalis ประกอบด้วยซีโรวาร์ Autumnalis, Bangkinang และ Rachmati

ซีโรกรุ๊ป Austalis ประกอบด้วยซีโรวาร์ Austalis และ Bratislava

ซีโรกรุ๊ป Icterohaemorrhagiae ประกอบด้วยซีโรวาร์ Icterohaemorrhagiae

ซีโรกรุ๊ป Pyrogenes ประกอบด้วยซีโรวาร์ Pyrogenes

ซีโรกรุ๊ป Saigon ประกอบด้วยซีโรวาร์ Saigon

ซีโรกรุ๊ป Sejroe ประกอบด้วยซีโรวาร์ Sejroe

ซีโรกรุ๊ป Patoc I ประกอบด้วยซีโรวาร์ Patoc I

4.3 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Cross agglutinin-absorption test (CAAT)

จากการจำแนกเชื้อของผู้ป่วยจำนวน 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธี MAT พบว่ามีเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 6 ตัวอย่าง(unknown10-15) ไม่พบปฏิกิริยาการตกตะกอนข้ามกลุ่ม และมีเชื้อจากผู้ป่วยจำนวน 9 ตัวอย่าง (unknown1 -9) ที่ให้ปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับ Autumnalis, Bangkinang,และ Rachmati ที่ระดับไตเตอร์สูงสุดใกล้เคียงกัน จึงนำมาทดสอบด้วยวิธี CAAT เพื่อลดปฏิกิริยาการข้ามเกี่ยวในซีโรกรุ๊ปเดียวกัน

ในขั้นแรกนำ rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานมา absorption กับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน ซีโรวาร์ Autumnalis Bangkinang และ Rachmati จากนั้นนำabsorbed serum ที่ได้มาทำการทดสอบกับเชื้อมาตรฐานอีกครั้ง พบว่าhomologous titer ของ absorbed serum ไม่สามารถตรวจวัดได้(ไม่พบปฏิกิริยาตกตะกอน) แต่ heterologous titer ของ absorbed serum ยังสามารถพบได้ เช่นhomologous titer ของซีรัมที่ absorbed ด้วยเชื้อ Autumnalis เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาตกตะกอนกับเชื้อ Autumnalis อีกครั้ง จะไม่พบปฏิกิริยาตกตะกอน แต่เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาเชื้อซีโรวาร์ Bangkinang และ Rachmati ได้ไตเตอร์ 1:100 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แสดงผลการ absorption ระหว่าง rabbit hyperimmune antisera ซีมาตรฐานและเชื้อมาตรฐาน ด้วยวิธี CAAT

Antibody	Absorption antigens	Antigens		
		Autumnalis	Bangkinang	Rachmati
Autumnalis	Non-absorped	12800	1600	3200
	Autumnalis	-	100	100
	Bangkinang	-	-	100
	Rachmati	-	-	-
Bangkinang	Non-absorped	800	12800	800
	Autumnalis	-	-	-
	Bangkinang	-	-	100
	Rachmati	100	100	-
Rachmati	Non-absorped	3200	3200	12800
	Autumnalis	-	-	-
	Bangkinang	-	100	-
	Rachmati	-	-	-

หมายเหตุ - คือ Absorption reaction titer น้อยกว่า 1:50

เมื่อทำการทดสอบย้อนกับโดยใช้ rabbit hyperimmune antisera ต่อซีโรวาร์ Autumnalis มาทำการabsorped ด้วยเชื้อมาตรฐานซีโรวาร์ Bangkinang และ Rachmati และ นำ rabbit hyperimmune antisera ต่อซีโรวาร์ Bangkinang และ Rachmati มาทำการabsorped ด้วยเชื้อมาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis เพื่อยืนยันว่าถ้าไม่พบการตกตะกอนจะเป็นเชื้อซีโรวาร์ Autumnalis ก่อนที่จะนำมาตกตะกอนกับเชื้อผู้ป่วยจำนวน 9 ตัวอย่าง (unknown 1-9) พบว่า เชื้อผู้ป่วยจำนวน 8 ตัวอย่าง (unknown 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ9) เกิดปฏิกิริยากับ rabbit hyperimmune antisera ต่อซีโรวาร์ Autumnalis ซึ่งabsorped ด้วยเชื้อมาตรฐานซีโรวาร์ Bangkinang และเชื้อ 1 ตัวอย่าง(unknown 8) เกิดปฏิกิริยากับ rabbit hyperimmune antisera ต่อซีโรวาร์ Autumnalis ซึ่ง absorped ด้วยเชื้อมาตรฐานซีโรวาร์ Rachmati ดังนั้นสรุปได้ว่าเชื้อจากผู้ป่วยทั้ง 9 ตัวอย่าง เป็นเชื้อ Autumnalis (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบระหว่าง rabbit hyperimmune antisera มาตรฐานและเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย ด้วยวิธี CAAT

Antisera to	Absorbed with	Clinical isolates (unknown)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Autumnalis	Bangkinang	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Autumnalis	Rachmati	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bangkinang	Autumnalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rachmati	Autumnalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-

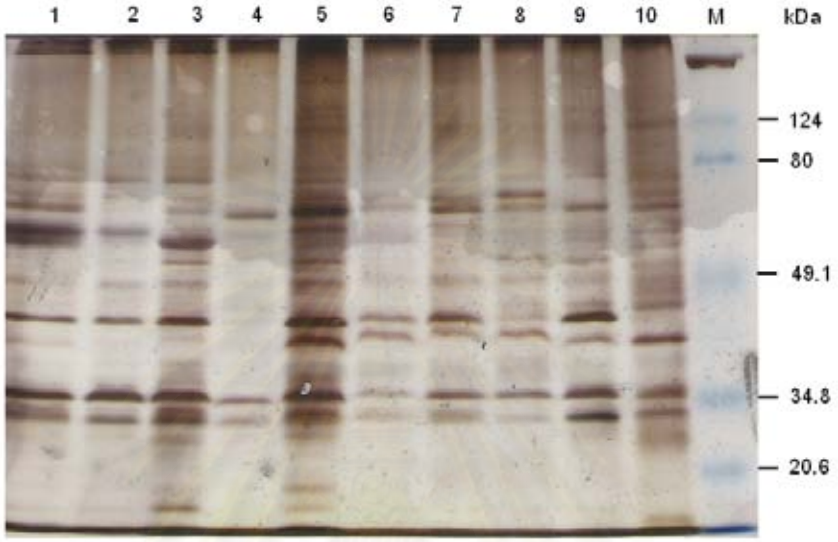
หมายเหตุ - คือ มีไตเตอร์ น้อยกว่า 1:50

\+ คือ มีไตเตอร์ มากกว่าหรือเท่ากับ 1:100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ผลการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี Immunoblotting

จากการศึกษาเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis, Bangkinang, Rachmati, Australis, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Saigon, Sejroe และ Patoc I ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลพบว่ามีลักษณะและรูปแบบของแอนติเจนจำเพาะและแตกต่างกัน (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน โดยวิธี SDS-PAGE lane1, Autumnalis ; lane 2 Bangkinang ; lane 3 Rachmati ; lane 4 ,Sejroe ; lane 5 Pyrogenes ; lane 6, Australis ; lane 7, Bratislava ; lane 8, Icterohaemorrhagiae ; lane 9 ,Saigon และ lane 10, Patoc และ lane M,Standard molecular weight marker

