



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสในรูปแผ่นตรวจโรคโดยใช้อนุภาคนาโนเมตร
Development of Nanoparticle-Based Lateral Flow Strip Test for Diagnosis of Leptospirosis

โดย

อาจารย์ ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาละกะ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทโครงการ 2-V Research Program : โครงการเพื่อเพิ่มคุณค่า
และมูลค่าผลผลิตจากงานวิจัยและสิ่งประดิษฐ์ : กรณีผลงานด้านวิศวกรรมชีวการแพทย์
(Biomedical Engineering)

จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประเภทโครงการ 2-V Research Program: โครงการเพื่อเพิ่มคุณค่าและมูลค่าผลผลิตจาก
งานวิจัยและสิ่งประดิษฐ์ : กรณีผลงานด้านวิศวกรรมชีวการแพทย์ (Biomedical Engineering)

บทคัดย่อ

ภาษาไทย

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่พบได้ทั่วโลก โดยมีเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคเป็นเชื้อสาเหตุ ปัจจุบันวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสคือ Microscopic agglutination test (MAT) แต่วิธีนี้มีความไวไม่เพียงพอในการวินิจฉัยโรคในระยะต้นของการติดเชื้อ โปรตีน LipL32 เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในพื้นที่นอกของเชื้อเลปโตสไปราเฉพาะในสายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน LipL32 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี และมีการแสดงออกในระดับสูงในระยะต้นของการติดเชื้อ ดังนั้นโปรตีน LipL32 จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะแรกเริ่ม การศึกษานี้จึงได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 และประเมินผลของแอนติบอดีที่ติดฉลากกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อ เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคด้วยวิธีใช้แผ่นตรวจ lateral-flow assay โดยทำการฉีดโปรตีนสกัดบริสุทธิ์ของรีคอมบีแนนท์ LipL32 ในหนู BALB/c เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 โดยอาศัยไฮบริโดมาเทคนิค จากการวิเคราะห์โดยวิธี indirect ELISA พบว่าได้เซลล์ไฮบริโดมาอย่างน้อย 4 โคลน ที่สามารถหลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะสูงต่อโปรตีน LipL32 ของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคและไม่จับกับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรครวมทั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ การศึกษานี้ได้ทำการสกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 จากหนึ่งในสี่โคลนโดยวิธี affinity chromatography และนำมาใช้เป็นแอนติบอดีบนเส้นทดสอบของแผ่นตรวจ ภายหลังการทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมพบว่าแผ่นตรวจที่ได้ในการศึกษานี้สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรคได้ที่จำนวนอย่างน้อย 104 โดยให้ผลลบแม้จะใช้เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ไม่ก่อโรคจำนวนมากถึง 10⁷ ในการทดสอบ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีตัวอย่างผู้ป่วยที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสเพื่อนามาทดสอบ กลุ่มผู้วิจัยจะพัฒนาแผ่นตรวจที่มีความไวและความจำเพาะให้ดียิ่งขึ้นต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่ในระยะแรกของโรค

ภาษาอังกฤษ

Leptospirosis, a worldwide zoonotic disease, is caused by pathogenic *Leptospira*. The standard method for diagnosis of leptospirosis is the microscopic agglutination test (MAT), but it is not useful during the early phase of illness. LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*, is highly conserved, immunogenic, and is expressed during acute infection. Therefore, LipL32 may be a good candidate for antigen detection for early diagnosis of leptospirosis. The purpose of this study was to produce and evaluate monoclonal antibodies against LipL32 antigen and used for detection of *Leptospira* by lateral flow assay. BALB/c mice were immunized with purified recombinant LipL32 to obtain splenocytes for hybridoma production. Hybridoma clones were screened and selected for clones that secreted specific antibodies, which reacted to pathogenic *Leptospira* but were unable to bind to non-pathogenic *Leptospira* and other bacteria. Anti-LipL32 monoclonal antibody derived from one of four selected hybridoma clones were purified by affinity chromatography and used as a capture antibody on the test line of lateral flow assay. After optimization, the lateral flow strip test developed in this study was able to detect at least 104 pathogenic leptospire but showed no cross-reactivity with 107 non-pathogenic leptospire. However, no samples from confirmed cases of leptospirosis were obtained for testing. We will further develop sensitive and specific lateral flow assay system which is a useful tool for early and rapid diagnosis of leptospirosis.

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) การพัฒนาชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสในรูปแบบตรวจโรคโดยใช้อนุภาคนาโนเมตร
(ภาษาอังกฤษ) Development of Nanoparticle-Based Lateral Flow Strip Test for Diagnosis of Leptospirosis

ได้รับการสนับสนุนโครงการ 2-V Research Program ประจำปี 2554 จำนวนเงิน 1,300,000 บาท
ระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ ธันวาคม 2554 ถึง ธันวาคม 2554
หน่วยงานและผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 08-1611-6004

ผู้ร่วมโครงการคนที่ 1 รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา จิรถาวร
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 08-9816-3053

ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. กนิษฐา ภัทรกุล
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 08-1344-5909

ผู้ร่วมโครงการคนที่ 3 รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาละกะ
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 08-1454-9295

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย.....	ข
บทคัดย่อ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
นาโนเทคโนโลยี.....	5
การประยุกต์ใช้ AuNPs ใน Lateral flow strip test.....	7
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย วิธีการดำเนินการวิจัย.....	8
แผนการดำเนินการ.....	8
แผนงาน.....	8
ตัวชี้วัดความสำเร็จ.....	11
บทที่ 4 ผลการดำเนินงาน.....	13
เตรียมอนุภาคทองคำนาโนเมตร.....	13
การเตรียม LipL32 Antibody.....	14
การตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคมื้อหนูจากสิ่งแวดล้อมและจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย.....	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะระดับนโยบาย.....	27
ความโดดเด่นของผลผลิตจากงานวิจัย/สิ่งประดิษฐ์.....	27
Model กระบวนการ/ขั้นตอนการส่งผลผลิตจากงานวิจัย/สิ่งประดิษฐ์ สู่กลุ่มผู้ใช้ประโยชน์.....	27
ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้น.....	28
ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์ สังคม และสิ่งแวดล้อม.....	28
การดำเนินงานในช่วงต่อไป.....	29
บรรณานุกรม.....	30
ภาคผนวก ก	33
ภาคผนวก ข	44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แผนการดำเนินการ.....	8
2	ตารางสรุปแผนงาน.....	11
3	การคัดเลือกไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติในการผลิตและหลังแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 ของเชื้อ Pathogenic <i>Leptospira</i> และไม่ cross-reactive กับ <i>E. coli</i> โดยวิธี limiting dilution.....	16
4	สรุป isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ 1-4.....	19

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl ₄ และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม.....5
2	แผนภาพแสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และภาพสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร.....6
3	แผนภาพแสดงการนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและทางการแพทย์ โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs.....7
4	แผนภาพแสดงส่วนประกอบ (A) และการแปลผล (B) ของ Lateral flow strip test.....7
5	แสดงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้.....13
6	การสร้างโปรตีน LipL32 ใน <i>E.coli</i> ที่มี pRSETc-lipL32 plasmid และกระตุ้นการแสดงออกด้วย IPTG.....14
7	การสกัดโปรตีน recombinant LipL32 ให้บริสุทธิ์โดย affinity chromatography (Ni-NTA column) และ elute โปรตีน LipL32 ด้วย elution buffer ที่ประกอบด้วย 100 mM หรือ 250 mM imidazole.....14
8	ระดับของแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ในซีรัมของหนู BALB/c จำนวน 3 ตัว (M1-3) ภายหลังจากฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน LipL32.....15
9	ความจำเพาะของแอนติบอดีใน culture supernatant ของ 4 ไฮบริโดมาโคลนที่คัดเลือกกว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 และเชื้อ Pathogenic <i>Leptospira</i> แต่ไม่ cross-react กับ non-pathogenic <i>Leptospira</i> และเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆที่ใช้ทดสอบ.....17
10	Isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ 1-4.....19
11	การสกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ LipL32-coupled sepharose HiTrap Column.....20
12	ELISA แสดงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนโปรตีน LipL32 ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีใน culture supernatant ก่อนนำไปสกัดให้บริสุทธิ์ (before) และเมื่อนำไปสกัดให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ในส่วนของ flow through และในส่วนของ elution fraction ที่ 2 (Elute 2).....21

13	แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip).....	22
14	การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) โดย detection antibody.....	23
15	การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) โดยมี 20% formamide ใน 0.1XPBS เป็น running buffer.....	23
16	การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) โดยมี 5% formamide ใน 0.1XPBS เป็น running buffer.....	24
17	การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) โดยมี 0.1XPBS เป็น running buffer.....	25
18	การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) โดยมี 0.1XPBS เป็น running buffer และเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ที่บริเวณ test line เป็น 2 μ l of anti-LipL32 monoclonal antibody (0.05 mg/ml).....	25

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis)

โรคเลปโตสไปโรซิสหรือที่ชาวบ้านทั่วไปเรียกว่า "โรคฉี่หนู" เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น (1) สำหรับประเทศไทยมีรายงานโรคในทั่วทุกภาคของประเทศ ช่วงปี พ.ศ.2525 ถึงปี พ.ศ.2538 มีอัตราป่วยเฉลี่ยประมาณ 0.3 ต่อ ประชากร 100,000 คน แต่ในปี พ.ศ.2540 เกิดการระบาดของโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำให้อัตราป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 3.47 ต่อ ประชากร 100,000 คนต่อมายังมีการรายงานการระบาดของโรคเป็นระยะๆ (2) ผู้ป่วยส่วนใหญ่อายุ 15-45 ปี ซึ่งเป็นวัยแรงงานซึ่งเป็นกำลังสำคัญของครอบครัวในกลุ่มประชากรที่มีความเสี่ยงต่อโรคสูงได้แก่เกษตรกรคนงานขุดลอกท่อระบายน้ำคนงานเหมืองแร่คนงานโรงฆ่าสัตว์และสัตวแพทย์และมีรายงานผู้ป่วยในกลุ่มผู้ที่ชอบเดินป่าตั้งแคมป์ท่องเที่ยวตามแม่น้ำ ทะเลสาบน้ำตกร และผู้ที่มีประวัติแช่น้ำท่วมขัง มักจะพบการระบาดในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายนเนื่องจาก เป็นฤดูฝนต่อหนาว มีภาวะน้ำท่วมขัง (3) ซึ่งในปัจจุบันภาวะปัญหาโลกร้อนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดฝนตกหนักจนเกิดภาวะน้ำท่วมขังในพื้นที่ต่างๆของประเทศได้บ่อย ดังนั้นโรคเลปโตสไปโรซิสจึงเป็นปัญหาสาธารณสุข ที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) คือ *Leptospira interrogans sensu lato* (4) ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียใน Order Spirochaetales Genus *Leptospira* โดยมีลักษณะเป็น เส้นเกลียวยาวปลายโค้งงอคล้ายตะขอเคลื่อนไหวยรวดเร็วโดยการหมุนหรือไค้งงอเชื้อนี้มีชีวิตอยู่ได้ใน สิ่งแวดล้อม ที่มีความชื้นเช่นในดินโคลนแอ่งน้ำที่มีค่า pH 7.2 - 8.0 เชื้อจะอยู่ได้นานเป็นเดือนที่อุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียสและจะไม่สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7-10 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 34-36 องศาเซลเซียสเชื้อเลปโตสไปราถูกจำแนกทางซีโรโลยีโดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเชื้อ ออกเป็นอย่างน้อย 23 serogroup และมากกว่า 200 serovars ในปัจจุบันสามารถจำแนกทางอนุชีววิทยา โดยอาศัยความแตกต่าง ของเบส ออกเป็นอย่างน้อย 17 สปีชีส์ (5)

แหล่งรังโรคไม่จำกัดแต่เฉพาะในหนูเท่านั้น อาจเป็นสัตว์ได้หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ และสัตว์ป่า ซึ่งจะปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะเชื้อเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรงจากการสัมผัสปัสสาวะที่มีเชื้อหรือทางอ้อมจากการสัมผัสสิ่งแวดล้อม เช่น ดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อโดยเชื้อมักจะเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่มีแผลหรือเยื่อ เชื้อเลปโตสไปรา มีระยะฟักตัว 2-30 วัน (เฉลี่ย 10 วัน) อาการในคนอาจแตกต่างกันออกไปอาจมีอาการอย่างอ่อน จนถึงขั้นรุนแรงขึ้นกับชนิดและปริมาณของเชื้อที่ได้รับอาการที่พบบ่อยได้แก่มีไข้เฉียบพลันปวดศีรษะรุนแรงหนาวสั่นปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง (มักปวดที่น่อง, โคนขา, กล้ามเนื้อหลังและท้อง) ตาแดงอาจมีไข้ขึ้นลงสลับ ติดต่อกันหลายวันในรายที่รุนแรงพบว่ามีเยื่อหุ้มสมองอักเสบมีผื่นที่เพดานปากโลหิตจางมีจุดเลือดออกตาม ผิวหนัง และเยื่อ ぶดับและไตวายดีซ่านอาการที่มีเยื่อหุ้มสมองอักเสบทำให้ความรู้สึกสับสนเพื่อซึมกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบอาจมีอาการของระบบทางเดินหายใจโดยมีเลือดออกในปอด ในรายที่มีอาการรุนแรง อาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ (6)

อย่างไรก็ตามโรคเลปโตสไปโรซิสมักมีอาการ ไม่จำเพาะ และเป็นหนึ่งใน โรคที่ไม่ทราบสาเหตุที่พบบ่อย ในประเทศไทย (7) หากไม่ได้รับการวินิจฉัยหรือการรักษาอย่างทันที่ อาจมีความรุนแรงสูง จนทำให้ทุพพลภาพหรือเสียชีวิตได้

