

Abstract

Project Code: MRG5280067

Project Title: Rapid diagnosis of leptospirosis by loop-mediated isothermal amplification

Investigator: Dr. Piengchan Sonthayanon

Department of Clinical Tropical Medicine and Department of Molecular Tropical
Medicine and Genetics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University.

e-mail addresses: piengchan@tropmedres.ac; tmsy@mahidol.ac.th

Project Period: March 2009- March 2011

Leptospirosis has the greatest impact on health in developing countries, but there is a paucity of diagnostic tests that are suitable for technology-restricted settings. We describe the development and clinical evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting the 16S ribosomal RNA gene (*rrs*) of *Leptospira* spp. belonging to the pathogenic and intermediate groups. The lower limit of detection was 20 genomic equivalents/reaction, and the analytical specificity was high with positive LAMP reactions for pathogenic and intermediate group *Leptospira* spp. but negative reactions for non-pathogenic *Leptospira* spp. and a range of other bacterial species that may cause acute febrile illness. A case-control study was conducted in northeast Thailand to evaluate assay performance in 133 patients with laboratory-proven leptospirosis based on culture and/or the microscopic agglutination test (MAT), and 133 patients with other causes of acute febrile illness. Using whole DNA extracted from EDTA blood taken at presentation, *rrs* LAMP was positive in 58/133 cases (sensitivity 43.6; 95%CI: 35.0-52.5), and 22/133 controls (specificity 83.5; 95%CI: 76.0-89.3). Diagnostic sensitivity was higher for a subset of 39 patients who were culture positive for *Leptospira* spp (84.6; 95%CI: 69.5-94.1). Our results indicate that *rrs* LAMP can provide a rapid result in around half of patients with leptospirosis at the time of presentation, but its diagnostic utility is reduced by an imperfect specificity.

Keywords: Leptospirosis; Loop-mediated isothermal amplification; diagnosis

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5280067

ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส (โรคฉี่หนู) โดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification

ชื่อนักวิจัย ดร.เพ็ญจันทร์ สมนานนท์

ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาโครงการ มีนาคม 2552 ถึง มีนาคม 2554

โรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนูเป็นปัญหาสำคัญด้านการสาธารณสุขในหลายประเทศ เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคยังคงมีข้อจำกัดในด้านอุปกรณ์และงบประมาณที่จะนำไปใช้ในทุกพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาด ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยวิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) จากยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Leptospira* โดยสามารถตรวจสอบในห้องปฏิบัติการได้ต่ำสุดในระดับ 20 genomic equivalents/reaction และมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Leptospira* สายพันธุ์ที่ก่อโรค (pathogenic and intermediate group) และไม่จำเพาะต่อเชื้อ *Leptospira* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่อาจพบในผู้ป่วยโรคฉี่หนูไม่ทราบสาเหตุ นอกจากนี้ ผู้วิจัยได้ทำการประเมินผลวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสโดยวิธี LAMP ที่พัฒนาขึ้น แบบ case-control study โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างจำนวน 266 ตัวอย่าง ได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จากการให้ผลบวกด้วยวิธีการเพาะเชื้อและ/หรือวิธีการทางอิมมูโนโลยี (Microscopic agglutination test) จำนวน 133 ราย และกลุ่มควบคุม 133 ราย โดยทำการตรวจสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม พบว่า วิธี LAMP ให้ผลบวกในกลุ่มผู้ป่วย 58 ใน 133 รายกล่าวคือมีความไวในการวินิจฉัย (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 43.6 (95%CI: 35.0-52.5) และ มีความจำเพาะในการวินิจฉัย (specificity) ร้อยละ 83.5 (95%CI: 76.0-89.3). อย่างไรก็ตาม ความไวในการตรวจวินิจฉัย (Diagnostic sensitivity) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเพียงอย่างเดียวมีค่าสูงถึงร้อยละ 84.6 (95%CI: 69.5-94.1) กล่าวโดยสรุปคือวิธีการที่ได้พัฒนาดังกล่าว แม้ว่าจะให้ผลตรวจที่รวดเร็วและแม่นยำมากในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำไปใช้ในการตรวจตัวอย่างผู้ป่วยจากแหล่งระบาด พบว่าให้ผลบวกเพียงครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยเท่านั้น โดยรายงานนี้จะได้นำเสนอในรายละเอียดต่อไป

คำหลัก: โรคเลปโตสไปโรซิส; Loop-mediated isothermal amplification; การตรวจวินิจฉัย