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis, Bangkinang, Rachmati, Australis, Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes, Saigon, Sejroe และ Patoc I (ภาพที่ 5) ด้วย โปรแกรม Vilber Lourmat (ประเทศฝรั่งเศส) พบว่าเชื้อมาตรฐานแต่ละซีโรวาร์มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่จำเพาะและแตกต่างกัน เช่น เชื้อซีโรวาร์ Autumnalis มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่76,72, 67,61, 58,48,44, 42,36 และ 32 kDa แต่ Patoc I มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่ 122,76, 72,67, 58, 52,44,42,36,32 และ28 kDa (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE

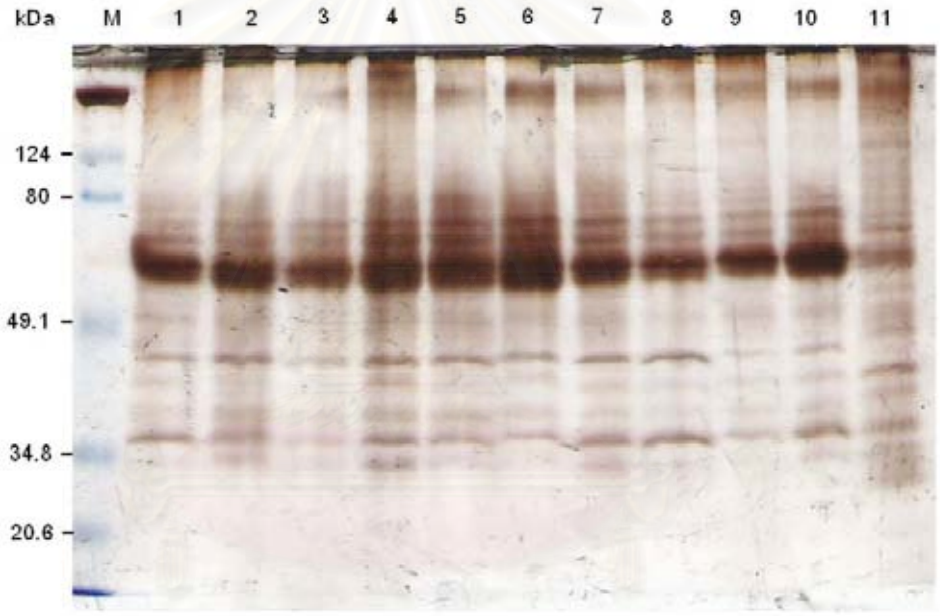
ชนิดเชื้อ	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)														
	122	110	76	72	67	61	58	52	48	44	42	36	32	31	28
Autumnalis	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Bangkinang	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
Rachmati	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sejroe	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Pyrogenes	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Australis	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Bratislava	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Icterohae-morrhagiae	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Saigon	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
Patoc	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

หมายเหตุ + คือ ปรากฏแถบปฏิกิริยา
- คือ ไม่ปรากฏแถบปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยจำนวน15 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบด้วยวิธี SDS-PAGE และวิธี Immunoblotting พบว่าสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่หนึ่งจำนวน 9 ตัวอย่าง (Unknown1-9) มีรูปแบบเหมือนกันกับซีโรวาร์ Autumnalis กลุ่มที่สอง(Unknown10-12)มีรูปแบบเหมือนกันกับซีโรวาร์ Pyrogenes และกลุ่มที่สามจำนวน 3 ตัวอย่าง(Unknown 13-15) มีรูปแบบเหมือนกันกับซีโรวาร์ Sejroe

โดยนำกลุ่มที่หนึ่งมาทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis และ Patoc I ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลพบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 9 ตัวอย่าง มีรูปแบบและลักษณะของแอนติเจนเหมือนกันกับซีโรวาร์ Autumnalis ทั้งหมด และพบว่ามีรูปแบบแอนติเจนไม่เหมือนซีโรวาร์ Patoc I (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วย โดยวิธี SDS-PAGE , lane M,Standard molecular weigth marker ; lane1, Autumnalis ; lane 2-10, Unknown 1-9 และ lane11, Patoc

เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย จำนวน 9 ตัวอย่าง (Unknown1-9) เปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis และ Patoc I (ภาพที่6) ด้วย โปรแกรม Vilber Lourmat (ประเทศฝรั่งเศส) พบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรามีรูปแบบแต่ำแหน่งของน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ Autumnalis เช่น เชื้อซีโรวาร์ Autumnalis และ Unknown1-9 มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่76,72, 67,61, 58,48,44, 42,36 และ32 kDa (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วยเทียบกับซีโรวาร์ Autumnalis โดยวิธี SDS-PAGE

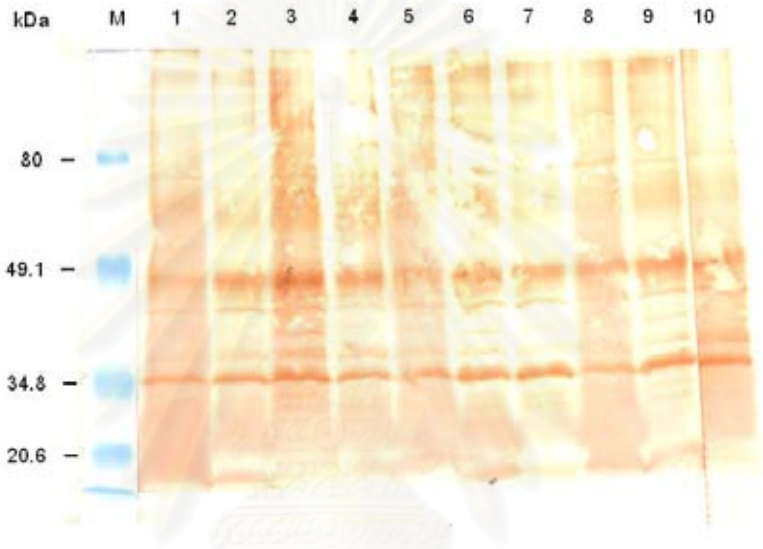
ชนิดเชื้อ	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)														
	122	110	76	72	67	61	58	52	48	44	42	36	32	31	28
Autumnalis	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 7	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 8	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 9	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Patoc	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

หมายเหตุ + คือ ปรากฏแถบปฏิกิริยา

- คือ ไม่ปรากฏแถบปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

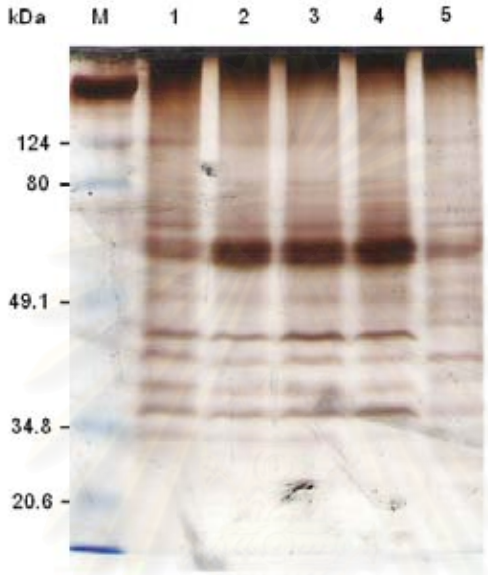
การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้เชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Autumnalis และเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 9 ตัวอย่าง (Unknown 1-9) ทำปฏิกิริยาขั้นต้นกับ rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Autumnalis ผลพบว่า lane 1 ซึ่งเป็น homologous antigen เกิดลักษณะ smearlike band ที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20 – 35 kDa และเข้มกว่า lane อื่น เมื่อดู lane 2 - 10 พบว่ามีรูปแบบของปฏิกิริยาที่คล้ายกันกับ lane 1 (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Autumnalis และตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Immunoblot ; lane M,Standard molecular weight marker ; lane1, Autumnalis ; lane 2-10, Unknown 1-9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่สองจำนวน 3 ตัวอย่าง (Unknown 10-12) ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Pyrogenes และ Patoc I ด้วยวิธี SDS-PAGE ผลพบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 3 ตัวอย่าง มีรูปแบบและลักษณะแอนติเจนเหมือนกันกับซีโรวาร์ Pyrogenes ทั้งหมด และพบว่ามีรูปแบบและลักษณะแอนติเจนไม่เหมือนซีโรวาร์ Patoc I (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วยกับ Pyrogenes โดยวิธี SDS-PAGE lane M,Standard molecular weight marker; lane1 Pyrogenes ; lane 2-4, Unknown 10-12 และ lane 5, Patoc