ปัจจุบัน การตรวจวินิจฉัย มีหลักการตรวจแบ่งเป็น 2 ลักษณะ (8-9) คือ

1. การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง

- การดูด้วยกล้อง dark field microscope / ย้อมด้วย giemsa stain วิธีนี้ไม่จำเพาะและความไวต่ำ
- การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบพิเศษ คือ EMJH เป็นวิธีที่มีความสำคัญทางจุลชีววิทยา เพราะสามารถแสดงตัวเชื้อที่เป็นต้นเหตุ แต่ต้องใช้เวลาานอาจเป็นเดือนเนื่องจากเชื้อเจริญช้า จึงควรทำควบคู่ไปกับการทดสอบอื่นด้วย
- การฉีดเข้าสัตว์โดยตรง โดยใช้ตัวอย่างคนไข้มัดเข้าในหนูตะเภา หรือ แฮมสเตอร์ ทำได้ยากจึงสามารถทำได้เฉพาะในบางห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเท่านั้น
- การตรวจหาแอนติเจนของเชื้อความไวและความจำเพาะขึ้นกับวิธีการตรวจและแอนติบอดีที่ใช้ (10)
- การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR มีความไวและความจำเพาะสูง แต่ต้องอาศัยเทคนิคผู้ชำนาญ ค่าใช้จ่ายสูง

2.การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

การตรวจพบแอนติบอดีจะให้ผลบวก เมื่อผู้ป่วยเริ่มสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อหลังการติดเชื้ออย่างน้อยประมาณ 1 สัปดาห์การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน ส่วนการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ควรใช้ paired sera โดยเจาะห่างกันประมาณ 7-10 วัน แปลผลบวกเมื่อระดับเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 4 เท่าขึ้นไปปัจจุบันวิธีตรวจวินิจฉัยมาตรฐานของโรคนี้หนูคือวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) ใช้สำหรับตรวจหา แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา และสามารถบอก serovar ได้ด้วยนอกจากนี้ ยังมีการตรวจหาแอนติบอดี อีกหลายชนิดเช่น Latex Agglutination, Indirect Hemagglutination test (IHA), Immunofluorescent assay (IFA) และ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

อย่างไรก็ตามการตรวจหาแอนติบอดีมีข้อจำกัด เนื่องจากอาจให้ผลลบลวงในกรณีที่ตรวจในช่วงการติดเชื้อระยะเริ่มต้นก่อนที่ร่างกายจะมีการสร้างแอนติบอดี การแปลผลการติดเชื้อโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคอาจทำได้ยาก เนื่องจากระดับของแอนติบอดีภายหลังติดเชื้อบางครั้งอยู่ได้นานเป็นปี ทำให้ตรวจพบแอนติบอดีในคนที่เคยติดเชื้อมาก่อนแต่ไม่เป็นโรคได้ ดังนั้นต้องอาศัยการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมครั้งที่สองเพื่อยืนยันผล นอกจากนี้วิธีการตรวจโดยเฉพาะวิธี MAT มีความยุ่งยากเนื่องจากต้องใช้เชื้อ serovar ต่างๆ ที่ยังเป็นเชื้อเป็น การอ่านผลต้องมีความชำนาญ ถ้าเป็นการติดเชื้อ serovar นอกเหนือจากที่นำมาใช้เป็นตัวทดสอบอาจให้ผลลบล

LipL32 เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนัก 32 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 272 อะมิโนแอซิด (11) LipL32 เป็นโปรตีนที่ผิวน้ำนอกของเชื้อเลปโตสไปรา (outer membrane protein; OMP) ซึ่งพบในเชื้อเลปโตสไปรา สายพันธุ์ก่อโรคเท่านั้น พบว่ามีความอนุรักษ์สูง เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเชื้อเลปโตสไปราหลายสายพันธุ์ พบว่ามีความเหมือนกันกว่า 95 % เมื่อค้นหาข้อมูลจาก GenBank ไม่พบว่ามีโปรตีนอื่นที่คล้ายกับ LipL32 แสดง

ว่าเป็นโปรตีนที่พบจำเพาะในเชื้อเลปโตสไปราเท่านั้น (12) จากการศึกษาโปรตีนที่สร้างบริเวณผนังส่วนนอก ของเชื้อเลปโตสไปราพบว่า LipL32 เป็น OMP ที่มีการแสดงออกมากที่สุด (13-14) โปรตีนนี้มีการแสดงออก ทั้งในหลอดทดลองและระหว่างที่มีการติดเชื้อในสัตว์และในคน พบว่ามีการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนในสัตว์หรือคนที่ป่วยสามารถตรวจพบโปรตีน LipL32 ในชั้นเนื้อ renal tubular lumen ของ animal model เช่นหนูแฮมสเตอร์ และหนูตะเภาที่ติดเชื้อเฉียบพลัน (acute infection) (15)

มีรายงานการใช้โปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราใช้ในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสเช่น การตรวจทางซีโรโลยีโดยใช้ LipL32 หรือ peptide เป็นแอนติเจนเพื่อหาแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย (16-18) พบว่ามีความจำเพาะและความไวดี แต่อาจมีความไวต่ำลงถ้าตรวจในระยะแรกก่อนมีการสร้างแอนติบอดี ส่วนการตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด ปัสสาวะ ยังมีการศึกษาอยู่จำกัดแต่มีรายงานการตรวจพบแอนติเจนของเชื้อในปัสสาวะตั้งแต่วันแรกของการรับไว้ในโรงพยาบาล (10)

จากปัญหาในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีอยู่ในปัจจุบันดังที่กล่าวข้างต้นแล้วการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่สะดวก รวดเร็วและมีความจำเพาะสูง เป็นชุดตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้แอนติบอดีชนิด monoclonal ที่จำเพาะต่อโปรตีน LipL32 ซึ่งเป็น OMP ที่มีการแสดงออกมากที่สุดของเชื้อเลปโตสไปรา การใช้ monoclonal antibody เพื่อให้มีความจำเพาะสูงและจะประยุกต์ใช้ gold nanoparticles probe มาเป็นเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโดยอาศัยหลักการของ immunochromatographic test การอ่านผลการตรวจวิเคราะห์นี้ทำได้ด้วยตาเปล่า จึงใช้ง่ายและรวดเร็วไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์ในการแปลผล และไม่ต้องอาศัยน้ำยา เทคนิค หรือเครื่องมือเพิ่มเติมเช่น PCR หรือ ELISA plate reader จึงเป็นการลดต้นทุนของน้ำยาและเครื่องมือ อีกทั้งเป็นการย่นระยะเวลาและลดขั้นตอนในการ เตรียมการตรวจวิเคราะห์ เหมาะกับการตรวจในสถานพยาบาลทุกขนาดโดยเฉพาะในชนบทซึ่งมักเป็นพื้นที่ที่มีการระบาด ซึ่งเป็นการตอบสนองหลักการ Point of care detection ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อทำการพัฒนาชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส ในรูปของ Lateral flow strip test โดยใช้ gold และหรือ silver nanoparticles
- 2) เพื่อทำการสร้างแอนติบอดีชนิด monoclonal และ polyclonal ที่จำเพาะต่อโปรตีน LipL32 ของเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจ
- 3) เพื่อศึกษาความไวและความจำเพาะของชุดตรวจ Lateral flow strip test

ขอบเขตการวิจัย

- 1) ผลิตแอนติบอดีชนิด monoclonal และ polyclonal ที่จำเพาะต่อ LipL32
- 2) ติดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรบนแอนติบอดี
- 3) เตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip
- 4) ทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

5) ทดสอบความจำเพาะและความไวของชุด Lateral flow strip โดยใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- | | | |
|--|---|--------|
| 1) ชุดตรวจโรคติดเชื้อจากคอลลอยด์ของอนุภาคระดับนาโนเมตรของทองคำ และเงินซึ่งมีราคาที่ถูกกว่าการตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม และมีศักยภาพที่จะพัฒนานำไปใช้ได้จริงในโรงพยาบาลต่างๆทั่วประเทศ | 1 | ชิ้น |
| 2) สิทธิบัตรผลงานประดิษฐ์ระดับชาติ และ/หรือ นานาชาติ | 1 | ชิ้น |
| 3) งานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ | 2 | ชิ้น |
| 4) การนำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ | 2 | เรื่อง |
| 5) นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา | 1 | คน |
| 6) ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการจัดสร้างชุดตรวจโรคโดยหลักการ lateral flow เพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบ (prototype) ในการพัฒนาจัดสร้างชุดตรวจโรคอื่นๆ ต่อไป | | |

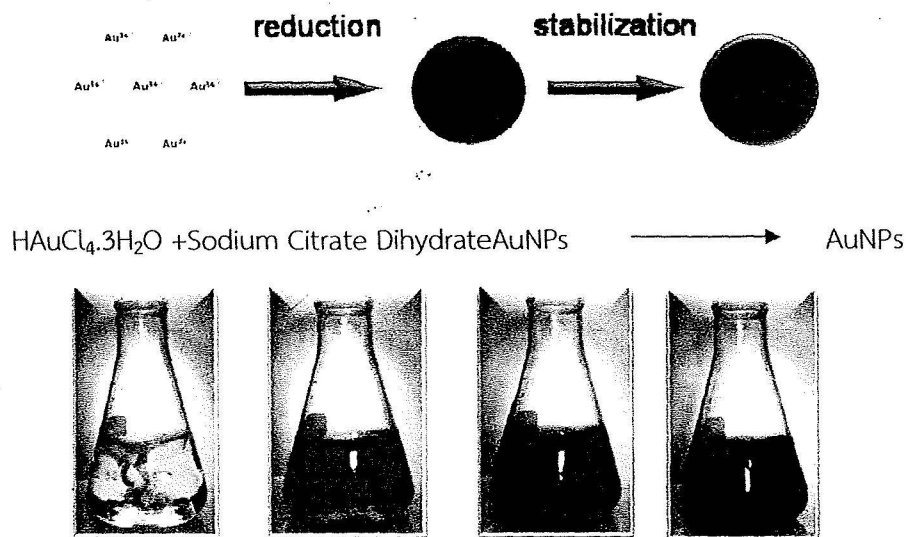
บทที่ 2

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology)

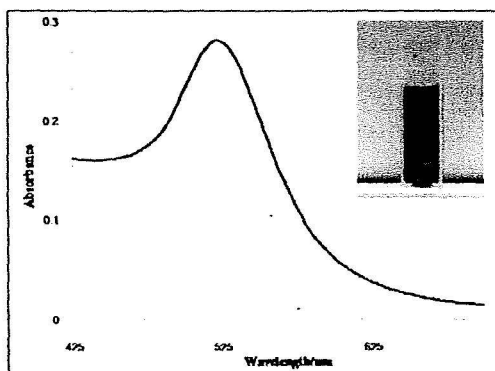
นาโนเทคโนโลยี (Nanotechnology) คือ เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการศึกษา การจัดการ การสร้างการวิเคราะห์ และประยุกต์ใช้วัสดุที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ในระดับนาโนเมตร (ประมาณ 1-100 นาโนเมตร) ซึ่งเทียบเท่ากับระดับอะตอมหรือโมเลกุล (19) รวมถึงการออกแบบหรือการประดิษฐ์เครื่องมือเพื่อใช้สร้างหรือวิเคราะห์ วัสดุในระดับที่เล็กมากๆ เช่น วัสดุนาโน (ท่อนาโน เส้นใยนาโน และอนุภาคนาโน) ซึ่งมีโครงสร้างของวัสดุที่มีคุณสมบัติพิเศษ ทั้งทางด้านฟิสิกส์ เคมี หรือชีวภาพ ต่างไปจากสารเดิมที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้น ในปัจจุบันจึงมีการนำนาโนเทคโนโลยี มาประยุกต์ใช้ในหลากหลายสาขาเช่น ด้านอุตสาหกรรม เทคโนโลยีคอมพิวเตอร์ เทคโนโลยีชีวภาพและทางการแพทย์ เป็นต้น

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (Gold nanoparticles, AuNPs) เป็นอนุภาคของโลหะในระดับนาโน ที่มีความเสถียรสูงชนิดหนึ่ง (20) ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายคอลลอยด์สีแดงในการสังเคราะห์ AuNPs นั้นสามารถทำได้โดยการนำสารละลายของ HAuCl_4 ที่มีทองคำประจุ $3^+(\text{Au}^{3+})$ ทำปฏิกิริยากับตัวรีดิวซ์ (Reducing agent) ได้ AuNPs ที่มีทองคำประจุเป็น 0 (Au^0) ซึ่งยังไม่มีความเสถียร จึงต้องเติมสารช่วยทำให้เสถียร (Stabilizer) โดยสารนี้จะมาล้อมรอบอนุภาค ป้องกันการรวมตัวหรือเกาะตัวกันจนตกตะกอน ทำให้ AuNPs นั้นสามารถคงขนาดและรูปร่างอยู่ในระดับนาโนได้ สารที่นิยมใช้เป็นตัวรีดิวซ์และช่วยทำให้อนุภาคทองคำ เกิดความเสถียร ได้แก่ sodium citrate (21) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์และทำให้ AuNPs มีความเสถียรในคราวเดียวกัน (ภาพที่ 1)



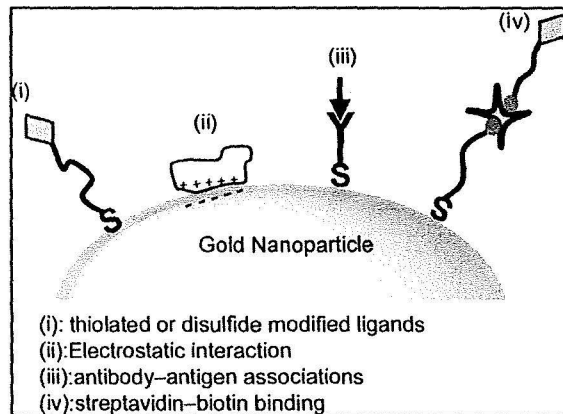
ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการสังเคราะห์ AuNPs จากสารละลาย HAuCl_4 และ sodium citrate ด้วยปฏิกิริยา reduction ในอุณหภูมิที่เหมาะสม (22)

AuNPs มีคุณสมบัติเชิงแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวซึ่งต่างจากทองคำแบบก้อนทั่วไป เมื่อขนาดอนุภาคทองคำเล็กกว่าความยาวคลื่นแสงที่มากกระทบมากๆจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า เซอร์เฟพลาสมอนเรโซแนนซ์ (surface plasmon resonance, SPR) ซึ่งเป็นคลื่นความหนาแน่นของประจุ ที่เกิดจากการสั่นของอิเล็กตรอนอิสระที่มีลักษณะการสั่นพร้อมเพรียงกัน เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยผิวต่อของ AuNPs กับสารไดเล็กทริก ทำให้ AuNPs สามารถดูดกลืนแสงสีเขียวความยาวคลื่นประมาณ 520 นาโนเมตร ซึ่งจะส่งผลให้ AuNPs มีสีแดงทับทิม (ruby red) (23) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แผนภาพแสดงกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm และภาพสารละลายคอลลอยด์ของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร (ภาพเล็ก)

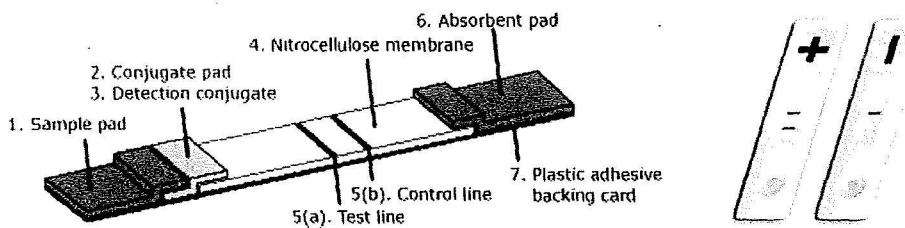
บนพื้นผิวของ AuNPs สามารถปรับปรุงให้มีโมเลกุลต่างๆที่ต้องการมาเคลือบอยู่บนผิวของอนุภาค และนำ AuNPs ที่ปรับปรุงพื้นผิวแล้ว มาใช้เป็นตัวติดตามหรือตัวตรวจจับสารชีวโมเลกุลเป้าหมายได้ เช่น DNA (24), โปรตีน (25), คาร์โบไฮเดรต (26), ยา (27) หรือสี fluorescent (24) ดังภาพที่ 3 ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถนำ AuNPs มาสร้างอุปกรณ์ตรวจจับสารทางชีวภาพ (Biosensor) (28) ที่มีความจำเพาะหลากหลาย โดยการปรับปรุงพื้นผิวของ AuNPs ด้วยสารที่มีความสามารถในการเลือกจำเพาะกับสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หา โดยคอลลอยด์ของ AuNPs จะเปลี่ยนสีเมื่อมีการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอก จึงเปรียบได้ว่า AuNPs ทำหน้าที่เป็นตัวรายงานผล (reporter) สำหรับอุปกรณ์ตรวจวัดทางชีวภาพ



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงการนำ AuNPs ไปประยุกต์ใช้ในทางชีววิทยาและการแพทย์ โดยการนำสารชีวโมเลกุลต่างๆ ไปติดบนพื้นผิวของ AuNPs (24)

การประยุกต์ใช้ AuNPs ใน Lateral flow strip test

การประยุกต์ใช้ AuNPs เป็นตัวรายงาน (reporter) ใน Lateral flow strip test ซึ่งเป็นชุดตรวจคัดกรองโรคที่ใช้ทั่วไปโดยอาศัยหลักการ immunochromatography สามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากแถบสีชมพูของ AuNPs ที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุม (control line) และตำแหน่งทดสอบ (test line) โดยถ้าแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งทดสอบและตำแหน่งควบคุมเท่ากับผลเป็นบวก แต่หากมีแถบสีชมพูเกิดขึ้นที่ตำแหน่งควบคุมเพียงตำแหน่งเดียว เท่ากับผลเป็นลบดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภาพแสดงส่วนประกอบ (A) และการแปลผล (B) ของ Lateral flow strip test

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย วิธีการดำเนินการวิจัย

ตารางที่ 1 แผนการดำเนินการ

กิจกรรม	เดือนที่					
	2	4	6	8	10	12
1.สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโน	■					
2.สร้างและผลิต monoclonal และ polyclonal antibody ต่อ LipL32	■	■	■			
3. ติดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรบนแอนติบอดี			■	■		
4.เตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip			■	■		
5.ทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ				■	■	
6. ทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วย					■	■
7.วิเคราะห์ข้อมูล					■	■
8.สรุปและรายงานผล						■

แผนงาน

แผนงานส่วนที่ 1 แผนการดำเนินงานในช่วงที่ขอรับการสนับสนุน

- 1) การสังเคราะห์อนุภาคทองคำและเงินระดับนาโนเมตร
สังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรจากปฏิกิริยา reduction ของสารละลายของทองคำและเงินตั้งต้น
- 2) การพิสูจน์เอกลักษณ์ของอนุภาคทองคำและหรือเงินระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์
นำอนุภาคทองคำและเงินระดับนาโนเมตรที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค UV-visible spectrometry และนำไปตรวจสอบขนาดและรูปร่างของอนุภาคที่ได้โดยใช้ Transmission Electron Microscope (TEM)

- 3) การพัฒนาแอนติบอดีชนิด polyclonal ที่จำเพาะต่อ LipL32
ทำการผลิต recombinant LipL32 และนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้น
เพื่อให้มีความจำเพาะต่อ LipL32
- 4) การพัฒนาแอนติบอดีชนิด monoclonal ที่จำเพาะต่อ LipL32
ทำการผลิต recombinant LipL32 และนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดหนู
เพื่อนำเซลล์จากม้ามมาสร้าง hybridoma และเลือกโคลนที่ดีที่สุดในการสร้าง
แอนติบอดีและมีความจำเพาะต่อ LipL32
- 5) การติดอนุภาคทองคำและหรือเงินระดับนาโนเมตรบน LipL32-specific antibody
สำหรับตรึงบน Lateral flow strip
- 6) การเตรียมและประกอบชุด Lateral flow strip การตรึงอนุภาคนาโนและแอนติบอดีที่
สังเคราะห์ขึ้นมาเป็นแผ่นตรวจสำเร็จรูปบนเมมเบรนที่เหมาะสม
- 7) เพื่อหาความไวและความจำเพาะต่อแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา
โดยทดสอบปริมาณแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ
เพื่อหาความไวของชุดตรวจ และตรวจหาความจำเพาะว่าไม่มี cross-reactivity
กับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

แผนงานส่วนที่ 2 แผนการดำเนินงานเมื่อโครงการสิ้นสุดหรือในช่วงการผลิตจริง

I. ทดสอบการใช้งานจริงกับตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย

เกณฑ์คัดเลือก case และ control ที่เข้าโครงการวิจัย

Case

- 1) ผู้ป่วยอายุ 15 ปีขึ้นไป ทั้งชายและหญิง
- 2) อาศัยอยู่ในประเทศไทย
- 3) ได้รับการวินิจฉัยสงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจากแพทย์ประจำโรงพยาบาลที่ร่วมโครงการวิจัย
- 4) ไม่มีประวัติการป่วยจากการติดเชื้อ HIV หรือมีอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน
- 5) ไม่มีประวัติป่วยด้วยโรคติดเชื้อเรื้อรังหรือมีภาวะให้สงสัยได้ว่าการติดเชื้อมาในระยะ 2 เดือนก่อนหน้า

Control

- 1) ผู้ป่วยอายุ 15 ปีขึ้นไป ทั้งชายและหญิง
- 2) อาศัยอยู่ในประเทศไทย
- 3) ไม่มีไข้สูงเกินกว่า 38 องศาเซลเซียส และไม่พบภาวะที่บ่งบอกว่าการติดเชื้อในร่างกาย
- 4) ไม่มีประวัติการป่วยจากการติดเชื้อ HIV หรือมีอาการป่วยที่เกี่ยวข้องกับ HIV

ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์ของ case และ control จะถูกส่งตัวอย่าง คือ เลือด ซีรัม และปัสสาวะมาที่ห้องปฏิบัติการของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยการเพาะเชื้อในเลือด การตรวจวิธีมาตรฐาน microscopic agglutination test (MAT) โดยใช้ paired sera การตรวจ real-time PCR หาเชื้อในเลือดและปัสสาวะ และการใช้ชุดตรวจ lateral flow strip test ที่ผู้วิจัยผลิตขึ้น

II. การจัดการเก็บตัวอย่างของผู้ป่วย

ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาจุลชีววิทยา และห้องปฏิบัติการภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะเป็นศูนย์เก็บรวบรวมสิ่งส่งตรวจทั้งหมด โดยการจัดลำดับ code โดยไม่ใช่ชื่อของประชากรที่นำมาศึกษาและไม่ระบุ ประเภทของตัวอย่างทั้งจาก case หรือ control ส่วนหนึ่งของตัวอย่างเลือดและปัสสาวะจะถูกแยกและสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจทาง ห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาติด bar code และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °C ดีเอ็นเอส่วนหนึ่ง จะถูกนำไปเพิ่มปริมาณโดยวิธี real-time PCR ตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่ไม่ได้นำไปสกัดดีเอ็นเอ และซีรัมจะถูกเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อการวินิจฉัยต่อไป

III. การประชาสัมพันธ์และเผยแพร่งานวิจัย

นำชุดตรวจโรคที่ทำจากอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร ไปเผยแพร่และใช้กับผู้ป่วย ที่ได้รับ การวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยในเบื้องต้นจะนำไปใช้ผ่านกลุ่มโรงพยาบาลที่มีความร่วมมือกันอยู่เดิมแล้วคือ รพ.จังหวัด สุรินทร์ ศรีสะเกษ ร้อยเอ็ด จันทบุรี สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร

IV. การจดสิทธิบัตรและเขียนรายงานการวิจัย

ได้มีการจดสิทธิบัตรบางส่วนของงานวิจัยชิ้นนี้ไว้แล้ว โดยจดขั้นตอนการเตรียมชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสโดยใช้อนุภาคทองคำนาโนเมตร ในรูปอนุภาคคอลลอยด์ของเหลว ซึ่งในการศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่าได้ผลดีและมีความจำเพาะและความไวสูง ในการวิจัยนี้จะทำการจดสิทธิบัตรชุดแผ่น ตรวจโรค โดยอาศัยหลักการ microimmunocromatographic lateral flow assay และจัดเขียนตีพิมพ์งานวิจัย นี้ในวารสารวิทยาศาสตร์ระดับนานาชาติ

ตัวชี้วัดความสำเร็จ

- 1) ชุดตรวจโรคติดเชื้อจากคอลลอยด์ของอนุภาคระดับนาโนเมตรของทองคำและเงินซึ่งมีราคาที่ถูกกว่าการตรวจด้วยวิธีดั้งเดิม และมีศักยภาพที่จะพัฒนานำไปใช้ได้จริง
ในโรงพยาบาลต่างๆทั่วประเทศ 1 ชิ้น
- 2) สิทธิบัตรผลงานประดิษฐ์ระดับชาติ และ/หรือ นานาชาติ 1 ชิ้น
- 3) งานวิจัยตีพิมพ์ระดับนานาชาติ 2 ชิ้น
- 4) การนำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ 2 เรื่อง
- 5) นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา 1 คน
- 6) ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการจัดสร้างชุดตรวจโรคโดยหลักการ lateral flow เพื่อนำไปใช้เป็นแม่แบบ (prototype) ในการพัฒนาจัดสร้างชุดตรวจโรคอื่นๆ ต่อไป

ตารางที่ 2 ตารางสรุปแผนงาน

ช่วงเวลา	แผนงาน
ตั้งแต่การลงนามในสัญญา จนถึงการจัดส่งรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1 (4 เดือน หลังจากลงนามในสัญญา)	กิจกรรม: ผลิตแอนติบอดีแบบ polyclonal และ monoclonal ต่อโปรตีน LipL32 ผลลัพธ์และตัวชี้วัด: แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ LipL32 แบบ polyclonal และ monoclonal งบประมาณที่ใช้: 1/3 ของงบประมาณทั้งหมด บทบาทของกลุ่มเป้าหมาย: ผู้มีส่วนสนับสนุนโครงการ: ให้ทุนสนับสนุน ผู้รับผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์: - กลุ่มเป้าหมายผู้มีส่วนได้เสียของโครงการ:-
หลังจากลงนามในสัญญา 8 เดือน จัดส่งรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 (ประชุม/ตรวจเยี่ยมโครงการ)	กิจกรรม: - ติดอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรบนแอนติบอดี - เตรียม ประกอบชุด Lateral flow strip - ทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ผลลัพธ์และตัวชี้วัด: ชุด Lateral flow strip งบประมาณที่ใช้: 1/3 ของงบประมาณทั้งหมด บทบาทของกลุ่มเป้าหมาย: ผู้มีส่วนสนับสนุนโครงการ: ให้ทุนสนับสนุน ผู้รับผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์: - กลุ่มเป้าหมายผู้มีส่วนได้เสียของโครงการ:-
หลังจากลงนามในสัญญา 11 เดือน จัดส่ง (ร่าง) รายงานฉบับสมบูรณ์ (ประชุม)	กิจกรรม: ทดสอบชุด Lateral flow strip โดยใช้ตัวอย่างจากผู้ป่วยและวิเคราะห์หาความจำเพาะและความไวเทียบกับวิธี

	<p>ผลลัพธ์และตัวชี้วัด: ความจำเพาะและความไวของชุด Lateral flow strip</p> <p>งบประมาณที่ใช้: 1/3 ของงบประมาณทั้งหมด</p> <p>บทบาทของกลุ่มเป้าหมาย:</p> <p>ผู้มีส่วนสนับสนุนโครงการ: ให้ทุนสนับสนุน</p> <p>ผู้รับผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์: เก็บตัวอย่างผู้ป่วยและทดลองใช้ชุด Lateral flow strip</p> <p>กลุ่มเป้าหมายผู้มีส่วนได้เสียของโครงการ: ความเป็นไปได้ในการผลิตโดยภาคเอกชน</p>
--	---

บทที่ 4

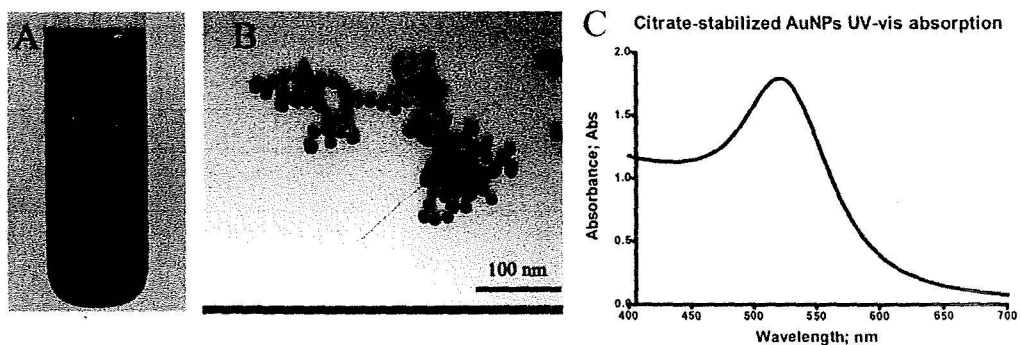
ผลการดำเนินงาน

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนู

1. เตรียมอนุภาคทองคำนาโนเมตร

อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ถูกสังเคราะห์นั้นจะถูกนำไปตรวจสอบคุณสมบัติเช่น ขนาด รูปร่าง การกระจายตัว และคุณสมบัติการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Transmission Electron Microscopy (TEM) และ UV-Vis Spectrophotometer พบว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีรูปร่างเป็นทรงกลม อยู่กระจายตัวกัน โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ที่ 15-20 นาโนเมตร และมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 520.5 นาโนเมตรซึ่งค่านี้มีความสัมพันธ์กับสีแดงของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เราสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งถ้าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ เช่น เกิดการรวมกลุ่มกันของอนุภาคจะทำให้สีของสารละลายเปลี่ยนไป คือเปลี่ยนจากสีแดงไปเป็นสีม่วง ซึ่งก็จะสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงด้วยเช่นกัน ดังแสดงในรูปด้านล่าง

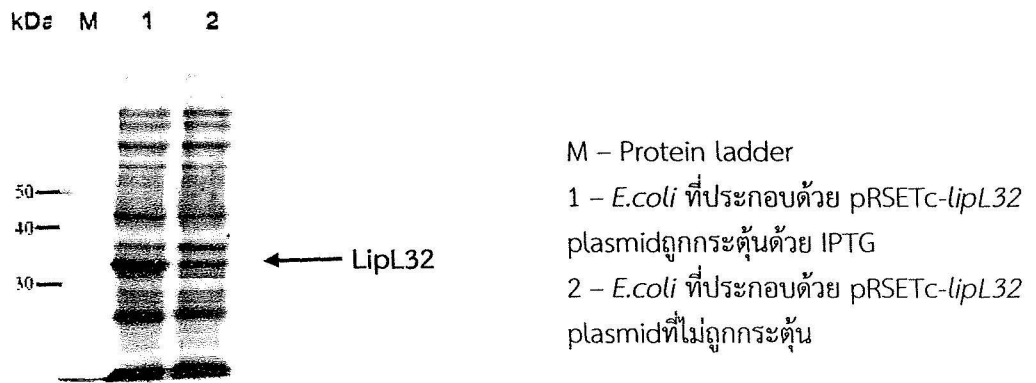
นอกจากนี้การสังเคราะห์อนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรแต่ละครั้งต้องมีการนำไปตรวจสอบคุณสมบัติก่อนนำมาใช้เสมอซึ่งผลที่ได้พบว่าคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่ทำการสังเคราะห์ในแต่ละครั้งมีค่าเหมือน หรือใกล้เคียงกันทุกครั้ง ซึ่งแสดงถึงว่าอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่สังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในแต่ละการทดลองนั้นมีคุณสมบัติที่ไม่แตกต่างกัน



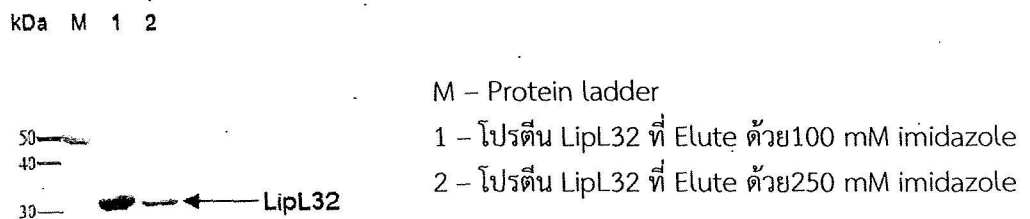
ภาพที่ 5 แสดงคุณสมบัติของอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่เตรียมได้

II. การเตรียม LipL32 Antibody

1. สร้างโปรตีนและสกัดโปรตีน LipL32 ที่นำมาใช้เป็นแอนติเจนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี metal-chelation affinity chromatography

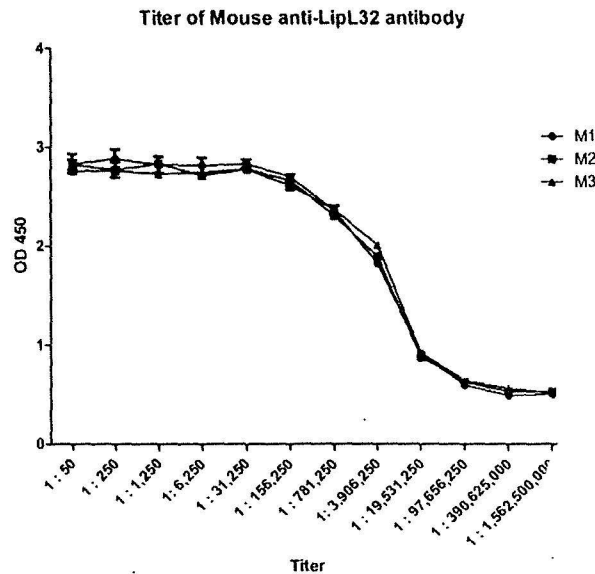


ภาพที่ 6 การสร้างโปรตีน LipL32 ใน *E.coli* ที่มี pRSETc-*lipL32* plasmid และกระตุ้นการแสดงออกด้วย IPTG



ภาพที่ 7 การสกัดโปรตีน recombinant LipL32 ให้บริสุทธิ์โดย affinity chromatography (Ni-NTA column) และ elute โปรตีน LipL32 ด้วย elution buffer ที่ประกอบด้วย 100 mM หรือ 250 mM imidazole

2. ผลิตแอนติบอดีชนิด monoclonal โดยการฉีดแอนติเจนคือรีคอมบิแนนท์โปรตีน LipL32 เข้าหนูทดลอง BALB/c จำนวน 3 ตัวและวัดระดับแอนติบอดีต่อ LipL32 หลังฉีดกระตุ้น 2 ครั้ง พบว่าระดับ end-point titer ของแอนติบอดีต่อ LipL32 สูงกว่า 1:4,000,000 (ภาพที่ 8) ซึ่งเป็นระดับที่สูงมาก ดังนั้นม้ามของหนูจึงพร้อมใช้ในการสร้าง hybridoma



ภาพที่ 8 ระดับของแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ในซีรัมของหนู BALB/c จำนวน 3 ตัว (M1-3) ภายหลังจากการฉีดกระตุ้นด้วยโปรตีน LipL32

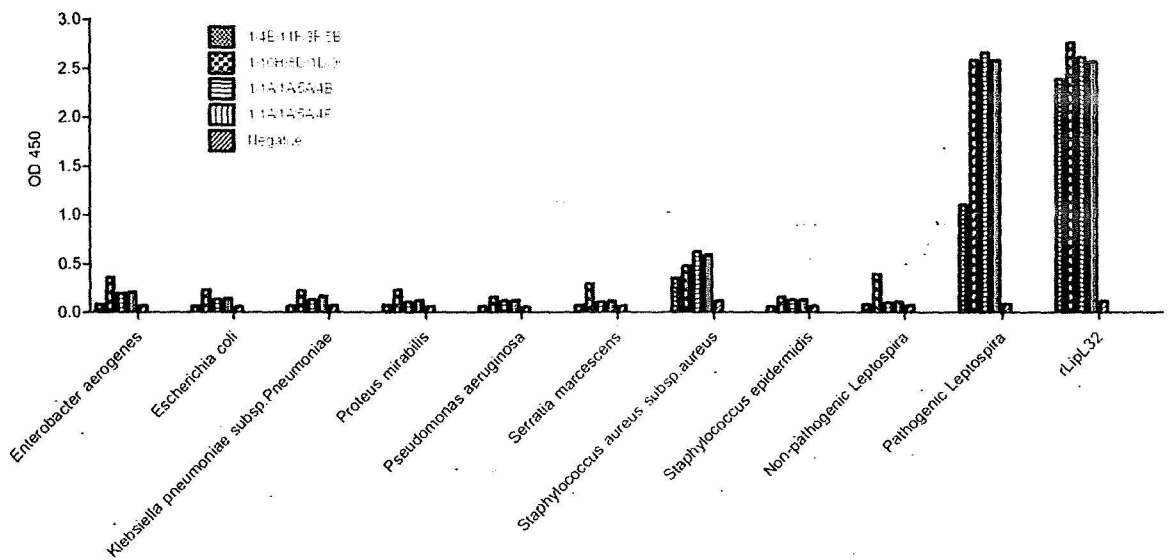
3. นำเซลล์ม้ามของหนูที่ได้มารวมกับ myeloma cell line เพื่อสร้าง hybridoma และทำการคัดเลือก clone ที่สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน แล้วนำ culture supernatant มาสกัดแยก monoclonal antibody และทำการคัดเลือก clone ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนและมีความเสถียรเพื่อใช้ในการผลิต monoclonal antibody ในระยะยาว

คัดเลือกโคลนที่มีคุณสมบัติในการผลิตและหลังแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 แล้วทำการคัดเลือกไฮบริโดมาโดยวิธี limiting dilution เพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มาจากเซลล์ตั้งต้นเดี่ยวที่สร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน LipL32 และ pathogenic *Leptospira* แต่ไม่ cross-react กับ *E. coli* strain BL21 ซึ่งเป็น host strain ที่ใช้สำหรับสร้าง recombinant LipL32 (ตารางที่ 3)

Test	Antigen determining	Number of Positive clones
Screening#1	(+)LipL32	9,888 clones
Screening#2	(+)LipL32 (-)E.coli	156 clones
Screening#3	(+)LipL32 (-)E.coli	135 clones
Limiting#1	(+)LipL32 (+)Pathogenic <i>Leptospira</i> (-)E.coli	37 clones, 99 subclones
Limiting#2	(+)LipL32 (+)Pathogenic <i>Leptospira</i> (-)E.coli	26 clones, 130 subclones
Limiting#3	(+)LipL32 (+)Pathogenic <i>Leptospira</i> (-)E.coli	16 clones, 225 subclones

ตารางที่3 การคัดเลือกไฮบริโดมาที่มีคุณสมบัติในการผลิตและหลังแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 ของเชื้อ *Pathogenic Leptospira* และไม่ cross-reactive กับ *E. coli* โดยวิธี limiting dilution

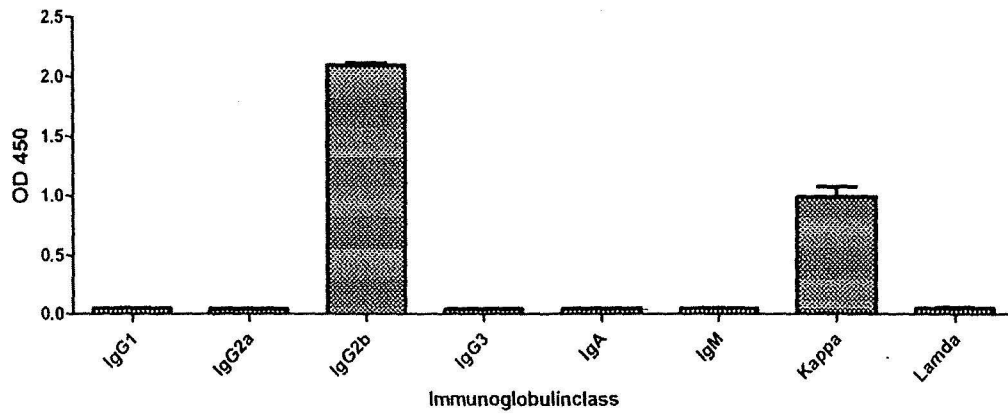
4. เมื่อทำการคัดแยกไฮบริโดมาเซลล์เดี่ยวโดยวิธี limiting dilution ได้โคลนที่มีคุณสมบัติในการผลิตและหลั่งแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน LipL32 และเชื้อ pathogenic *Leptospira* แล้วทำการทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดี โดยคัดเลือกได้ 4 โคลนที่สร้างแอนติบอดีในระดับที่สูงโดยมีความจำเพาะกับโปรตีน LipL32 และเชื้อ pathogenic *Leptospira* serovar Pomona แต่ไม่ cross-react กับ non-pathogenic *Leptospira* serovar Patoc และเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* (ภาพที่ 9)