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย จำนวน 3 ตัวอย่าง (Unknown10-12) เปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Pyrogenes และ Patoc I (ภาพที่ 8) ด้วย โปรแกรม Vilber Lourmat (ประเทศฝรั่งเศส) พบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรามีรูปแบบตำแหน่งของน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกับ Pyrogenes โดยเชื้อซีโรวาร์ Pyrogenes และUnknown10-12 มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่122, 76, 72, 67,61, 58, 48, 44, 42, 36 และ 32 kDa (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วยเทียบกับซีโรวาร์ Pyrogenes โดยวิธี SDS-PAGE

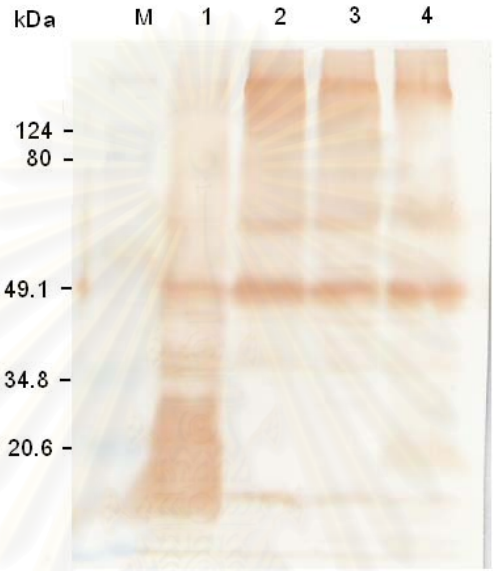
ชนิดเชื้อ	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)														
	122	110	76	72	67	61	58	52	48	44	42	36	32	31	28
Pyrogenes	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
unknown 10	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
unknown 11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
unknown 12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Patoc	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

หมายเหตุ + คือ ปรากฏแถบปฏิกิริยา

- คือ ไม่ปรากฏแถบปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

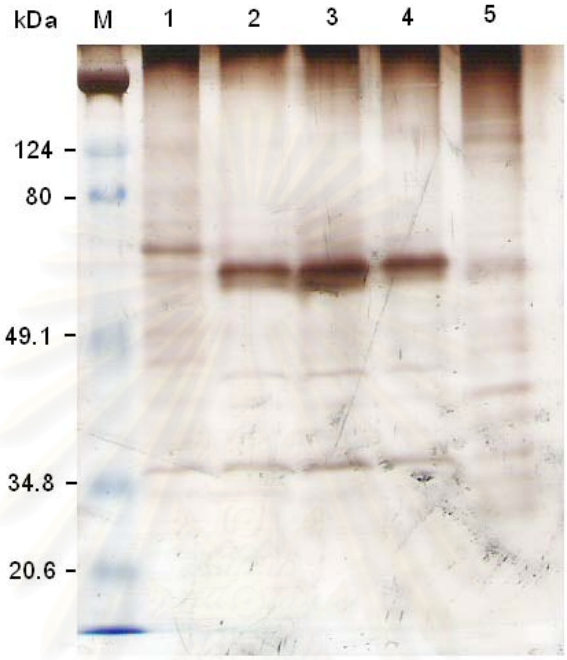
การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblot โดยเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Pyrogenes และเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 3 ตัวอย่าง(Unknown10-12) ทำปฏิกิริยาขั้นต้นกับ rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Pyrogenes ผลพบว่า lane 1 ซึ่งเป็น homologous antigen เกิดลักษณะ smearlike band ที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20 – 35 kDa และเข้มกว่า lane อื่น เมื่อดู lane 2 - 4 พบว่ามีรูปแบบของปฏิกิริยาที่คล้ายกันกับ lane 1 (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Pyrogenes และเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Immunoblot ; lane M,Standard molecular weigth marker; lane1, Pyrogenes ; lane 2-4 , Unknown 10-12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อนำตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่สาม จำนวน 3 ตัวอย่าง (Unknown 13-15) ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Sejroe และเชื้อควบคุมที่ไม่ก่อให้เกิดโรคคือซีโรวาร์ Patoc I โดยวิธี SDS-PAGE ผลพบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 3 ตัวอย่าง มีรูปแบบและลักษณะแอนติเจนไม่เหมือนกันกับซีโรวาร์ Sejroe และ Patoc I (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วยกับซีโรวาร์ Sejroe โดยวิธี SDS-PAGE lane M,Standard molecular weigth marker; lane1 Sejroe ; lane 2-4, Unknown 13-15 และ lane 5, Patoc I

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของแถบแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วย จำนวน 3 ตัวอย่าง (Unknown 13-15) เปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Sejroe และ Patoc I (ภาพที่10) ด้วย โปรแกรม Vilber Lourmat (ประเทศฝรั่งเศส) พบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปรามีรูปแบบตำแหน่งของน้ำหนักโมเลกุลไม่เหมือนกับ Sejroe โดยเชื้อซีโรวาร์ Sejroe Unknown10-12 มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่ 76, 72, 67,61, 48, 44, 42, 36 และ32 kDa แต่ unknown13-15 มีรูปแบบตำแหน่งของโปรตีนที่ 76, 72, 67, 52,48, 44, 42, 36 และ32 kDa (ตารางที่ 12)

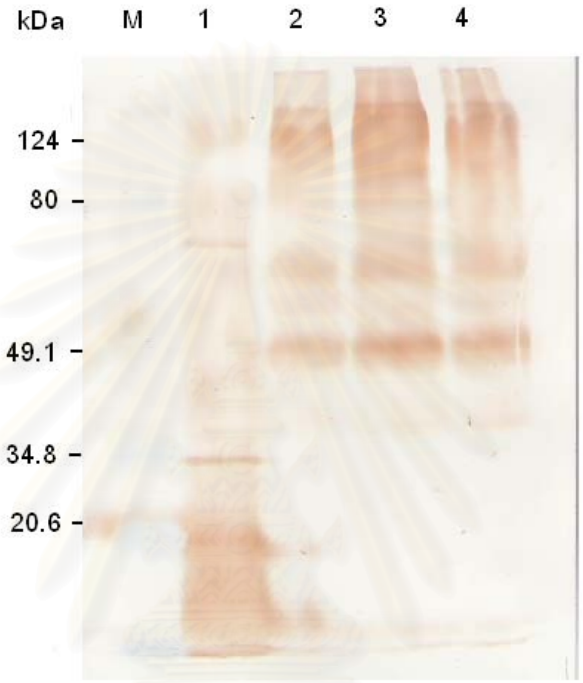
ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกจากผู้ป่วยเทียบกับSejroe โดยวิธี SDS-PAGE

ชนิดเชื้อ	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)														
	122	110	76	72	67	61	58	52	48	44	42	36	32	31	28
Sejroe	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
unknown 13	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
unknown 14	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
unknown 15	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Patoc	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+

หมายเหตุ + คือ ปรากฏแถบปฏิกิริยา
- คือ ไม่ปรากฏแถบปฏิกิริยา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblot โดยเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานซีโรวาร์ Sejroe และเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 3 ตัวอย่าง (Unknown 13-15) ทำปฏิกิริยาขั้นต้นกับ rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Sejroe ผลพบว่า lane 1 ซึ่งเป็น homologous antigen เกิดลักษณะ smearlike band ที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุล 20 – 35 kDa และเข้มกว่า lane อื่น เมื่อดู lane 2 - 4 พบว่ามีรูปแบบของปฏิกิริยาที่ไม่คล้ายกันกับ lane 1 (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่าง rabbit hyperimmune antisera ซีโรวาร์ Sejroe และเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี Immunoblot ; lane M,Standard molecular weigth marker; lane1, Sejroe ; lane 2-4, Unknown 13-15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธี MAT, CAAT และ Immunoblotting lสำหรับการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้ rabbit hyperimmune antisera และเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานจำนวน 10 ซีโรวาร์ ร่วมกับตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราเพาะแยกได้จำนวน 15 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยในจังหวัดบุรีรัมย์ ขอนแก่น และสุรินทร์ ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส ในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545 จากวิธี MAT พบว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราให้ผลบวกกับซีโรวาร์ Pyrogenes 3 ตัวอย่าง, ซีโรวาร์ Sejroe 3 ตัวอย่าง, ซีโรวาร์ Autumnalis 1 ตัวอย่าง และจำนวน 8 ตัวอย่าง พบซีโรวาร์ Autumnalis, Bangkinang และ Rachmati มีระดับไตเตอร์สูงสุดที่ใกล้เคียงกัน ด้วยวิธีCAAT ตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 15 ตัวอย่าง เกิดปฏิกิริยากับ ซีโรวาร์ Autumnalis 9 ตัวอย่าง ผลการศึกษาจำแนกเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Immunoblotting ตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 15 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับให้ผลบวกกับซีโรวาร์ Autumnalis 9 ตัวอย่าง, Pyrogenes 3 ตัวอย่าง และอีกจำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่สามารถจำแนกได้

โดยการจำแนกด้วยวิธี MAT นั้น สามารถจำแนกเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานได้โดยจะมีค่า homologous titer สูงกว่าค่าไตเตอร์จากการทำปฏิกิริยาข้ามซีโรวาร์ (heterologous titer) และเชื้อตัวอย่างที่นำมาใช้ สามารถจำแนกได้เป็นซีโรวาร์ Autumnalis ,Bangkinang และ Rachmati (ซีโรกรุ๊ป Autumnalis) Pyrogenes และ Sejroe สำหรับการจำแนกเชื้อและวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี MAT และการเพาะแยกเชื้อในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย จากการศึกษาตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 22 ตัวอย่างที่เพาะได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำแนกเชื้อด้วยวิธี MAT ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเกิดผลบวกกับซีโรวาร์ Autumnalis ทั้งหมด (Khusum M. et al.,2005) การศึกษานี้ไม่ได้บอกว่าเป็นการพบเชื้อในจังหวัดอะไร จึงสามารถเปรียบเทียบผลการทดสอบของผู้วิจัยกับ Khusum M. et al.,2005 ได้ ว่าตัวอย่างเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนั้น ส่วนใหญ่พบว่าอยู่ในซีโรวาร์ Autumnalis

ซึ่งวิธี MAT เป็นวิธีมาตรฐานที่ WHO แนะนำให้ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยคัดกรองและตรวจวินิจฉัยยืนยันโดย (Cermakova et al.,2005) ได้ใช้วิธี MAT สำหรับเป็นตรวจทางซีรัมวิทยาเบื้องต้นเปรียบเทียบกับวิธี PCR พบว่า วิธี MAT สามารถจำแนกซีรัมจากผู้ป่วยในช่วงท้ายของการ

ติดเชื้อได้ดี แต่หากเป็นช่วงต้นของการติดเชื้อวิธีMAT อาจจะให้ความไวต่ำ ฉะนั้นจึงควรใช้วิธีPCR จึงจะให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบวิธี MAT กับวิธีทางอิมมูโนวิทยาอื่นๆ ELISA(Mulla et.al.2006) พบว่า วิธี MAT สามารถใช้ในการวินิจฉัยจำแนกซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อซีโรวาร์ Hebdomadis, Pyrogenes ,Autumnalis และGrippotyphosa ได้ ซึ่งได้ผลใกล้เคียงกับการตรวจด้วยวิธี IgM ELISA ซึ่งวมีความไว 88% และความจำเพาะ 90.90%

การเปรียบเทียบวิธี MAT กับวิธีการวินิจฉัยอื่นๆ เช่น IgM ELISA และ PCR สำหรับการวินิจฉัยผู้ป่วยในประเทศบลาซิล(Oolemam et.al., 2006) พบว่าในผู้ป่วยที่ยืนยันด้วยวิธี MAT จำนวน 47 คนให้ผลบวกกับวิธี IgM ELISA จำนวน 94% และให้ผลบวกกับวิธี PCR จำนวน 36% ซึ่งเมื่อยึด MATเป็นวิธีทดสอบมาตรฐานแล้ววิธี IgM ELISA จะมีความไวและความจำเพาะ96.6% และ93.3% ตามลำดับอย่างไรก็ดีในตัวอย่างผู้ป่วยช่วงแรกของการติดเชื้อวิธี MAT จะไม่สามารถใช้ในการวินิจฉัยได้การตรวจด้วยวิธีPCR อาจจะเหมาะสมกว่า

การเปรียบเทียบวิธี MAT กับวิธีทางซีรัมวิทยาอื่นๆ เช่น IFA ,Lepto Dipstik และ Latex agglutination(LA) (Kemapunmanus et.al., 2004) พบว่าความไวของการตรวจเป็น76.6%, 91.9%, 77.4%และ 83.1% และความจำเพาะเท่ากับ 100%, 100%, 89.3% และ 83.5% ตามลำดับ โดยวิธีสามารถใช้ในการตรวจแยกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อจากคนไข้ จากการติดเชื้อในธรรมชาติมักพบว่าให้ผลบวกกกับซีรัมมากกว่า 1 ซีโรวาร์ ฉะนั้นบางครั้งจึงไม่สามารถยืนยัน ซีโรวาร์ของเชื้อจากการตรวจด้วยวิธี MAT

จากการตรวจเชื้อผู้ป่วยทั้ง 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CAAT นั้นพบว่ามีเชื้อจำนวน 6 ตัวอย่างที่ไม่ให้ผลการตกตะกอนข้ามซีโรวาร์ แต่พบเชื้อว่าเชื้อจำนวน 9 ตัวอย่าง ให้ผลกับ rabbit hyperimmune antisera ในซีโรวาร์ Autumnalis ,Bangkinang และ Rachmati แต่เมื่อทำการ absorped ด้วย และทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มตามวิธีมาตรฐาน (Ratnam, 1994) พบว่าเชื้อทั้ง 9 ตัวอย่างจำแนกได้เป็นซีโรวาร์ Autumnalis ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธี MAT และ CAAT พบว่าวิธี CAAT สามารถจำแนกเชื้อ ซึ่งให้ผลการตกตะกอนข้ามซีโรวาร์ในวิธี MAT ฉะนั้นวิธี CAAT จึงเป็นวิธีที่สามารถจำแนกซีโรวาร์ของเชื้อได้ดีกว่า วิธี MAT แต่อย่างไรก็ดีวิธี CAAT มีขั้นตอนที่ยุงยากและไม่เหมาะสำหรับกับการใช้งานในการตรวจที่มีตัวอย่างปริมาณมาก