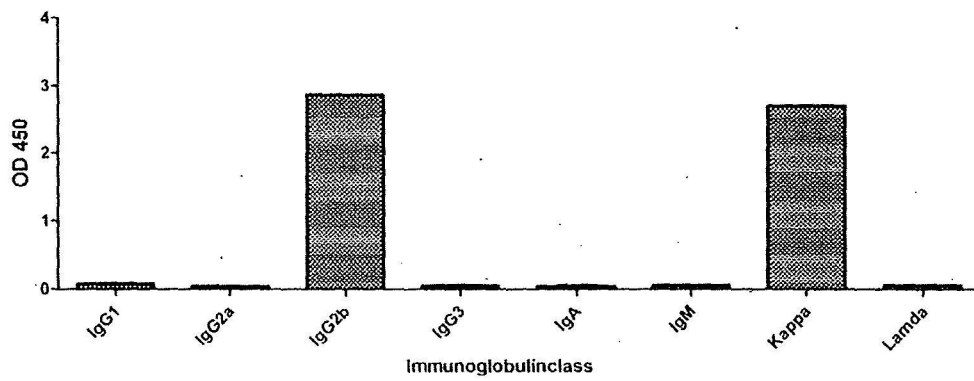
ภาพที่ 9 ความจำเพาะของแอนติบอดีใน culture supernatant ของ 4 ไฮบริโดมาโคลนที่คัดเลือกกว่ามีความจำเพาะต่อโปรตีน LipL32 และเชื้อ Pathogenic *Leptospira* แต่ไม่ cross-react กับ non-pathogenic *Leptospira* และเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกและแกรมลบอื่นๆที่ใช้ทดสอบ

5. ตรวจสอบ isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาที่คัดเลือกด้วยวิธี ELISA โดยพบว่าเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้เป็นโมโนโคลน ดังรูปที่ 5 A-D จากโคลนที่ 1- โคลนที่ 4 ตามลำดับและสรุป isotype ของแต่ละโคลนในตารางที่ 4

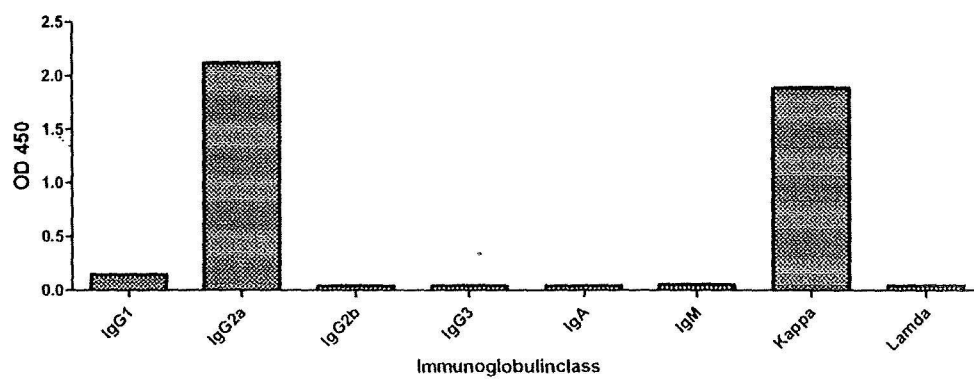
(A) โคลนที่ 1



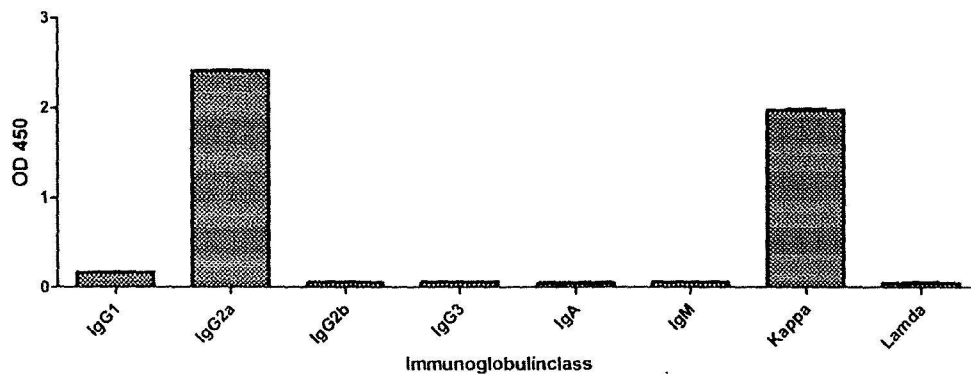
(B) โคลนที่ 2



(C) โคลนที่ 3



(D) โคลนที่ 4



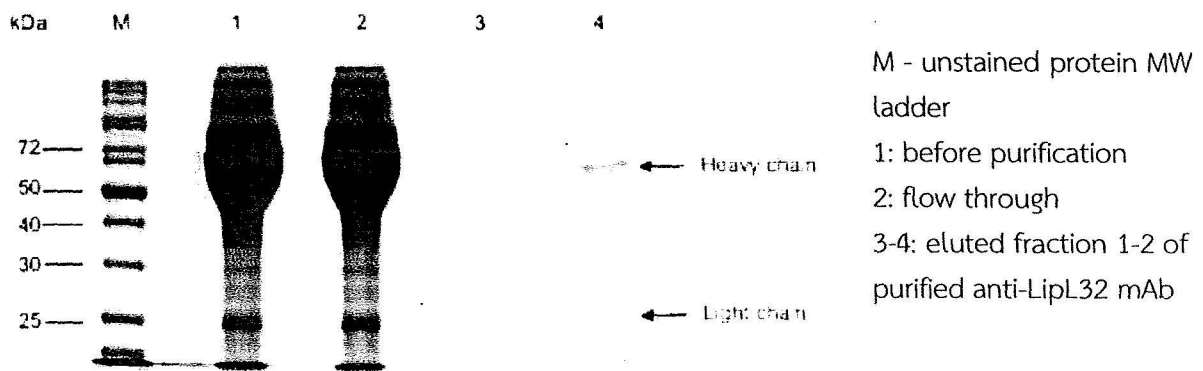
ภาพที่ 10 Isotypeของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ 1-4

ตารางที่ 4 สรุป isotype ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากเซลล์ไฮบริโดมาโคลนที่ 1-4

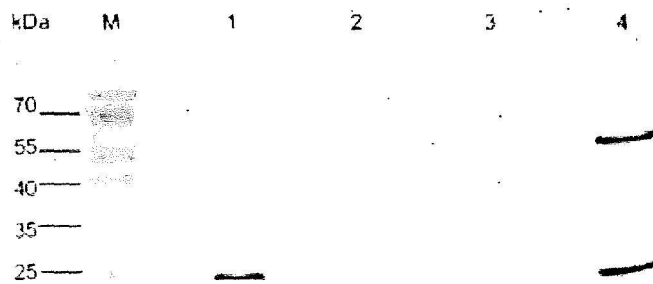
Clone number	Anti-LipL32 mAb	Igisotype	
		Heavy chain	Light chain
1	1/4E/11F/3F/5B	Gamma 2b	Kappa
2	1/10H/8D/1D/9C	Gamma 2b	Kappa
3	1/1A/1A/5A/4B	Gamma 2a	Kappa
4	1/1A/1A/5A/4F	Gamma 2a	Kappa

6. สกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่อยู่ใน culture supernatant ของไฮบริโดมาโคลนให้บริสุทธิ์ โดยเลือก 1 โคลนคือ 1/1A/1A/5A/4B โดยใช้ LipL32-coupled sepharoseHiTrap column พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการอยู่ใน fraction ที่ 2 ของการ elution (lane 4) (ภาพที่ 11A, SDS-PAGE และ 11B, Western blot)

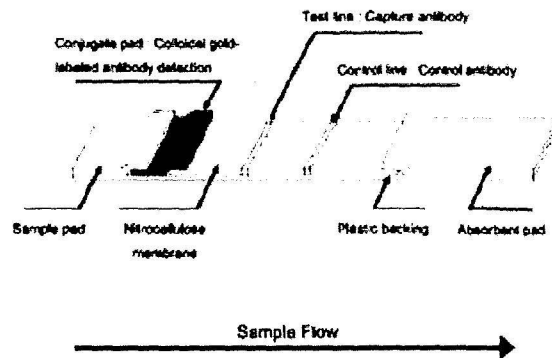
A) SDS-PAGE



B) Western blot โดยใช้ alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-mouse IgG



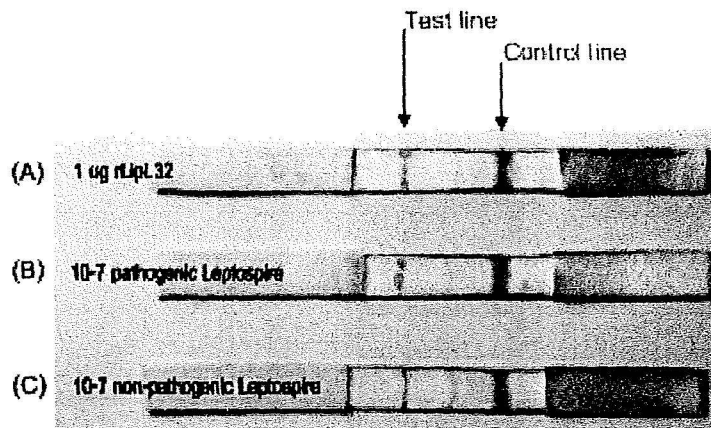
ภาพที่ 11 การสกัดโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์โดยใช้ LipL32-coupled sepharoseHiTrap column พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการอยู่ใน fraction ที่ 2 (lane 4) A) SDS-PAGE และ B) Western blot โดยใช้ goat anti-mouse IgG



ภาพที่ 13 แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส(lateral flow strip) ประกอบด้วย sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane และ absorbent pad โดย detection antibody คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ต่อกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อยู่ที่ conjugate pad, capture antibody คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 อยู่ที่ test line, control antibody คือ anti-rabbit IgGอยู่ที่ control line

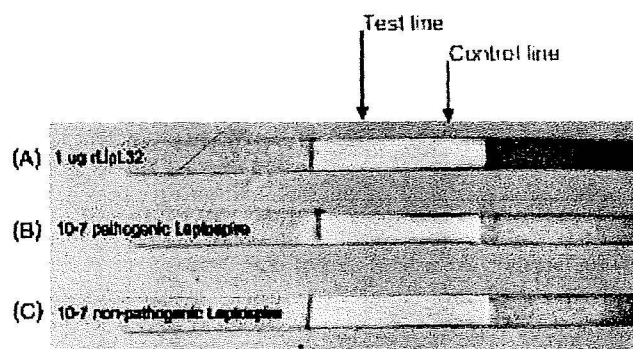
ทำการปรับภาวะต่างๆที่ใช้กับ lateral flow strip test ให้เหมาะสม เช่น running buffer, ปริมาณของ แอนติบอดีบน test line เพื่อให้สามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) โดยมีโปรตีน LipL32 เป็น positive control และ non-pathogenic *Leptospira*เป็น negative control ดังนี้

9.1 ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ที่บริเวณ test line และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ติดกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตรที่บริเวณ conjugate pad และ distilled water เป็น running buffer พบว่ามีการจับแบบไม่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเนื่องจากให้ผลบวก ทุกตัวอย่างรวมทั้ง negative control (ภาพที่ 14)



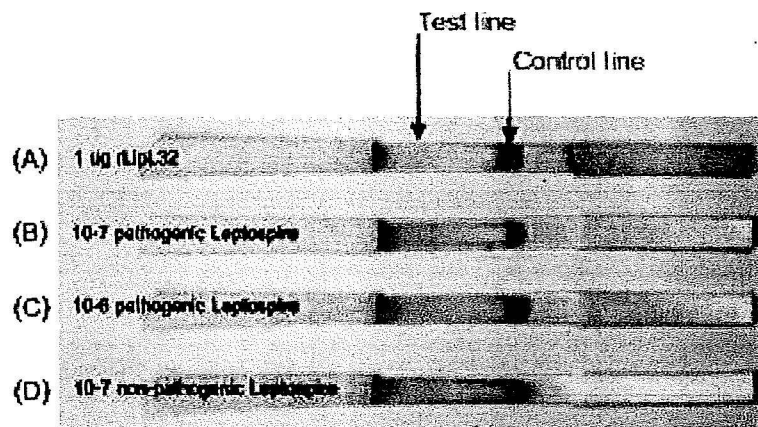
ภาพที่ 14 การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (lateral flow strip) โดย detection antibody คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ต่อกับอนุภาคทองคำระดับนาโนเมตร อยู่ที่ conjugate pad, capture antibody คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 อยู่ที่ test line, control antibody คือ anti-rabbit IgG อยู่ที่ control line โดยมี distilled water เป็น running buffer ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) จำนวน 10^7 ตัว โดยมีโปรตีน LipL32 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมเป็น positive control และ non-pathogenic *Leptospira* จำนวน 10^7 ตัวเป็น negative control

9.2 เปลี่ยน running buffer เป็น 20% formamide ใน 0.1XPBS (ภาพที่15) พบว่าเป็นสถานะที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากแอนติเจนและแอนติบอดีไม่สามารถจับกันได้เลยรวมทั้ง positive control