Terpstra(1992) ใช้วิธี CAAT ในการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราเป็นซีโรวาร์ต่างๆ ประมาณ 200 ซีโรวาร์ แต่เนื่องจากมีข้อบกพร่องหลายอย่างของวิธี CAAT ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการใช้งาน เช่น มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน จึงมีมติให้เปลี่ยนการจำแนกซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี CAAT เป็นวิธีการอื่นๆ เช่นการตรวจรหัสพันธุ์กรรมเป็นต้น แต่อย่างไรก็ดี วิธีดังกล่าวก็ยังไม่ครอบคลุมชนิดของเชื้อเลปโตสไปราทุกตัวได้

ปัจจุบันการจำแนกเชื้อซึ่งค้นพบใหม่จะใช้วิธี CAAT ร่วมกับการหารหัสพันธุ์กรรม เช่น การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราจากสุนัขในประเทศอาร์เจนตินา (Rosselli et.al. 2005) ใช้วิธีCAAT ในการจำแนกเชื้อจากตัวอ่อนสุนัขที่แท้งออกมา ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับวิธีการหารหัสพันธุ์กรรมได้เป็นซีโรวาร์ Djasiman แต่วิธีการดังกล่าวอาจจะไม่เหมาะสมเนื่องจากยุ่งยากใช้เวลานานและต้นทุนสำหรับการตรวจแพงมาก

การประยุกต์ใช้วิธี Immunoblotting เพื่อการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราสามารถทำได้ จากผลการทดลองพบว่า วิธีดังกล่าวสามารถจำแนกชื้อได้ไม่ต่างจากวิธีการCAAT ร่วมกับวิธี MAT แต่วิธีการดังกล่าวไม่ยุ่งยากไม่ต้องใช้เชื้อมีชีวิต ซึ่งอาจก่ออันตรายกับผู้ตรวจ นอกจากนี้วิธี Immunoblotting ยังใช้เวลาในการตรวจน้อยกว่า จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้แทน CAATต่อไป

ปัจจุบันมีการนำวิธี Immunoblotting มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อเลปโตสไปรามากขึ้น (Nineppathomwat and Doungchawee, 2006) ใช้แอนติเจนรวมในการทำ Immunoblotting เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งก็ให้ผลการตรวจดี มีความจำเพาะสูง

จากการศึกษาของ Natarajasecnivasan et.al., 2004 ในการตรวจหา การแสดงออกของโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราระหว่างการติดเชื้อระยะเฉียบพลันและระยะท้ายของการติดเชื้อ พบว่าโปรตีนที่น้ำหนัก 32 kDa มีความจำเพาะกับการติดเชื้อทั้งระยะเฉียบพลันและการติดเชื้อช่วงท้ายๆ คล้ายกับการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งพบว่าเชื้อทุกตัวจะให้ผลกับโปรตีนที่น้ำหนัก 32 kDa

Guereiro et.al. (2001) ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศบลาซิล ด้วยวิธี Immunoblotting พบว่ามีโปรตีนจำนวน 7ตัวที่สำคัญ ได้แก่ 76, 62,48,45,41,37 และ 32 kDa สอดคล้องกับการวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่าในเชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วยและเชื้อมาตรฐาน ทุกตัวมีการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว

สรุปผลการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการจำแนกเชื้อด้วยวิธี MAT,CAAT และ Immunoblotting พบว่าวิธีMAT สามารถจำแนกเชื้อได้ แต่ยังพบว่าเชื้อหลายตัวยังคงให้ปฏิกิริยาการตกตะกอนข้ามกับซีโรวาร์อื่น ทำให้ไม่สามารถชี้จำเพาะว่าเป็นซีโรวาร์ใดๆ ได้ เมื่อทำการตรวจสอบต่อด้วยวิธี CAAT ทำให้สามารถชี้ชัดว่าเป็นเชื้อดังกล่าวจัดอยู่ในซีโรวาร์ใดๆ แต่วิธี MATและ CAAT มีความซับซ้อนยุ่งยาก ใช้เวลาในการดำเนินการนานและยังต้องใช้เชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบอีกด้วย ฉะนั้นทั้งสองวิธีนี้อาจจะไม่เหมาะสมสำหรับห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีความพร้อมกับการจัดการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ การจำแนกเชื้อด้วยวิธี Immunoblotting จึงเป็นทางลือกใหม่ที่เหมาะสม เนื่องจากได้ผลการตรวจไม่ต่างกับการใช้วิธี CAAT ร่วมกับ MAT แต่ทำได้ง่ายและสะดวดรวดเร็วกว่า ที่สำคัญไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อมีชีวิต จึงมีความปลอดภัยกับผู้ตรวจสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดาริกา กิ่งเนตร. 2544. ธรรมชาติของการเกิดโรคสำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2544. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรสิส. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

ดวงพร พลูสุขสมบัติ และคณะ. 2543. เชื้อเลปโตสไปราในหนู ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สัตวแพทยสาร 10(3): 516-525.

ธรรมวรรณ หนุนไธสง. 2545. การหาแหล่งโรคที่ทำให้เกิดการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิมพ์ใจ นัยโกวิท และ ดวงพร พูลสุขสมบัติ. 2544 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีส คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซีส พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย: 42-55.

สาธารณสุข, กระทรวง. กรมควบคุมโรค. 2547. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2545. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล.2544 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีส คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซีส พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย: 24-32.

วิมล เพชรกาญจนาพงศ์. 2549.สำนักระบาดวิทยา.กรมควบคุมโรค รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ :273-277

อลงกรณ์ อมรศิลป์. 2543 การตรวจเชื้อ Leptospira interrogans ในปัสสาวะของหนูด้วยเทคนิค polymerase chain reaction. กรุงเทพ ภาควิชาสัตวพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (อัดสำเนา)

ภาษาอังกฤษ

Alexander, A. D. 1991. Leptospira. In Manual of Clinical Microbiology. 5 th ed. pp. 544-549. Washington: American Society for Microbiology.

Biswas, D., Roy, S., Vijayachari, P., Sugunan, A. P., Natarajaseenivasan, K., and Sehgal, S. C. 2005. Comparison of immunoreactive proteins of commonly circulating serogroups of Leptospira in Andaman Island, India. Indian J. Med. Res. 121: 151-158.

Bomfim, M. R. Q.; Ko, A. I.; and Koury, M. C. 2005. Evaluation of the recombinant Lip L32 in enzyme – linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine Leptospirosis. Vet. Microbiol. 109: 89-94.

Boonyod D., and Chirathaworn C. 2002. Leptospirosis and laboratory diagnosis. J. Med. Tech. Assoc. Thailand 30: 23-37.

Cermakova Z, Pliskova L and RyskovaO. 2005. Laoratory diagnosis of Leptospira. Folia Microbiol(Praha). 50(4): 345-7

Champagne, A. J., Higgins, R.., Fairbrother, J. M., and Dubreuil, D. 1990. Detection and characterization of leptospiral antigens using a biotin/avidin double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot. Can. J. Vet. Res. 55: 239-245.

Chapman, A. J., Adler, B., and Faine, S. 1988. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogans* serovar *Hardjo*. J. Med. Microbiol. 25: 269-278.

Chaifoo, W., Tharmapornpilas, P., Limpaiboon, R., Bragg, S., and Aye, T. 1997. Clinical study for finding Leptospirosis definition at Udon Thani Hospital, Udon Thani, October. Reg. 6: 168 – 183.

Dikken, H., and Kmety, E. 1978. Serological typing methods of leptospires. Methods Microbiol 11, 259–307.

Doungchawee, G. et al. 2005. Immunodistinction of reference Leptospires on immunoblots (eds) 4 th Scientific Meeting of The International Leptospirosis Society, pp.216-217. Nonthaburi: Ministry of Public Health.

Feresu, S. B., Bolin, C. A., and Korver H. 1998. A new leptospiral serovar, ngavi, in the Tarassovi serogroup isolated from Zimbabwe oxen. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 207-213.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P. 1999. Leptospira and leptospirosis. 2 nd ed. Melbourne: MediSci.

Farrar, W. E. 1995. *Leptospira* species (Leptospirosis). In G. L. Mandel, J. E. Bennett, and R. Dolin (eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases, pp. 2137-2141. New York: Churchill Livingston.

Flannery, B., et al. 2001. Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 39: 3303-3310.

Gussenhoven, G. C., et al. 1997. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J. Clin. Microbiol. 35:92-97.

Honarmand, H., Shirazi, M., Hartskeerl, R. A., Eshraghi, S., Khoramizadeh, M. R., and Ghanaei, F.M. 2005. Evaluation of two ELISA methods for diagnosis of acute Leptospirosis. (eds) 4 th Scientific Meeting of The International Leptospirosis Society, pp. 218-219. Nonthaburi: Ministry of Public Health.

Guerreiro, H., et al. 2001. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun. 69: 4958-4968.

Kemapunmanus M. et al. 2004. A prospective evaluation of four immunodiagnostic assars for human leptospirosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 35(4): 863-867

Kositanont, U et al. 2005. Detection and differentiation Leptospires species by multiplex polymerase chain reaction. (eds) 4 th Scientific Meeting of The International Leptospirosis Society, pp. 228-230. Nonthaburi: Ministry of Public Health.

Kusum, M.et.al. 2005. Comparison of leptospiral serovars identification by serology and cultivation in northeastern region, Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 88: 1098-1102.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Levett, P. N. 2001. Leptosprirosis. Clin Microbiol Rev. 14: 296-326.

Levett, P. N., Branch, S. L., Whittington, C. U., Edwards, C. N., and Paxton H. 2001. Two methods for rapid serological Diagnosis of acute Leptospirosis. Clin Diagn Lab Immunol. 8: 349-351.

Mulla S. et al.2006. Diagnosis of leptospirosis and comparison of ELISA and MAT. Indian J Pathol Microbiol 49(3):468-470

Natarajaseenivasan K. et.al. 2004. Leptospiral protein expressed during acute & c0nvalescent phases of humam leptospirosis Indian J Med Res120(3):151-159

Nicholson, V. M., and Prescott J. F. 1993. Outer membrane proteins of three pathogenic Leptospira species. Vet Microbiol. 36: 123-138.

Niwetpathomwat, A., and Doungchawee, G. 2006. Western immunoblot analysis using a ten leptospira serovars combined Antigen for serodiagnosis of leptospira. Southeast Asian J Trop Med Public Health 37: 309-310.

Ochiai, S., Adachi, Y., and Mori, K. 1997. Unification of the generra *Serpulina* and *Brachyspira* and proposals of *Brachypira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachypira innocens* Comb. Nov. and *Brachypira pilosicoli* Comb. Nov. Microbiol Immunol. 41: 445-452.

Ooteman MC, Vago AR and Koury.2006 Evaluation 0f MAT,IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of humam leptospirosis. J Microbiol Methods 65(2): 247-257

Perolist P. et al., 1999 RNA gene restriction patierns of leptospira a molecular typing system. Res.Microbiol .141:59-171.

Petchclai B., et al. 1992, Enzymelinked immunosorbent assay for leptospirosis immunoglobulin M specific antibody using surface antigen from a pathogenic *Leptospira*: a comparison with indirect hemagglutination and microagglutination tests. J Med Assoc Thai; 75:203-8.

Phulsuksombati D, et al. 2001. *Leptospires* in rodent, northeastern region 1999 – 2000. Journal of Health Science 10: 516 – 525.

Prapasarakul, N. et al. 2002. Genetic and serological characterization of Japanese canine intestinal spirochetes. In Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress 2: 59.

Prapasarakul, N.; Ogawa, Y.; and Adachi, Y. 2003. Isolation and serological survey of canine intestinal spirochetes in Japan. The Japanese Journal of Animal Hygiene 29: 25-30.

Ramadass, P., Samuel, B., and Nachimuthu, K. 1999. A rapid latex agglutination test for detection of Leptospiral antibodies. Vet Microbiol. 70: 137 – 140.

Rao, R. S.; Gupta, N.; Bhalla, P., and Agarwal, S. K. 2003. Leptospirosis in India and the rest of the world. The Brazilian Journal of Infectious Disease 7(3): 178-193.

Ratnam, S. 1994. A Manual on Leptospirosis. 1st ed. Tamilnadu Veterinary And Animal Sciences University Madras 111-156.

Romero, E. C., and Yasuda P. H. 2006. Molecular characterization of *Leptospira sp.* strains isolated from human subjects in Sao Paulo, Brazil using a polymerase chain reaction-based assay: a public health tool. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 101:373-378.

Rossetti, C. A., Liem, M., Samartino, L. E., and Hartskeerl, R. A. 2005. Buenos Aires, a new *Leptospira* serovar of serogroup Djasiman, isolated from an aborted dog fetus in Argentina. Vet Microbiol. 107: 241-248.

Smits, H. L., et al. 2000. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 38:1272-1275.

Sehgal SC, et al., 1999. LEPTO-Dipstick; a rapid and simple method for serodianosis of acute leptospirosis. Trans R Soc Trop Med Hyg; 93:161-4.

Taylor, K., Barbour, A., and Thomas, D. 1991. Pulsed Field Gel Electrophoresis Analysis of Leptospiral DNA. Infect. Immun. 59: 323-329.

Pappas, M. G., Ballow, W. R., and Gray M. R. 1985. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34: 346-54.