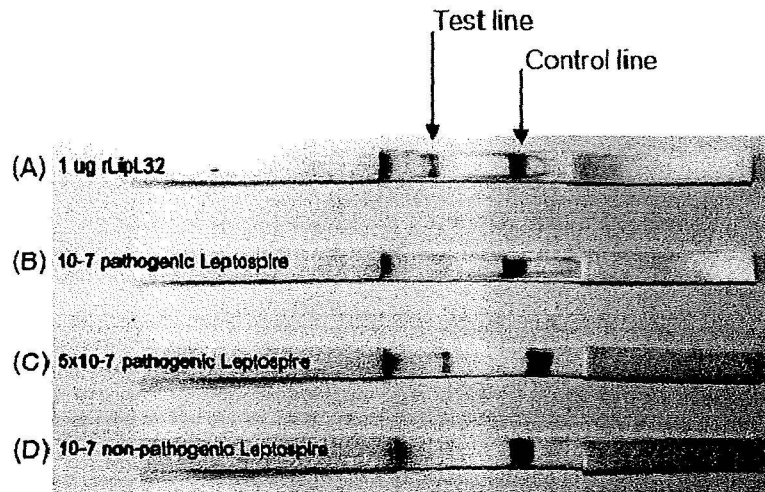
ภาพที่15 การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (lateral flow strip) โดยมี 20% formamide ใน 0.1XPBS เป็น running buffer ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค

9.3 เปลี่ยน running buffer เป็น 5% formamide ใน 0.1XPBS (ภาพที่ 16) พบว่าการจับกันระหว่างแอนติบอดีที่บริเวณ control line สามารถจับกันได้ แต่การจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่บริเวณ test line ไม่สามารถจับกันได้ แสดงว่าสถานะนี้ยังไม่เหมาะสม



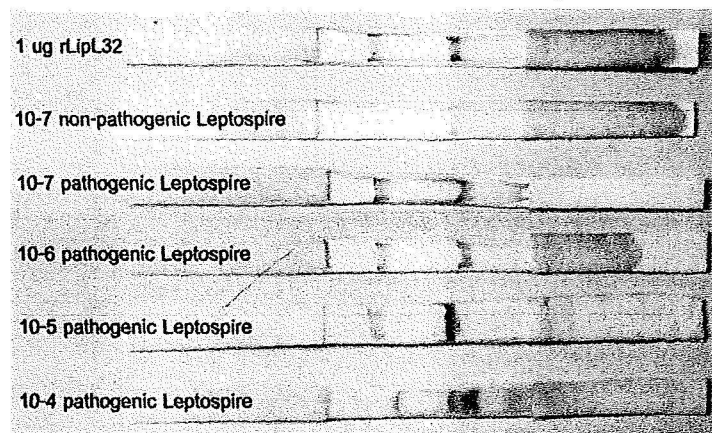
ภาพที่16 การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (lateral flow strip) โดยมี 5% formamide ใน 0.1XPBS เป็น running buffer ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) จำนวน 10^6 และ 10^7 ตัว โดยมีโปรตีน LipL32 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมเป็น positive control และ non-pathogenic *Leptospira* จำนวน 10^7 ตัวเป็น negative control

9.4 เปลี่ยน running buffer เป็น 0.1XPBS (ภาพที่ 17) พบว่าแอนติเจนและแอนติบอดีสามารถจับกันได้ ที่ภาวะนี้ แต่ต้องใช้แอนติเจน (Pathogenic *Leptospira*) ปริมาณมากถึง 5×10^7 จึงจะสามารถตรวจได้



ภาพที่17 การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (lateral flow strip) โดยมี 0.1XPBS เป็น running buffer ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) จำนวน 5×10^7 และ 10^7 ตัว โดยมีโปรตีน LipL32 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมเป็น positive control และ non-pathogenic *Leptospira* จำนวน 10^7 ตัวเป็น negative control

9.5 เพิ่มความไวในการตรวจหาโดยเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ที่บริเวณ test line จาก 1 μ l เป็น 2 μ l of anti-LipL32 monoclonal antibody (0.05 mg/ml) (ภาพที่ 18) สามารถตรวจหาเชื้อ Pathogenic *Leptospira* ได้อย่างน้อยจำนวน 10^4 ตัว



ภาพที่18 การทดสอบชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (lateral flow strip) โดยมี 0.1XPBS เป็น running buffer และเพิ่มปริมาณโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน LipL32 ที่บริเวณ test line เป็น 2 μ l of anti-LipL32 monoclonal antibody (0.05 mg/ml) ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) จำนวน 10^4 - 10^7 ตัว โดยมีโปรตีน LipL32 ปริมาณ

โดยสรุป จากผลการทดลองยังต้องทำการทดสอบกับเชื้อปริมาณน้อยกว่า 10^4 เพื่อหาว่าในสภาวะที่ทำการทดสอบสามารถตรวจหาเชื้อได้น้อยที่สุดเท่าไรหรือจะต้องเพิ่มความไวในการตรวจหาอย่างไรเพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อปริมาณน้อยได้ดี

III. การตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคฉี่หนูจากสิ่งแวดล้อมและจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

1. การตรวจหาเชื้อก่อโรคฉี่หนูจากแหล่งน้ำท่วมขัง ได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากกรุงเทพและปริมณฑล ในตำแหน่งที่มีภาว่น้ำท่วมขังในช่วงปีที่ผ่านมา โดยเลือกจากตัวอย่างทั้งหมด 49 ตัวอย่าง โดยนำมาบั่นให้ได้ตะกอนและ สิ่งปลอมปนที่เข้มข้น เพื่อเตรียมทำการตรวจหาเชื้อ ก่อโรคฉี่หนูโดยวิธี Polymerase chain reaction
2. การตรวจหาเชื้อก่อโรคฉี่หนูจากสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อกันติดเชื้อ ได้ทำการประสานงานกับโรงพยาบาลใน จ. สระบุรี คือ

2.1) โรงพยาบาลพระพุทธบาท ได้ประสานงานกับหน่วยเวชศาสตร์ป้องกันของ โรงพยาบาล ในการประสานงานส่งตรวจเลือด และปัสสาวะ โดยใช้ชุดตรวจที่คณะผู้วิจัยผลิตขึ้น เทียบกับวิธี PCR

2.2) โรงพยาบาลหนองแค ได้ประสานงานกับภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม และฝ่ายเวชกรรมชุมชน โรงพยาบาลหนองแค เพื่อประสานงานในการขอรับตัวอย่างเลือดและปัสสาวะจากผู้ป่วย ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อโรคฉี่หนู

ผลจากการประสานงานในปีที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยและทางรพ.พบว่า ผู้ป่วยที่มาตรวจที่ รพ. ทั้งสองแห่ง ในปี 2555 ไม่มีผู้ที่มีอาการเข้าข่ายสงสัยว่าจะป่วยด้วยโรคฉี่หนู เนื่องจากปี 2555 ไม่พบภาว่น้ำท่วม โดยเฉพาะในเขตรับผิดชอบของรพ. ทั้งสองแห่ง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะระดับนโยบาย

โดยสรุป งานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการจัดสร้างและพัฒนาชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสในรูปแบบตรวจโรคโดยใช้อนุภาคนาโนเมตร แบ่งเป็นการทำงานสามขั้นตอน ประกอบด้วย

- I. เตรียมอนุภาคทองคำนาโนเมตร
- II. การเตรียม LipL32 Antibody
- III. การตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคลึ้นจากสิ่งแวดล้อมและจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

จากผลการทดลองผลิตชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส พบว่าความไวยังไม่เป็นดังที่ต้องการ ยังต้องทำการทดสอบกับเชื้อปริมาณน้อยกว่า 10^4 เพื่อหาว่าในสถานะที่ทำการทดสอบสามารถตรวจหาเชื้อได้น้อยที่สุดเท่าไรหรือจะต้องเพิ่มความไวในการตรวจหาอย่างไรเพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อปริมาณน้อยได้ดี

ความโดดเด่นของผลผลิตจากงานวิจัย/สิ่งประดิษฐ์

ชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสที่พัฒนาขึ้น มีความโดดเด่นดังนี้

1. ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างของผู้ป่วย โดยหลักการจึงสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ในช่วงสัปดาห์แรกของการติดเชื้อ ต่างจากชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสส่วนใหญ่ที่มีจำหน่ายในปัจจุบันซึ่งเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลาจนกว่าระดับแอนติบอดีจะสูงขึ้นจนถึงระดับที่ตรวจพบได้ในสัปดาห์ที่สองของการติดเชื้อ ทำให้ไม่เหมาะในการใช้ตรวจวินิจฉัยในช่วงแรก
2. วิธีการทดสอบและการแปลผลทำได้ง่ายและรวดเร็ว
3. ต้นทุนต่ำ ถ้าผลิตในปริมาณมาก ทำให้ราคาถูกลง

Model กระบวนการ/ขั้นตอนการส่งผลผลิตจากงานวิจัย/สิ่งประดิษฐ์ สู่กลุ่มผู้ใช้ประโยชน์

หลังจากพัฒนาชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิสและมีการทดสอบความจำเพาะและความไวโดยใช้ตัวอย่างที่เป็นเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการแล้วจะนำไปทดลองใช้ในโรงพยาบาลที่ได้รับความร่วมมือซึ่งเป็นโรงพยาบาลที่อยู่ในพื้นที่ที่มีรายงานการระบาดของโรค หรือมีรายงานว่าเชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อประจำถิ่นมีรายงานผู้ป่วยอย่างสม่ำเสมอ ผู้วิจัยจะนำชุดตรวจโรคไปแนะนำวิธีการใช้ให้แพทย์หรือนักเทคนิคการแพทย์ที่เกี่ยวข้องได้รับทราบ รวมทั้งขอให้เก็บข้อมูลของผู้ป่วยที่อาจมีผลต่อการทดสอบ เช่น อายุ เพศ อาการและอาการแสดงที่เข้าได้กับโรคเลปโตสไปโรซิส ระยะเวลาที่ป่วยจนมาโรงพยาบาล ประวัติการรักษาก่อนหน้านี้ โรคประจำตัว เป็นต้น นอกจากนี้ จำเป็นต้องขอความร่วมมือเก็บตัวอย่างผู้ป่วย เพื่อนำไปเพาะเชื้อ ตรวจด้วยวิธี PCR และตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน เพื่อจะได้นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์หาความจำเพาะและความไวของชุดตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส

ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้น ทำให้ไม่สามารถดำเนินการตามที่น่าเสนอไว้ และแนวทางการแก้ไขมีดังนี้

1. การพัฒนาชุดตรวจโรคมีความล่าช้า ที่สำคัญคือการผลิต monoclonal antibody ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาอันยาวนาน อย่างไรก็ตาม แผนการวิจัยได้นำเสนอการใช้ polyclonal antibody ร่วมด้วย ซึ่งผลิตได้ง่ายและรวดเร็วกว่า จึงจะนำมาใช้ผลิตเป็นชุดตรวจโรคในระยะแรกก่อน
2. ความจำเพาะและความไวของชุดตรวจโรคต่ำ จะใช้การปรับปรุงการผลิตชุดตรวจ ในระยะแรกจะใช้ gold nanoparticle ในการผลิต ถ้ายังมีความไวไม่เพียงพอ จะใช้ทำการเพิ่มความไวโดยใช้ silver enhancement ส่วนความจำเพาะสูงจำเป็นต้องทำการค้นหา hybridoma clone ที่ผลิต monoclonal antibody ที่จำเพาะและทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นหลายชนิดเพื่อลดโอกาสของ cross-reactivity กับแอนติเจนอื่น
3. จำนวนตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสน้อย จะติดต่อโรงพยาบาลอื่นเพิ่มเติมเพื่อหาผู้ป่วยให้มากขึ้น และระหว่างดำเนินการวิจัยมีรายงานการระบาดของโรคในพื้นที่ใด จะลงพื้นที่เพื่อขอความร่วมมือกับโรงพยาบาลในการเก็บตัวอย่าง
4. ผลจากการประสานงานในปีที่ผ่านมา ทางคณะผู้วิจัยและทางรพ.พบว่า ผู้ป่วยที่มาตรวจที่รพ. ในปี 2555 ไม่มีผู้ที่มีอาการเข้าข่ายสงสัยว่าจะป่วยด้วยโรคนี้ เหตุเนื่องจากปี 2555 ไม่พบภาวะน้ำท่วม โดยเฉพาะในเขตรับผิดชอบของรพ. ทั้งสองแห่ง

ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์ สังคม และสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสยังมีความยุ่งยากและใช้เวลานาน ทำให้กลุ่มผู้วิจัยพัฒนาชุดตรวจ โรคเลปโตสไปโรซิสที่ง่ายต่อการใช้ วิธีการทดสอบและการแปลผลทำได้รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือ ราคาแพง และไม่ต้องใช้ประสบการณ์ หรือความรู้ระดับสูง จึงสามารถนำไปใช้ในโรงพยาบาลได้ตั้งแต่ระดับโรงพยาบาลชุมชนขนาดเล็ก ซึ่งเป็นสถานพยาบาลที่มีโอกาสให้การตรวจวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วยในระยะแรกมากที่สุด ทำให้ผู้ป่วยได้รับการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เป็นการลดอัตราทุพพลภาพและอัตราการตายได้ ถือเป็นการรักษาทรัพยากรมนุษย์ที่มีค่าของประเทศโดยเฉพาะประชากรกลุ่มเสี่ยง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นประชากรที่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม และอยู่ในวัยทำงานที่มีโอกาสสัมผัสแหล่งรังโรค หรือสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนเชื้อ การตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องทำให้การรายงานระบาดวิทยาของโรคถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น สามารถรายงานการระบาดของโรคและสถานการณ์การเกิดโรคที่เป็นปัจจุบัน เพื่อเป็นการวางแผนมาตรการการป้องกันและควบคุมโรคได้อย่างทันทั่วถึงและต่อเนื่องต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาสิ่งแวดล้อมให้ถูกสุขลักษณะและพัฒนาให้ประชากรมีความรู้และคุณภาพชีวิตที่ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ ชุดตรวจโรคนี้มีต้นทุนการผลิตต่ำ จึงมีราคาถูก เป็นการลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ สามารถประหยัดงบประมาณของรัฐได้อีกทางหนึ่ง

การดำเนินงานในช่วงต่อไป

- 1) ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อก่อโรคฉี่หนูในตัวอย่างน้ำจากแหล่งที่มีน้ำท่วมขังโดยวิธี PCR
- 2) ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อก่อโรคฉี่หนูในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของผู้ที่สงสัยว่ามีการติดเชื้อโดยวิธี lateral flow strip test เทียบกับการตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR
- 3) เขียนรายงานและเอกสารสำหรับส่งตีพิมพ์ผลงานวิจัย
- 4) จัดสิทธิบัตรระดับชาติ 1 ฉบับ

บรรณานุกรม

1. Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 757-71.
2. Tangkanakul, W., Smits, H. L., Jatanasen, S. et al. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36: 281-8.
3. Tangkanakul, W., Siriarayaporn, P., Pool, T. et al. Environmental and travel factors related to leptospirosis in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2001; 84: 1674-80.
4. Adler, B., de la Pena Moctezuma, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 2010; 140: 287-96.
5. Ko, A. I., Goarant, C., Picardeau, M. et al. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 736-47.
6. Evangelista, K. V., Coburn, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010; 5: 1413-25.
7. Leelarasamee, A., Chupaprawan, C., Chenchittikul, M. et al. Etiologies of acute undifferentiated febrile illness in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2004; 87: 464-72.
8. Palaniappan, R. U., Ramanujam, S., Chang, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2007; 20: 284-92.
9. Toyokawa, T., Ohnishi, M., Koizumi, N. Diagnosis of acute leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9: 111-21.
10. Saengjaruk, P., Chaicumpa, W., Watt, G. et al. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 480-9.
11. Haake, D. A., Chao, G., Zuerner, R. L. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 2276-85.
12. Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B. et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun.* 2001; 69: 4958-68.

13. Cullen, P. A., Xu, X., Matsunaga, J. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun.* 2005; 73: 4853-63.
14. Malmstrom, J., Beck, M., Schmidt, A. et al. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature.* 2009; 460: 762-5.
15. Nally, J. E., Whitelegge, J. P., Bassilian, S. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun.* 2007; 75: 766-73.
16. Fernandes, C. P., Seixas, F. K., Coutinho, M. L. et al. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. *Hybridoma.* 2007; 26: 35-41.
17. Dey, S., Mohan, C. M., Ramadass, P. et al. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. *Indian J Med Res.* 2008; 128:172-7.
18. Aviat, F., Rochereau-Roulet, S., Branger, C. et al. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2010; 33: 375-87.
19. Ramsden JJ. What is nanotechnology? *Nanotechnology perception.* 2005;1: 3-15.
20. Zhou J, Ralston J, Sedev R, David A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2009;331: 251-62.
21. Baptista P, Pereira E, Eaton P. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *ABC.* 2007;391: 943-50.
22. Modified from www.nanoprobes.com/Vol8_Iss5.html.
23. Sato K, Hosokawa K, Maeda M. Colorimetric biosensors based on DNA-nanoparticle conjugates. *JSAC.* 2007;23: 17-20.
24. Ackerson CJ, Sykes MT, Kornberg RD. Defined DNA/nanoparticle conjugates. *PNAS.* 2005;102: 13383-5.

25. Storhoff JJ, Elghanian R, Mucic RC, Mirkin CA, Letsinger RL. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes. *J AmerChem Soc.* 1998;120: 1959-64.
26. Reynolds AJ, Haines AH, Russell DA. Gold glyconanoparticles for mimics and measurement of metal ion-Mediated carbohydrate-carbohydrate interactions. *Langmuir.* 2006;22: 1156-63.
27. Condon A. Designed DNA molecules: principles and applications of molecular nanotechnology. *Nature Reviews Genetics.* 2006;7: 565-75.
28. Pingarro JM, Yáñez-Sedeño P, Lez-Cortés AG. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *ElectrochimicaActa.* 2008;53: 5848-66.

ภาคผนวก ก

THE TABLE OF AMOUNT OF MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCING CELL
EXPERIMENT 1: SCREENING

Screening positive clone									
Selected from		(*) rLpL32 (-) E.coli, BL21							
NO.	Name	NO.	Name	NO.	Name	NO.	Name	NO.	Name
1	1/1A	34	4/8A	67	8/9G	100	11/9D	133	13/11H
2	1/2F	35	4/8F	68	8/10F	101	11/9E	134	13/12A
3	1/3H	36	4/9B	69	9/5A	102	11/10D	135	13/12E
4	1/4A	37	4/10F	70	9/5C	103	11/11F		
5	1/4F	38	4/11B	71	9/5E	104	11/12E		
6	1/4I	39	4/11H	72	9/5H	105	12/1A		
7	1/5C	40	4/11G	73	9/6L	106	12/1H		
8	1/5G	41	4/12B	74	9/6J	107	12/2C		
9	1/6H	42	5/3B	75	9/6I	108	12/3G		
10	1/7H	43	5/8H	76	9/7A	109	12/4H		
11	1/8H	44	5/10C	77	9/7H	110	12/5D		
12	1/9I	45	6/2D	78	9/8H	111	12/6C		
13	1/9G	46	6/3B	79	9/10H	112	12/8D		
14	1/9H	47	6/4F	80	10/1H	113	12/9A		
15	1/10H	48	6/5C	81	10/2H	114	12/10H		
16	1/5A	49	6/7I	82	10/2L	115	12/10G		
17	1/11B	50	6/8D	83	10/3H	116	12/11B		
18	1/10C	51	6/9D	84	10/3G	117	12/11H		
19	1/2C	52	6/12C	85	10/5A	118	12/11H		
20	1/3C	53	7/2B	86	10/6A	119	12/12C		
21	1/4A	54	7/7B	87	10/6I	120	12/12D		
22	1/5C	55	7/9A	88	10/6H	121	12/12L		
23	1/6C	56	8/1E	89	10/7A	122	12/12G		
24	1/10F	57	8/2A	90	10/8D	123	13/1A		
25	1/11G	58	8/2H	91	10/10D	124	13/1B		
26	1/12A	59	8/4D	92	10/12A	125	13/1H		
27	1/12B	60	8/4F	93	10/12C	126	13/2F		
28	1/3H	61	8/9G	94	10/12H	127	13/3L		
29	1/10G	62	8/4H	95	11/2C	128	13/3H		
30	1/2F	63	8/5C	96	11/4B	129	13/4C		
31	1/2G	64	8/5D	97	11/4L	130	13/9A		
32	1/5F	65	8/6B	98	11/5B	131	13/10D		
33	1/6F	66	8/6D	99	11/4F	132	13/11B		

EXPERIMENT 2: LIMITING DILUTION#1

Positive clone from limiting#1								
Selected from			(+) rLipL32 (-) E.coli, BL21					
NO.	Name	L#1	NO.	Name	L#1	NO.	Name	L#1
1	1/1A	1A	34		11F	67		2D
2	1/4E	10C	35		11G	68		2G
3		10D	36		12F	69		3C
4		10E	37	B2H	2E	70		3E
5		11F	38		2F	71		3G
6		12B	39		3B	72	11/4B	4D
7	1/7H	12H	40		3C	73		4E
8	1/10H	7L	41		3D	74		5D
9		8D	42		3E	75		5E
10	3/1C	10F	43	B3D	5G	76		6A
11		3E	44		5H	77		6D
12		3H	45		6E	78	11/10D	10H
13	3/2C	4A	46	B3D	8C	79		10G
14		4B	47		8D	80	12/11	10B
15	3/12B	4E	48		9C	81		10C
16	4/1G	8B	49	B6B	11A	82		10D
17		8D	50	9/5A	12L	83	12/2C	1G
18		8E	51		12I	84		2D
19		8H	52	9/5C	1C	85		2I
20		9G	53		1L	86		3I
21		9H	54		3D	87		3H
22	4/2A	11D	55		3E	88	12/3C	4B
23	5/3B	3E	56	9/5H	8B	89	12/12C	1E
24	6/2D	10D	57		9D	90		2A
25	6/4B	1G	58	9/6E	11B	91		3E
26		2B	59	9/7A	9D	92	12/12D	4E
27		2D	60		9E	93		4E
28	6/9D	6E	61	10/3G	7L	94		5I
29		6F	62	10/10D	11C	95		5H
30	8/1L	9E	63	10/12H	12D	96	13/3L	10L
31		9G	64		12G	97		11A
32		9H	65		12H	98	13/4C	1G
33	8/2A	10E	66	11/3C	1E	99		1D

EXPERIMENT 3: LIMITING DILUTION#2

Positive clone from limiting#2							
Selected from		(+ rLipL32, (+) native LipL32					
		(-) E.coli, BL21					
NO.	Name	L#1	L#2	NO.	Name	L#1	L#2
1	1/1A	1A	4E	34			6C
2			4F	35			6F
3			5A	36		2D	8B
4			6F	37			8F
5	1/4L	11F	1C	38	6/9D	6E	10L
6			4F	39			10G
7			3L	40		6I	11D
8			3F	41			1G
9		12B	6I	42	8/2A	10I	1L
10	1/10H	8D	1D	43			3A
11			2D	44	8/2A	11H	5A
12	3/1C	10I	4C	45			6B
13		3E	7D	46		12I	8C
14	3/2C	4A	10D	47			8E
15			11A	48	8/2H	2F	4A
16			11D	49			3B
17			12H	50		3B	8H
18		4B	1H	51			6C
19			3A	52		3C	7F
20			3F	53			8A
21	3/12B	4E	6C	54		3D	10I
22	4/1G	2H	8D	55			11A
23			9H	56		3E	11D
24		5G	11G	57			1I
25			12D	58	8/4D	5H	7I
26		9H	2D	59			7I
27			3C	60	10/3G	7L	7L
28			3H	61			8C
29	4/2I	11D	4G	62			9H
30			6E	63			9C
31	6/4H	1G	1G	64			9G
32			3C	65	10/10D	11C	11D
33		2H	5G	66			11I

EXPERIMENT 3: LIMITING DILUTION#2 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	NO.	Name	L#1	L#2
67			2D	103			11B
68			3E	104			11F
69	11/3C	2D	4D	105		3F	1H
70			5C	106		3H	4D
71			5D	107			4E
72			6D	108			5B
73		2G	7D	109	12/3C	4B	7D
74		3C	11A	110			7F
75			11F	111			9C
76			11G	112	12/12C	2A	10D
77		3F	11	113			10L
78			2G	114			12G
79			3G	115		3F	1G
80	11/4B	4D	7D	116			2L
81			7E	117			3C
82		4E	10E	118	12/12D	4E	4D
83			10G	119			4I
84			11A	120		5I	7D
85			12G	121			7I
86		5D	2C	122		5H	10D
87			2D	123			12G
88		5I	5G	124	13/3B	10E	1G
89			6I	125			2C
90		6A	8A	126		11A	3G
91			8C	127	13/4C	1C	8L
92			8E	128			9B
93		6D	10F	129			9L
94			10G	130		1D	11H
95			10H				
96	11/10D	10G	1D				
97	12/1H	10C	4H				
98			5I				
99			6E				
100		10D	7I				
101			8B				
102	12/2C	2D	10E				

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3

Positive clone from limiting#3				
Selected from		(+ rLipL32, (+) native LipL32		
		(+ E.coli, BL21		
NO.	Name	L#1	L#2	L#3
1	1/1A	1A	5A	1/1A/1A/5A/6
2				1/1A/1A/5A/6
3	1/1E	1E	1E	1/1E/1E/1E/1A
4			3E	1/1E/1E/3E/5A
5				1/1E/1E/3E/5B
6				1/1E/1E/3E/6C
7	1/10H	8D	1D	1/10H/8D/1D/9C
8	3/1C	10E	4C	3/1C/10E/4C/1A
9				3/1C/10E/4C/1C
10	3/2C	1A	10D	3/2C/1A/10D/9A
11				3/2C/1A/10D/9B
12			11A	3/2C/1A/11A/7A
13				3/2C/1A/11A/7B
14			11D	3/2C/1A/11D/9A
15			12H	3/2C/1A/12H/1A
16		4B	11	3/2C/4B/11/1A
17				3/2C/4B/11/1B
18				3/2C/4B/11/2E
19				3/2C/4B/11/2F
20			3A	3/2C/4B/3A/1A
21				3/2C/4B/3A/1B
22			3E	3/2C/4B/3E/5A
23	3/12B	4L	6C	3/12B/4L/6C/7A
24				3/12B/4L/6C/7B
25	4/1G	8H	8D	4/1G/8H/8D/9C
26				4/1G/8H/8D/10D
27				4/1G/8H/8D/10E
28			9I	4/1G/8H/9I/12C
29				4/1G/8H/9I/12D
30				4/1G/8H/9I/12L
31		9G	12D	4/1G/9G/12D/8E
32		9H	2D	4/1G/9H/2D/6F
33			3C	4/1G/9H/3C/7E

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
34				4/1G/9H/3C/1H
35	64B	1G	1G	6/4B/1G/1G/3A
36				6/4B/1G/1G/3B
37				6/4B/1G/1G/3C
38				6/4B/1G/1G/3D
39				6/4B/1G/1G/3H
40			3C	6/4B/1G/3C/5A
41				6/4B/1G/3C/5B
42		2B	6C	6/4B/2B/6C/9A
43				6/4B/2B/6C/9B
44		2D	8E	6/4B/2D/8E/1D
45				6/4B/2D/8E/1H
46				6/4B/2D/8E/1G
47				6/4B/2D/8E/1H
48				6/4B/2D/8E/2A
49				6/4B/2D/8E/2H
50				6/4B/2D/8E/2C
51				6/4B/2D/8E/2D
52			8E	6/4B/2D/8E/3C
53				6/4B/2D/8E/3D
54				6/4B/2D/8E/3C
55				6/4B/2D/8E/4B
56				6/4B/2D/8E/4D
57	69D	6L	10E	6/9D/6L/10E/5B
58				6/9D/6L/10E/5C
59				6/9D/6L/10E/5D
60				6/9D/6L/10E/6E
61			10G	6/9D/6L/10G/7B
62				6/9D/6L/10G/7D
63		6F	1G	6/9D/6F/1G/11B
64				6/9D/6F/1G/11C
65				6/9D/6F/1G/12A
66				6/9D/6F/1G/12B
67	82A	10F	1F	8/2A/10F/1F/2A
68				8/2A/10F/1F/2B
69				8/2A/10F/1F/2C

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
70				B2W101/11/2D
71				B2W101/11/2E
72				B2W101/11/2F
73				B2W101/11/2G
74				B2W101/11/2H
75			3A	B2W101/3A/2A
76				B2W101/3A/3B
77				B2W101/3A/3C
78				B2W101/3A/3L
79				B2W101/3A/4C
80				B2W101/3A/4G
81				B2W101/3A/4H
82		1H	5H	B2W111/5H/6A
83				B2W111/5H/6B
84				B2W111/5H/6C
85				B2W111/5H/6D
86				B2W111/5H/6E
87				B2W111/5H/6F
88				B2W111/5H/6G
89				B2W111/5H/6H
90			6B	B2W111/6B/8A
91				B2W111/6B/8B
92				B2W111/6B/8C
93				B2W111/6B/8D
94				B2W111/6B/8E
95				B2W111/6B/8F
96				B2W111/6B/8G
97				B2W111/6B/8H
98		1F	8C	B2W121/8C/9B
99				B2W121/8C/9C
100				B2W121/8C/9D
101				B2W121/8C/9E
102				B2W121/8C/9G
103				B2W121/8C/9H
104				B2W121/8C/10A
105				B2W121/8C/10L

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
106			8C	82A/12F/8E/12A
107				82A/12F/8E/12B
108				82A/12F/8E/12C
109				82A/12F/8E/12D
110				82A/12F/8E/12E
111				82A/12F/8E/12F
112				82A/12F/8E/12G
113				82A/12F/8E/12H
114	82H	2F	3A	82H2F/3A/1G
115				82H2F/3A/1D
116				82H2F/3A/1E
117				82H2F/3A/1G
118				82H2F/3A/2E
119				82H2F/3A/2G
120			3B	82H2F/3B/3D
121				82H2F/3B/3E
122				82H2F/3B/3F
123				82H2F/3B/3H
124				82H2F/3B/3G
125				82H2F/3B/3D
126				82H2F/3B/3E
127		3B	4H	82H3B/4H/4G
128		3D	10E	82H3D/10E/1A
129				82H3D/10E/1B
130				82H3D/10E/1C
131				82H3D/10E/1D
132				82H3D/10E/1E
133				82H3D/10E/2E
134			11A	82H3D/11A/3B
135				82H3D/11A/3C
136				82H3D/11A/3D
137				82H3D/11A/3E
138				82H3D/11A/3H
139		3E	1D	82H3E/1D/5A
140				82H3E/1D/5B
141				82H3E/1D/5C

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
142			1E	8/21/3E/1E/7A
143				8/21/3E/1E/7B
144				8/21/3E/1E/7C
145				8/21/3E/1E/7D
146				8/21/3E/1E/8A
147	10/3G	7E	7E	10/3G/7E/7E/7D
148				10/3G/7E/7E/7E
149				10/3G/7E/7E/7G
150				10/3G/7E/7E/7H
151				10/3G/7E/7E/8A
152			8C	10/3G/7E/8C/8E
153				10/3G/7E/8C/8G
154			8H	10/3G/7E/8H/8H
155			9C	10/3G/7E/9C/7A
156				10/3G/7E/9C/7B
157				10/3G/7E/9C/7C
158				10/3G/7E/9C/7D
159				10/3G/7E/9C/7E
160				10/3G/7E/9C/7H
161			9C	10/3G/7E/9C/9A
162				10/3G/7E/9C/9B
163				10/3G/7E/9C/9C
164				10/3G/7E/9C/9D
165	10/10D	11C	3D	10/10D/11C/1D/3D
166			1H	10/10D/11C/1H/3H
167				10/10D/11C/1H/3H
168			2D	10/10D/11C/2D/7H
169	11/3C	2D	4D	11/3C/2D/4D/11A
170				11/3C/2D/4D/11B
171				11/3C/2D/4D/11C
172				11/3C/2D/4D/11D
173				11/3C/2D/4D/11E
174			5C	11/3C/2D/5C/1A
175				11/3C/2D/5C/1B
176			5D	11/3C/2D/5D/3A
177				11/3C/2D/5D/3B

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
178			6D	113C2D6D7A
179				113C2D6D7C
180				113C2D6D7D
181				113C2D6D7E
182				113C2D6D8A
183		2G	7D	113C2G7D7C
184		3C	11A	113C3C/11A9A
185				113C3C/11A9B
186				113C3C/11A9C
187				113C3C/11A10A
188				113C3C/11A10D
189			1H	113C3C/11H11A
190				113C3C/11H11B
191				113C3C/11H11C
192			11G	113C3C/11G9B
193				113C3C/11G9C
194				113C3C/11G9D
195				113C3C/11G9E
196		3I	1I	113C3I/11I9C
197				113C3I/11I9E
198				113C3I/11I9G
199				113C3I/11I9H
200			2G	113C3G/2G9A
201				113C3G/2G9C
202				113C3G/2G9E
203				113B4D/7D9C
204	12/12D	9I	7D	1212D9I/7D9B
205				1212D9I/7D9C
206			7E	1212D9I/7E9A
207		5I	30D	1212D5I/10D9A
208				1212D5I/10D9B
209				1212D5I/10D9C
210				1212D5I/10D9D
211				1212D5I/10D9E
212			12G	1212D5I/12G11C
213	13/9L	30L	2G	139L30L/2G9A

EXPERIMENT 4: LIMITING DILUTION#3 (CON'T)

NO.	Name	L#1	L#2	L#3
214		11A	4G	13/3E/11A/4G/5E
215	13/4C	1C	8E	13/4C/1C/8E/8A
216				13/4C/1C/8E/8B
217				13/4C/1C/8E/8F
218				13/4C/1C/8E/8G
219				13/4C/1C/8E/8H
220			9B	13/4C/1C/9B/10E
221			9E	13/4C/1C/9E/11C
222				13/4C/1C/9E/11D
223				13/4C/1C/9E/12G
224		1D	11H	13/4C/1D/11H/1G
225				13/4C/1D/11H/2A

ภาคผนวก ข

BUFFER AND REAGENTS

Reagents for EMJH media

1. Albumin fatty acid supplement stock solution

CaCl ₂ + MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.076 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04 g
CuSO ₄ · H ₂ O	0.03 g
Vitamin B12	0.002 g
Tween 80	1 ml
Glycerol	1 ml

All reagents are stored at -20°C until use.

Dissolve each reagent separately in 10 ml of distilled water.

2. Albumin fatty acid supplement solution, ready to use (50ml)

BSA	5 g
CaCl ₂ + MgCl ₂ · 6H ₂ O	750 µl
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	500 µl
CuSO ₄ · 5H ₂ O	50 µl
FeSO ₄	0.025 g
Sodium pyruvate	0.02 g
Vitamin B12	500 µl
Tween 80	6.25 ml
Glycerol stock	500 µl

Dissolve in distilled water and adjust pH 7.4-7.6 with concentrated HCl. Adjust volume with distilled water to make 50 ml. Sterilize the solution by filtration. Store at -20°C.

3. Basal Media (90 ml)

BactoLeptospira Media Base EMJH dehydrated 0.23 g

Dissolve in distilled water and adjust volume to 90 ml. Sterilize the solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

4. EMJH media

Basal Media	90 ml
Albumin fatty acid supplement solution	10 ml

Mix the solution and store at 4 °C

Reagents for SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1. 1 M Tris-HCl pH 8.8

Tris base 12.11 g

Dissolve in distilled water and adjust pH to 8.8 with HCl (conc). Adjust volume with distilled water to make 100 ml. Sterilize the solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

2. 0.5 M Tris-HCl pH 6.8

Tris base 6.055 g

Dissolve in distilled water and adjust pH to 6.8 with concentrated HCl. Adjust volume with distilled water to make 100 ml. Sterilize the solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

3. 4X TrisHCl/SDS pH 8.8 (100 ml)

Tris base	18.21 g
SDS	0.4 g

Dissolve in distilled water and adjust pH to 8.8 with concentrated HCl. Store at 4°C.

4. Running Buffer (1 liter)

Tris base	15.1 g
Glycine	72 g
SDS	5.0 g

Dissolve in distilled water and adjust volume to 1,000 ml. Store at room temperature.

5. 6X sample buffer with DTT (10 ml)

4X TrisHCl/SDS pH 8.8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
DTT	0.93 g

Bromphenol Blue 1.2 mg

Dissolve the solution and adjust volume to 10 ml. Store at room temperature.

6. 10% Ammonium Persulfate (APS)

APS 1 g
Distilled water 10 ml
Mix the solution and store at -20°C

7. 10% Sodium lauryl sarcosine (SDS)

Sodium lauryl sarcosine (SDS) 1 g
Distilled water 10 ml
Mix the solution and store at room temperature.

8. 30% Acrylamide/0.8% Bisacrylamide (100 ml)

Acrylamide 30 g
Bisacrylamide 0.8 g

Dissolve the solution in distilled water and adjust volume to 100 ml. Sterilize the solution by filtration. Store in the dark at room temperature.

9. 15% SDS-PAGE

Separating gel (15 ml)

Acrylamide/bis 6.0 ml
1 M Tris-HCl pH 8.8 3.75 ml
10% SDS 0.15 ml
10% APS 75 μ l
TEMED 7.5 μ l
Distilled water 4.0 ml

Stacking gel (5 ml)

Acrylamide/Bis 0.67 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.5 ml
10% SDS 40 μ l
10% APS 40 μ l
TEMED 4.0 μ l
Distilled water 2.7 ml

Reagents for Western blot

1. TBS (1 liter)

1 M Tris base pH 7.5	20 ml
NaCl	29.22 g

Dissolve in distilled water and adjust volume to 1 liter. Sterilize the solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

2. TBS-0.1% (v/v) Tween (500 ml)

TBS	500 ml
Tween-20	500 μ l

Mix the solution and store at room temperature.

3. Blotting buffer (1 Liter)

Tris base	2.42 g
Glycine	11.24 g
Distilled water	800 ml

Dissolve in distilled water and add 200 ml methanol. Store at room temperature.

4. Alkaline Phosphate buffer (1 Liter)

1 M Tris base pH 9.5	50 ml
NaCl	2.922 g
2 M $MgCl_2$	625 μ l

Dissolve in distilled water and adjust volume to 1 liter. Sterilize the solution by autoclaving at 121°C for 15 minutes.

Reagents for Protein Purification

1. Binding Buffer, 20 mM Imidazole (500 ml)

1X Phosphate buffer saline pH 7.4 495 ml

2 M Imidazole stock solution pH 7.4 5 ml

2. Elution Buffer, 500 mM Imidazole (100 ml)

1X Phosphate buffer saline pH 7.4 95 ml

2 M Imidazole stock solution pH 7.4 25 ml

3. 20% Ethanol (Metal-Affinity Chromatography)

Absolute Ethanol 100 ml

Dissolve in distilled water and adjust volume to 500 ml with distilled water.

4. 10X PBS (Phosphate buffer saline), pH 7.4

NaCl 40 g

KCl 1 g

NaHPO₄ 5.75 g

KH₂PO₄ 1 g

Deionized distilled water 1000 ml

Sterilized the solution by autoclaving 121 °C, 15 minutes

Mix the solution and store at room temperature.

5. 1X PBS, pH 7.4

10X PBS 100 ml

Sterilized deionized distilled water 900 ml

Mix the solution and store at room temperature.

Reagent for indirect ELISA

1. Coating buffer

NaHCO ₃	7.13 g
Na ₂ CO ₃	1.59 g

Dissolve in distilled water to 1000 ml and adjust pH to 9.5 with 10N NaOH.

Store at room temperature.

2. Blocking buffer

1XPBS	100
ml	
Tween 20	50
µl	
BSA	1 g

Mix the solution and store at 4 °C.

3. Washing buffer

1XPBS	100
ml	
Tween 20	100
µl	

Mix the solution and store at room temperature.

4. Stop reaction solution

0.5 M H ₂ SO ₄	2.67
ml	
Distilled water	97.33
ml	

Mix the solution and store at room temperature.

5. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Substrate

Reagent A	5ml
Reagent B	5ml

Mix the solution in the dark at room temperature.

Reagent for cell culture

1. Complete RPMI 1640 (100 ml)

RPMI 1640	87 ml
Fetal bovine serum (FBS)	10 ml
Penicillin G / Streptomycin 100 U/ml	1ml
Sodium pyruvate	1 ml
Glucose	1 ml

Mix the solution and store at 4 °C.

2. HAT media (100 ml)

Complete RPMI 1640	98 ml
100X HT	1ml
100X A	1 ml

Mix the solution and store at 4 °C.

3. 100X HT (10 ml)

Hypoxanthine	13.6 mg
Thymidind	3.8 mg
DW sterile	10 ml

Heat gently at 70 °C if they do not dissolve completely.

Filter sterilizes the solution independently. Storage at -20 °C.

4. 100X A (10 ml)

Aminopterin	3.8 mg
DW sterile	10 ml

Add 50 µl of 1 N NaOH to dissolve.

Titration with 1 N HCl to neutral pH.

Filter sterilizes the solution independently. Storage at -20 °C.

5. Freezing media (100 ml)

RPMI 1640	67 ml
FBS	20 ml
Penicillin G / Streptomycin 100 U/ml	1ml
Sodium pyruvate	1 ml

Glucose	1 ml
DMSO	10 ml

Mix the solution and store at 4 °C.

6. Fetal bovine serum (FBS) inactivation

Before using FBS, FBS must be inactivated at 56 °C for 30 minutes using water bath.