Vijayachari et al. 2004, unique strain of *Leptospira* isolated from a patient with pulmary haemorrhages in the Andaman Islands: a proposal of serovar portbiairi of serogroup Sehgali. Epidemiology and infection , 132:663-673

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ก. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 Fletcher Medium Base(Difco)

2 Neo Peptone Medium(Difco)

3 EMJH Medium Base(Difco)

4 Bacto Agar (Difco)

5 Nutrient Agar Medium(Difco) Korthof Medium

6 Gellan Gum medium(Sigma)

7 Rabbit Serum(GIBCO)

8 $MgCl_2$. $6H_2O$ (Magnesium Chloride Hexahydrate)

9 $CaCl_2$ (Calcium Chloride)

10 Thiamine B1

11 Bovine serum Albumin Fraction V Sigma A8022

12 Vitamin B12 (cyanocobalamine)

13 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

14 CuO4s.5H2O

15 $FeSO_4.7H_2O$ (Iron (II) Sulfate Heptahydrate)

16 Glycerol 87%

17 NaCl (Sodium Chloride)

18 $C_3H_3NaO_3$(Sodium Pyruvate)

19 $ZnSO_4.7H_2O$(Zinc Sulfate Heptahydrate)

20 KCL (Potassium Chloride)

21 KH_2PO_4 (Potassium Dihydrogen Phosphate)

22 Na_2HPO_4(Di - Sodium Hydrogen Phosphate Anhydrous)

23 $HNa_2O_4P.12H_2O$(Di - Sodium Hydrogen Phosphate)

24 $MgSO_4$. $7H_2O$ (Magnesium Sulfate Heptahydrate)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี

1 Giemsa stain

2 Methanol

3 Glycerol

ค. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมี

1.1 *Oxidase test*

1.1.1 ρ-phenylenediamine

1.1.2 Korthof Medium

1.2 *Egg yolk reaction*

1.2.1 Nutrient Agar Medium

1.2.2 Peptone Medium

1.2.3 Agar

1.2.4 Egg yolk emulsion

ง. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา(สามารถดูเทคนิคการเตรียมประกอบได้ในภาคผนวก)

1 EMJH Medium

2 เชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย 15 ตัวอย่าง

3 โพลิโคนัลแอนติบอดีของเชื้อเลปโตสไปรา 10 ซีโรวาร์

จ. สารเคมีที่ใช้ในการ Cross agglutinin absorption test

1. EMJH Medium

2. เชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย 15 ตัวอย่าง

3. โพลิโคนัลแอนติบอดีของเชื้อเลปโตสไปรา 10 ซีโรวาร์

ฉ. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Immunoblotting

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGEและ Western Blotting

1.1 30%Acryamide/Bis Solution(29:1) (Bio-Rad)

1.2 Tris

1.3 Tween 20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 Glycine

1.5 $(NH_4)_2S_2O_8$(Ammonium Persulfate)

1.6 TEMED

1.7 C_2H_6OH(2-Mercaptoethanol)

1.8 Silver Stain Plus (Bio-Rad Laboratories Ltd.)

1.9 Methanol

1.10 Acetic acid

1.11 30% H_2O_2(30% Hydrogen Peroxide)

1.12 $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$(Sodium Lauryl Sulphate)

1.13 Diaminobenzidine(DAB)

2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ก. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 หลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร

2 อ่างน้ำร้อน

3 pH meter

4 Autoclave

5 ขวดแก้วขนาด 250, 500, 1000 มิลลิลิตร

6 เครื่องชั่งมาตรฐาน 3 ตำแหน่ง

7 Microwave

ข. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการย้อมสี

1 สไลด์แก้ว

2 ขวดฉีดน้ำกลั่น

ค. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมทดสอบทางชีวเคมี

1 Oxidase test

1.1 หลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร

1.2 Egg yolk reaction

1.3 หลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 อ่างน้ำร้อน

1.5 ตู้บ่มเชื้อ ที่ 30 องศาเซลเซียส

ง. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา

1. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. Single autopipette
3. Multichanel pipette
4. Microtiterflat plate
5. Micropipette tips ขนาด10 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร
6. กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด
7. กล่องความชื้น

ค. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการ Cross agglutinin absorption test

1. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. Single autopipette
3. Multichanel pipette
4. Microtiterflat plate
5. Micropipette tips ขนาด10 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร
6. กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด
7. กล่องความชื้น
8. Mcfarland No.1
9. Refrigerate centrifuge

ง. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียม Immunoblotting

1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียม SDS-PAGE

1.1 Power Supply(PowerPac™ HC High-Current Power Supply,Bio-Rad Laboratories Ltd.)

1.2 Electrophoresis Set (Mini-Protean3 Electrophoresis cell, Bio-Rad Laboratories Ltd.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียม Western Blotting

2.1 Semi-Dry Transfer System(Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories Ltd.)

2.2 Power Supply(PowerPac™ HC High-Current Power Supply,Bio-Rad Laboratories Ltd.)

2.3 กระดาษกรอง (Extra Thick Blot Paper,Bio-Rad Laboratories Ltd.)

2.4 กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Schleicher & Schuell BioScience GmgH, Germany)

2.5 แอนติบอดี้ที่จำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนที่เราสนใจ

2.6 สารอิมมิวโนตัวที่2 (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins /HRP,DakoCytomation Denmark)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ชนิดเหลว (liquid media)

1.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ EMJH medium

EMJH medium เป็นส่วนผสมของ Albumin fatty acid supplement และ Basal medium

การเตรียม Stock solutions of EMJH medium

Reagents	Grams per 100 ml H2O	Storage
$CaCl_2$ x $2H_2O$+$MgCl_2$ x $6H_2O$	1(each)	-20°C
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0.4	-20°C
$CuSO_4$ x $5H_2O$	0.3	4°C
Vitamin B12	0.02	-20°C
Tween 80	10.0	-20°C
Thaimine(Vitamin B1)	0.5	-20°C
Glycerol	10.0	-20°C
Na-pyruvate	10.0	-20°C

ส่วน A วิธีเตรียม Albumin fatty acid supplement

1. ละลาย bovine serum albumin fraction V (A8022) 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. เติม $CaCl_2$ x $2H_2O$+MgCl2 x $6H_2O$ จาก Stock solution จำนวน 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม $ZnSO_4$ x $7H_2O$ จาก Stock solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตร
4. เติม $CuSO_4$ x $5H_2O$ จาก Stock solution จำนวน 0.1 มิลลิลิตร
5. เติม Vitamin B12 จาก Stock solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตร
6. เติม Thaimine (Vitamin B1) จาก Stock solution จำนวน 2.5 มิลลิลิตร
7. เติม Tween 80 จาก Stock solution จำนวน 12.5 มิลลิลิตร
8. ปรับ pH 7.4 - 7.6 ด้วย 1N NaOH
9. เติมน้ำกลั่นถึง 100 มิลลิลิตร
10. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

<u>ส่วน B</u> วิธีเตรียม Basal medium

1. ละลาย EMJH Base medium 2.3 กรัม ในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร
2. เติม Na-pyruvate จาก Stock solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตร
3. เติม Glycerol จาก Stock solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตร
4. ปรับ pH 7.4 - 7.6 ด้วย 1N NaOH
5. เติมน้ำกลั่นถึง 900 มิลลิลิตร
6. ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ผสมส่วน Albumin fatty acid supplement(A) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใน Basal medium(B) จำนวน 900 มิลลิลิตร เขย่าเบาให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1 เดือน

1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Neopeptone medium

ใช้	Neopeptone media	2.0	กรัม
	NaCl	1.0	กรัม
	Distill Water	900	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.2-7.4 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ 15 นาที เติม Rabbit serum 100 มิลลิลิตร ผสมลงใน media ที่เตรียมไว้ แบ่งใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไป inactivate 56 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 เดือน

1.3 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Korthof media

ใช้	Peptone	0.8	กรัม
	Sodium Chloride	1.4	กรัม
	Sodium bicarbonate	0.02	กรัม
	Potassium Chloride	0.04	กรัม
	Calcium Chloride	0.04	กรัม
	Potassium dihydrogen phosphate	0.24	กรัม
	Sodium dihydrogen phosphate	0.88	กรัม
	Distill Water	100	มิลลิลตร

ต้มให้เดือดและกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปรับ pH 7.2 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ 15 นาที เติม Rabbit serum 100 มิลลิลิตร ผสมลงใน media ที่เตรียมไว้ แบ่งใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ชนิดกึ่งเหลว (semisolid media)

2.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ EMJH medium

2.1.1 เติม agar 2.0 กรัม ลงใน basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร

2.1.2 ต้มจน agar ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

2.1.3 ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.1.4 เติม Albumin fatty acid supplement (A) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใน Basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร เขย่าเบาให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1 เดือน

2.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Fletcher medium

ใช้	Fletcher media	2.5	กรัม
	Distill Water	920	มิลลิลิตร

ต้มให้เดือดและ autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ 15 นาที เติม Rabbit serum 80 มิลลิลิตร ผสมลงใน media ที่เตรียมไว้ แบ่งใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไป inactivate 56 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 เดือน

3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (solid media)

3.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ EMJH medium

3.1.1 เติม agar 10.0 กรัม ลงใน basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร

3.1.2 ต้มจน agar ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.1.3 ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.1.4 เติม Albumin fatty acid supplement (A) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใน Basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร เขย่าเบาให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแบ่งใส่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1 เดือน

3.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Gellan gum - EMJH media

3.2.1 เติม Gellan gum 10.0 กรัม ลงใน basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร

3.2.2 ต้มจน agar ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3.2.3 ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3.2.4 เติม Albumin fatty acid supplement (A) จำนวน 100 มิลลิลิตร ใน Basal medium (B) จำนวน 900 มิลลิลิตร เขย่าเบาให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

Immunoblotting

วิธีการทดลอง

1. การเตรียม slab gel

1.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel

1.2 เตรียมสารละลายของเจล (Separating gel)

1.125 M. Tris –HCl pH 8.8	10.0	มิลลิลิตร
DW	9.7	มิลลิลิตร
Acrylamide / Bis 30/0.8	10.0	มิลลิลิตร
10% ammonium persulfate	300	ไมโครลิตร
10% APS	60	ไมโครลิตร
TEMED	30	ไมโครลิตร

ไมโครลิตร

1.3 เทเจลลงในแผ่นแก้วโดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ จากนั้นค่อยๆ หยอดผิวด้านบนของเจลด้วยน้ำกลั่นให้คลุมผิวเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 - 45 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำที่คลุมผิวเจลที่อยู่อย่างชัดเจน

1.4 เตรียม stacking gel 10 ml โดยผสมสารดังต่อไปนี้เข้าด้วยกันคือ

0.625 M. Tris –HCl pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
DW	6.0	มิลลิลิตร
Acrylamide / Bis 30/0.8	1.5	มิลลิลิตร
10% APS	45	ไมโครลิตร
TEMED	25	ไมโครลิตร

1.5 ค่อยๆ เทน้ำที่อยู่ส่วนบน resolving gel ออก และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง สอด comb ลงใน gel plate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.6 เท stacking gel ที่ผสมเรียบร้อยแล้วบน Separating gel ระวังอย่าให้มีฟอง อากาศเกิดในช่อง comb ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวจะใช้เวลาประมาณ 30 - 45 นาที

<u>หมายเหตุ</u> ในกรณีที่ต้องการเตรียมเจลค้างคืนเพื่อทำอิเลคโตรโฟรีซีสในวันรุ่งขึ้น ควรใส่ stacking gel ในวันที่จะแยกโปรตีน โดยควรคลุมผิว resolving gel ไว้ด้วย น้ำกลั่น และเก็บเจลไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

การเตรียมสารเคมี

1. 30 % Acrylamide,0.8 % Bisacrylamide

2. 1.125 M Tris-HCl pH 8.8

Trisma base	13.6235	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH 8.8 ด้วย 1N HCL		

3. 0.625 M Tris-HCl pH 6.8

Trisma base	7.569	กรัม
Distilled water to	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH 6.8 ด้วย 1N HCL		

4. 10% SDS(sodium dodecyl sulfate)

SDS(sodium dodecyl sulfate)	10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

5. 10% APS (ammonium persulfate)

ammonium persulfate	100	มิลลิกรัม
Distilled water	1	มิลลิลิตร

4. 2X SDS sample buffer

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0.15	กรัม
SDS	4	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Glycerol	20	มิลลิลิตร
Bromophenol blue	10	มิลลิกรัม

5. Running buffer

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	1.5	กรัม
Glycine	7.2	กรัม
10% SDS	5	มิลลิลิตร
Distilled water	500	มิลลิลิตร

6. TEMED

7. Electrotasfer buffer

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.03	กรัม
Glycine	14.04	กรัม
Methanol	200	มิลลิลิตร
Distilled water	1	ลิตร

8. Phosphate buffer saline(PBS), pH 7.2 - 7.4

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na_2HPO_4	1.44	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. TBS buffer

1 M Tris-HCl pH 7.5	100	มิลลิลิตร
NaCl	9	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

10. Blocking buffer (TBS + 1% BSA)

TBS	200	มิลลิลิตร

BSA	2	กรัม

11. Washing buffer (TTBS)

TBS	1000	มิลลิลิตร
Tween 20	1000	ไมโครลิตร

12. Substrate

DAB (3,3-Diaminobenzidine)	0.006	กรัม
0.01 M Tris-HCl	9	มิลลิลิตร
30% H_2O_2	10	ไมโครลิตร

การย้อมด้วย Silver Stain Plus Kit

1. Fixation Step 20 min

Reagent grade	2	gels
Methanol	200	มิลลิลิตร
Acetic acid	40	มิลลิลิตร
Fixative Enhancer Concentrate	40	มิลลิลิตร
Deionized Distilled Water	120	มิลลิลิตร
Total	400	มิลลิลิตร

2. Rinse Step 20 min

Decant Fixative Enhancer Solution

↓

Rinse gel in 400 ml DW. 10 min agitation

↓

Decant rinse water

↓

Rinse fresh DW. 10 min agitation

3. Staining and Developing Step 20 min

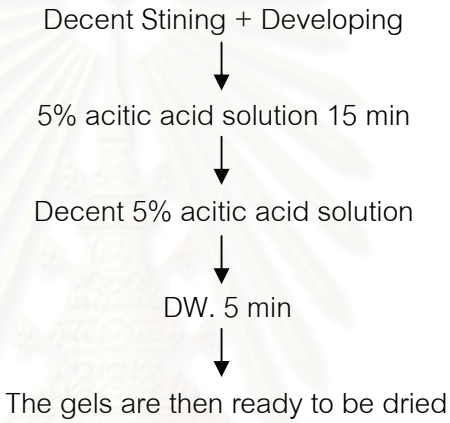
A

Reagent	2	gels

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Silver Complex Solution	5	มิลลิลิตร
Reduction Moderator Solution	5	มิลลิลิตร
Image Development Reagent	5	มิลลิลิตร
Deionized Distilled Water	35	มิลลิลิตร
B		
Silver	2.5	กรัม
Deionized Distilled Water	50	มิลลิลิตร

4. Stop Step 15 min



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมยุรฉัตร เบี้ยกลาง เกิดวันที่ 10 สิงหาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสุรนารีวิทยา ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาตรีที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาปริญญาตรีเมื่อปีการศึกษา 2542 จากนั้นได้เริ่มปฏิบัติงานในตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์(ชั่วคราว) ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี ได้รับรางวัลผลงานวิจัยระดับชมเชย สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องการพัฒนาชุดทดสอบสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส จากสภาวิจัยแห่งชาติ เมื่อ 20 กันยายน 2544 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2545

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย