



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ วิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ

และ

การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิกิน

โดย ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

และคณะ

สิงหาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ วิทยานิพนธ์เพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อ
และ
การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกิน

ผู้วิจัย : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา

และคณะ

สังกัด : คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

มหาวิทยาลัยมหิดล (ก่อน กันยายน 2545)

คณะสหเวชศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต (ปัจจุบัน)

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.)
ฝ่ายสนับสนุนการวิจัยเชิงวิชาการ ประเภททุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
รุ่นที่ 5 15 สิงหาคม พ.ศ. 2543 ถึง 14 สิงหาคม 2546

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
สารบัญ	ii
สารบัญตาราง	xi
สารบัญภาพ	xiv
บทคัดย่อ	xviii
Abstract	xxv
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	xxxii
Executive Summary	xl
โครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา	
เรื่อง “วิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อและการพัฒนาวัคซีนป้องกัน โรคอหิวาต์ชนิดกิน” สิงหาคม 2543 ถึง สิงหาคม 2546	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 1	2
วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 2	2
วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 3	3
ระเบียบวิธีวิจัยที่เสนอไว้โดยสรุป	3
โครงการย่อยที่ 1	3
โครงการย่อยที่ 2	3
โครงการย่อยที่ 3	3
โครงการย่อยที่ 1	
การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส	
(Development of a ready-to-use diagnostic test kit for leptospirosis)	5

	หน้า
รายละเอียดของงานวิจัยโครงการย่อยที่ 1	6
วัสดุและวิธีการ	
I. การเพาะเลี้ยง <i>Leptospira</i> spp. serovars ต่าง ๆ เพื่อเตรียมแอนติเจนและการเตรียม heterologous antigens	6
อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ <i>Leptospira</i>	6
1. Liquid medium	6
2. Semisolid medium	6
II. การเตรียม <i>Leptospira</i> homogenates และ homogenates จาก bacteria อื่นๆ ไวรัส ริคเก็ตเซีย และเชื้อรา	8
III. แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา	8
3.1 โมโนโคลนาลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies; MAb)	8
3.2 Polyclonal antibodies (PAb)	11
IV. ตัวอย่างส่งตรวจ	14
4.1 ตัวอย่างส่งตรวจจากมนุษย์ (human specimens)	14
4.1.1 ผู้ป่วย Leptospirosis	14
4.1.2 ผู้ป่วยกลุ่มควบคุม (Patient controls)	25
4.1.3 กลุ่มควบคุมลบ (Negative controls)	25
4.2 ตัวอย่างจากวัว	25
4.2.1 ตัวอย่างปัสสาวะและเลือด	25
4.2.1.1 ตัวอย่างจากวัวที่เคยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Test samples)	25
4.2.1.2 ตัวอย่างจากวัวที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Control samples)	26
Processing of cattle samples	26
ก. ตัวอย่างปัสสาวะ	26
ข. ตัวอย่างเลือด	26

	หน้า
4.2.2. ตัวอย่าง semens ของวัว	26
V. การเพาะเชื้อ <i>Leptospira</i> จาก specimens ของผู้ป่วย	27
การเพาะแยกเชื้อ <i>Leptospira</i> จากเลือดของผู้ป่วย (hemoculture)	27
การเพาะแยก <i>Leptospira</i> จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย	27
VI. การตรวจหาเชื้อใน culture ด้วย dark-field microscope	27
VII. การ subculture เชื้อ <i>Leptospira</i>	28
VIII. การทดสอบยืนยัน <i>Leptospira</i> ใน specimens ที่เพาะเลี้ยงไว้	28
IX. Serological assays ที่ใช้ตรวจหา antibodies ในซีรัมของผู้ป่วย presumptive leptospirosis	30
Microscopic agglutination test (MAT)	30
X. วิธี Indirect immuno-fluorescence assay (IFA)	30
XI. การพัฒนาวิธี monoclonal antibody-based dot-blot ELISA (MAb dot-ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ <i>Leptospira</i> ในปัสสาวะของผู้ป่วย	31
11.1 การเตรียม detection reagent (monoclonal antibodies เฉพาะต่อเชื้อ <i>Leptospira</i>)	31
11.2 ELISAs	32
11.2.1 Indirect ELISA	32
11.2.2 Monoclonal antibody-based dot-(blot) ELISA (MAb dot-ELISA)	32
11.3 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการทดสอบหา <i>Leptospira</i> antigen	33
XII. การทำ SDS-PAGE และ Western blot analysis (WB)	34
XIII. การพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อวินิจฉัยการปนเปื้อนเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะและ semen bank ของวัว	35
13.1 การ extract DNA จากตัวอย่างของวัว	35
การ extract DNA จากปัสสาวะ	35
การ extract DNA จาก semen	35

	หน้า
13.2 PCR Primers	35
13.3 DNA amplification	36
13.4 การตรวจ PCR products	36
13.5 Analytical sensitivity ของ PCR	36
13.6 Analytical specificity (ความเฉพาะ) ของ PCR	37
XIV. การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในคนโดยการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างเลือด	37
14.1 ตัวอย่างเลือด และการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาแอนติเจน	37
14.2 Sandwich ELISA	37
ผลการวิจัยโครงการย่อย ที่ 1	39
1. ผลการตรวจหา <i>Leptospira</i> antigen ในตัวอย่าง ปัสสาวะของคน	39
2. Antibody Sandwich ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ ซีรัม และพลาสมาของตัวอย่างกลุ่มที่ 5	43
3. Antibody Sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนของ <i>Leptospira</i> ในตัวอย่างกลุ่มที่ 6	43
การวินิจฉัยเลปโตสไปโรซิสในตัวอย่างจากวัว	52
1. Dark-field microscopy (DFM) และ Fontana's Silver stain	52
2. การเพาะเลี้ยง <i>Leptospira</i> จากปัสสาวะวัว	52
Diagram ที่ 1: แสดง flow-chart ของการวิจัย leptospirosis ในวัว	53
3. Microscopic agglutination test (MAT)	54
4. วิธีทางสถิติ	54
ผลการวิจัย	56
1. ผล MAT ของซีรัมวัวทั้ง 45 ตัวและ controls 20 ตัว ซึ่งเป็นข้อมูลเดิมจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ	56
2. ผลการตรวจด้วย MAT (ตรวจซ้ำโดยใช้ซีรัมที่เจาะภายหลังตรวจครั้งแรกประมาณ 2-3 เดือน), dark-field microscopy (DFM), culture และ Dot-ELISA	56

	หน้า
3. ผลการตรวจหา <i>Leptospira</i> ในตัวอย่างจากวัว โดยวิธี PCR	65
3.1. Analytical sensitivity ของ PCR	65
3.2 Analytical specificity ของ PCR	65
3.3 ผลการตรวจหา <i>Leptospira</i> ในตัวอย่างปัสสาวะวัวด้วยวิธี PCR (diagnostic sensitivity)	65
3.4 ผลการตรวจเชื้อ <i>Leptospira</i> ในตัวอย่างน้ำเชื้อสุจิของวัวจาก semen bank ของกรมปศุสัตว์ (diagnostic sensitivity)	65
References	73
โครงการย่อยที่ 2	
การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิก เอชเชอริเชียโคไล	77
รายละเอียดของงานวิจัยโครงการย่อยที่ 2	
วัสดุและวิธีการ	78
I. การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชีย โคไล หรืออีโคไลที่ผลิต ชิกา ท็อกซิน	78
1. การเตรียม whole cell lysate (Ly) จากแบคทีเรียต่างๆ ในตารางที่ 2.1	78
2. การเตรียม lipopolysaccharide (LPS) จาก <i>E. coli</i> serogroup O157	78
3. การจัดหาและการเตรียม Toxins ต่าง ๆ	79
3.1 Cholera toxin (CT)	79
3.2 Heat-labile enterotoxin (LT)	79
3.3 Purification of Stx-1 และ Stx-2	80
3.4 การเตรียม Stx-2 toxoid	91
4. การ immunize หนู BALB/c เพื่อให้ได้ immune splenocytes	91
5. Cell hybridization (fusion) เพื่อเตรียม hybridomas และ monoclonal antibodies (MAb)	92
6. Vero cytotoxic assay	93

	หน้า
7. Serological methods ต่างๆที่ใช้ตรวจหาความเฉพาะของ monoclonal antibodies, cross-reactivity checking และ antigenic specificities	95
7.1 Indirect ELISA	95
7.2 Dot ELISA	95
7.3 SDS-PAGE และ Western blot analysis	95
8. Specimens จากมนุษย์ (human specimens)	96
ผลการวิจัย (Results)	97
1 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และโมโนโคลนาลแอนติบอดี	97
1.1 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to <i>E. coli</i> O157 LPS	97
1.2 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to A and B subunits of Shiga toxin-1 (Stx-1)	97
1.3 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to Shiga toxin-2 (Stx-2)	98
1.4 ผลการตรวจหาแอนติเจนและการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย	107
1.4.1 การเตรียม antigen detection reagents	107
1.4.2 ผลการตรวจหาแอนติเจนของ enterohemorrhagic <i>E. coli</i> ในตัวอย่างอุจจาระและ rectal swab cultures จากผู้ป่วย	107
1.4.3 ผลการเพาะ-แยก และ identify เชื้อโดยวิธีมาตรฐานและการ confirm ด้วย PCR เพื่อตรวจหาชิ้นของ O157 LPS และ <i>stx-1</i> และ <i>stx-2</i>	108
1.5 Multiplex PCR เพื่อตรวจหาชิ้นของ O157 LPS และ <i>stx-1</i> และ <i>stx-2</i>	110
1.6 Western blot analysis และ Verocytotoxicity test เพื่อตรวจหา O157 LPS และ Stx-2 ใน MAb-based dot-ELISA positive rectal swab samples	113
II. การศึกษาเชื้อ Shiga- toxin producting <i>E. coli</i> (STEC) จากตัวอย่างอุจจาระวัว-ควาย ในประเทศไทย และการศึกษา genotypes และ phenotypes ต่าง ๆ	115

	หน้า
1. การ isolate เชื้อ STEC จากอุจจาระวัว-ควาย	115
2. PCR เพื่อการ detect <i>E. coli</i> O157, <i>stx-1</i> และ <i>stx-2</i>	115
3. MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหา O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 (Chaicumpa <i>et al.</i> , 1998b)	118
4. ERIC-PCR	118
5. การศึกษา Plasmid profiles	118
6. การทำ serogrouping และ serotyping	119
7. Cytotoxic assay	119
8. Hemolytic activity testing	119
ผลการวิจัย (Results)	120
References	127
โครงการย่อยที่ 3	
การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกินและการ ทดสอบประสิทธิภาพของแอ็ดจูแวนท์ชนิดใหม่	134
โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 1: การผลิต <i>V. cholerae</i> O1 Toxin co-regulated pili (Tcp) โดยพันธุวิศวกรรมเพื่อเตรียม fimbriae (pilin) ปริมาณมากสำหรับใช้เป็น oral cholera vaccine component	135
วัสดุและวิธีการ	135
1. การเตรียม probe จาก <i>V. cholerae</i> classical biotype, Inaba serotype	135
การออกแบบ PCR primers	135
การเตรียม DIG-labeling PCR probe	136
2. Southern hybridization ของ PCR probe ที่สร้างจาก <i>tcpA</i> <i>V. cholerae</i> ของ classical biotype	136
3. การสร้าง library ของชิ้นส่วน genomic DNA ของ <i>V. cholerae</i> El Tor biotype, strain O17SR ที่ตัดด้วย restriction enzyme <i>Clal</i>	137

	หน้า
4. Colony hybridization	138
Colony lift	139
Proteinase K treatment	139
Hybridization	139
Stringency washes	139
Colorimetric detection	139
5. Automated DNA sequencing	142
6. การ subclone VC1	142
7. การ subclone <i>EcoRV</i> insert จาก VC7 เพื่อให้ start codon ของ <i>tcpA</i> อยู่ใต้การควบคุมของ <i>lacZ</i>	143
7.1 การโคลน <i>tcpA</i> gene เข้าสู่ low copy number plasmid, pWSK29	143
7.2 การโคลน <i>tcpA</i> gene เข้าสู่ pUC18 derived plasmid, pHSG 398 (Takara Biochemical)	144
8. Protein expression ของ clone ที่มี <i>tcpA</i> gene และทิศทางของ initiation codon อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย <i>lacZ</i> หรือ T3 promoter	144
9. Protein expression โดยใช้ระบบของ T7 RNA polymerase promoter	145
10. การพัฒนากระบวนการเพื่อผลิต TcpA protein ในปริมาณมาก	155
11. Immunogenicity ของ TcpA protein	155
12. การผลิต purified TcpA protein	156
13. การเตรียม recombinant cholera toxin (rCT) และ procholeraenoid (P)	158
โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 2:	160
การทดสอบประสิทธิภาพของ liposome และ CpG-DNA	160
การเตรียม recombinant TcpA	166
การเตรียม LPS	166
การเตรียม Procholeraenoid (P)	166
การเตรียม rabbit anti-CT immunoglobulins	167
การเตรียม rabbit anti-TcpA	167

	หน้า
การเตรียม Anti- <i>V. cholerae</i> O1 LPS	167
สัตว์ทดลองและการ immunize	169
การเก็บตัวอย่างและการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีในลำไส้	169
Diagram 2 : แสดงขั้นตอนการตรวจหาและนับจำนวน antibody producing cells (AbPC) ใน jejunal sections ของ immunized rats ด้วยวิธี double antibody sandwich method of immunofluorescence	170
ผลการวิจัย	171
Selected References	174
3. Output ของการวิจัย	178
1. จำนวน publications, manuscripts ที่ส่งไปตีพิมพ์แล้ว และที่กำลังเตรียมเพื่อตีพิมพ์	179
2. บทความทางวิชาการ/หนังสือ	181
3. การให้การฝึกอบรมและดูงาน	182
4. จำนวนผลงานจดสิทธิบัตร	183
5. นักวิจัยรุ่นใหม่	183
6. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (2000-2003)	184
7. การเป็นวิทยากรบรรยาย	187
8. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อประเมินโครงการวิจัย รายงานการวิจัยและติดตามงานวิจัย	190
9. การจัดประชุมวิชาการนานาชาติ	194
10. เป็นกรรมการเป็นที่ปรึกษา ผู้ทรงคุณวุฒิ และ resource person	195
Appendix	202
1. ชุดตรวจ Lepto-dot เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ	203
2. ตัวอย่าง	204
3. วิธีการตรวจ	204

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.1	<i>Leptospira</i> spp. แบคทีเรียอื่น ๆ ไวรัส ริกเก็ตเซียและเชื้อรา ที่ใช้ในการวิจัยโครงการย่อยที่ 1	7
ตารางที่ 1.2	Characteristics ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) LF9 และ (MAb) LD5	9
ตารางที่ 1.3	Informations of the 60 patients who were presumptively diagnosed leptospirosis (first batch) and the results of serological assays	17
ตารางที่ 1.4	Results of MAT and dot-ELISA for antigen detection performed on specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients (second batch patients)	19
ตารางที่ 1.5	Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and dot-ELISA performed on specimens of the 36 clinically diagnosed leptospirosis patients (third batch)	20
ตารางที่ 1.6	Results of MAT, culture and dot-ELISA performed on specimens of the fourth batch patients	22
ตารางที่ 1.7	Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on serum specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)	23
ตารางที่ 1.8	Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on plasma samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)	24
ตารางที่ 1.9	ผลของการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะของผู้ป่วยกลุ่มควบคุม จำนวน 26 ราย	45
ตารางที่ 1.10	Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on serum samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)	46
ตารางที่ 1.11	Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on plasma samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)	47

	หน้า
ตารางที่ 1.12 Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on urine specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients	48
ตารางที่ 1.13 แสดง optical densities ของ sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ <i>Leptospira</i> ใน buffy coat ของคนปกติ 100 ราย	50
ตารางที่ 1.14 ผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างจากผู้ป่วย เลปโตสไปโรซิส 3 ราย ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการ และ IgM Dipstick ให้ผลบวกในตอนแรก และทราบผล IFA และ MAT ว่าให้ผลบวกภายหลังจากการตรวจหาแอนติเจน	51
ตารางที่ 1.15 แสดงค่า <i>kappa</i> coefficient และ interpretation	58
ตารางที่ 1.16 แสดงผล MAT และ <i>Leptospira</i> serovars ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ leptospirosis ในวัว 45 ตัว ในกลุ่ม Test specimens (ข้อมูลจากสถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)	59
ตารางที่ 1.17 แสดงผล MAT เมื่อตรวจโดยสถาบันสุขภาพสัตว์และผล MAT ซึ่งตรวจใหม่ (โดยใช้ซีรัมที่เก็บประมาณ 2-3 เดือน หลังจากรับผลการตรวจด้วย MAT ครั้งแรกโดยสถาบันสุขภาพสัตว์) การตรวจด้วยวิธี dark-field microscopy (DFM) และ Fontana's staining การ culture และการตรวจด้วย Lepto-Dot เพื่อหาแอนติเจนในปัสสาวะ	60
ตารางที่ 1.18 เปรียบเทียบผลของการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะด้วย Lepto-Dot และ DFM	63
ตารางที่ 1.19 เปรียบเทียบผล Lepto-Dot และ วิธีเพาะเชื้อ	64
ตารางที่ 1.20 แบบคี่เรียต่างๆ ที่ใช้สำหรับตรวจความเฉพาะ (analytical specificity) ของ PCR primers	66
ตารางที่ 1.21 Comparative results of <i>Leptospira</i> antigen detection in urine samples of cattle by MAb-based dot-ELISA and DNA amplification by PCR	71
ตารางที่ 2.1 List of heterologous antigens used for testing cross-reactivity of MAbs to EHEC O157 LPS, Stx-1 and Stx-2	81
ตารางที่ 2.2 List of hybridomas generated against Stx-1 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies	100

	หน้า
ตารางที่ 2.3	Hybridomas generated against Stx-2 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies
	102
ตารางที่ 2.4	Specific hybridomas, their secreted Ig isotypes, antigenic specificities of their MAb, and the indirect ELISA titers of their culture fluids at stationary phase of <i>in vitro</i> growth
	104
ตารางที่ 2.5	ผลการเพาะ-แยกและ identified เชื้อ และ MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างอุจจาระ/rectal swab cultures จำนวน 628 ตัวอย่าง
	109
ตารางที่ 2.6	Phenotypic and genotypic characteristics of the 49 <i>E. coli</i> isolates
	117
ตารางที่ 2.7	Eight groups of virulence gene profiles and serogroups of strains of each profile
	121
ตารางที่ 2.8	The overall results of plasmid profiles
	125
ตารางที่ 2.9	Overall results of ERIC-PCR
	126
ตารางที่ 3.1	Rabbit immunization schedule and dosages of CT
	168
ตารางที่ 3.2	แสดงจำนวน antigen specific antibody producing cells ใน intestinal (jejunal) sections ของหนู rats ทั้งเก้ากลุ่มที่ได้รับวัคซีน ทั้งหก formulations และ placebos สามชนิด
	172

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1.1	Dot-blot ELISA results showing specificities of MAb LF9 and MAb LD5 against boiled homogenates of various <i>Leptospira</i> serovars	12
รูปที่ 1.2	Western blot (WB) patterns of MAb LF9 and MAb LD5 against SDS-PAGE-separated homogenates of <i>Leptospira</i> spp. (Blocks I and II, respectively)	13
รูปที่ 1.3	ภาพ electron micrograph ของ <i>Leptospira</i> ที่แยกมาจากผู้ป่วย	29
รูปที่ 1.4	Western blot patterns of representative samples of the second batch specimens which MAb dot-ELISA were positive for <i>Leptospira</i> antigen but the serum antibody tests (IgM dipstick, IFA และ MAT) were negative	42
รูปที่ 1.5	<i>Leptospira</i> spp. ที่ตรวจพบในปัสสาวะวัว หลังจากย้อมด้วย Fontana's Silver stain	55
รูปที่ 1.6	Analytical sensitivity of PCR for detection of <i>Leptospira</i> DNA from cells	67
รูปที่ 1.7	Analytical sensitivity of PCR for detection of <i>Leptospira</i> genomic DNA	68
รูปที่ 1.8	Representative results of DNA amplicon for detection of DNA of <i>Leptospira</i> spp. (various serovars)	69
รูปที่ 1.9	Representative results of DNA amplicon by PCR when DNA of bacteria other than <i>Leptospira</i> were used as DNA templates	70
รูปที่ 1.10	Representative results of positive and negative PCR for the detection of <i>Leptospira</i> DNA in semen samples of cattle	72
รูปที่ 2.1	แสดง patterns ของ SDS-PAGE-separated Ly (lanes B, C และ D) และ LPS (lanes E, F และ G) ของ <i>E. coli</i> O157	82
รูปที่ 2.2	แสดง SDS-PAGE-separated pure LT ของ enterotoxigenic <i>E. coli</i> ที่ elute ออกมาจาก immobilized galactose-resin column	83
รูปที่ 2.3	Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก DEAE fast flow column	84

		หน้า
รูปที่ 2.4	Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column (fraction volume 5 ml)	86
รูปที่ 2.5	SDS-PAGE patterns ของ fractions ที่มี Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column	87
รูปที่ 2.6	แสดง SDS-PAGE patterns ของ concentrated pools ต่าง ๆ จากรูปที่ 2.4 และ 2.5	88
รูปที่ 2.7	แสดง FPLC chromatograms ของ Stx-1-CF fractions ต่าง ๆ	89
รูปที่ 2.8	แสดง SDS-PAGE (non-reducing condition) patterns ของ Stx-1 preparations ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการ purify	90
รูปที่ 2.9	The cytopathic effect (CPE) of Vero cells caused by Shiga toxin	94
รูปที่ 2.10	Western blot (WB) patterns of monoclonal antibodies secreted by the selected hybridomas, i.e., clone 13C9 (Block I), clones 11G3 and 3D4 (Block II) and clones 26F9 and 13D2 (Block III) against SDS-PAGE-separated homologous antigens	105
รูปที่ 2.11	Representative hybridoma in tissue culture	106
รูปที่ 2.12	ผล multiplex PCR เพื่อ amplify genes of O157 LPS, <i>stx-1</i> และ <i>stx-2</i> ใน stool samples ซึ่งให้ผลบวกโดย MAb-Based dot-ELISA	112
รูปที่ 2.13	Western blot pattern ของ rectal swab culture ของผู้ป่วยซึ่งผลการตรวจด้วย MAb-based dot-ELISA เป็นบวกเมื่อใช้ MAbO157 LPS จาก clone 13C9 เป็น detection reagent	114
รูปที่ 2.14	The <i>stx-1</i> , <i>stx-2</i> and O157 LPS amplicons at 110, 349 and 457, respectively	123
รูปที่ 2.15	The representative amplicons of STEC virulence genes on 0.8% agarose gel electrophoresis	124
รูปที่ 3.1	Results of Southern hybridization of PCR probe derived for <i>tcp</i> of <i>V. cholerae</i> classical biotype, Inaba serotype, strain 569B against some restriction enzyme-digested DNA of <i>V. cholerae</i> El Tor biotype strain O17SR	140
รูปที่ 3.2	แสดงโครงสร้างของ <i>tcp</i> locus จาก <i>V. cholerae</i> El Tor biotype (accession no. X 74730)	141

		หน้า
รูปที่ 3.3	โครงสร้างของ <i>tcp</i> locus จาก <i>V. cholerae</i> El Tor, biotype (genebank accessionno. X74730) แสดงตำแหน่งและทิศทางของ <i>orf</i> ต่างๆ	147
รูปที่ 3.4	Translation of VC7 clone แสดง Open reading frame จากตำแหน่ง base ที่ 119-791	148
รูปที่ 3.5	แสดง plasmid vector pBluescript II KS vector ที่ใช้ในการ cloning เข้าใน VC7 ประกอบด้วย <i>tcpA</i> gene ที่สมบูรณ์ และทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ T7 promoter	149
รูปที่ 3.6	แสดง plasmid vector pWSK29 ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ <i>lacZ</i> promoter	150
รูปที่ 3.7	แสดง plasmid vector pHSG398 (Takara) ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ <i>lacZ</i> promoter	151
รูปที่ 3.8	แสดง protein expression ใน clone ที่มี gene <i>tcpA</i> ที่สมบูรณ์ โดยที่ initiation codon ของ clone เหล่านี้อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย <i>lacZ</i> และอยู่ในทิศทางของ T3 promoter	152
รูปที่ 3.9	plasmid vector pGP1-2 ประกอบด้วย gene ที่ทำหน้าที่สร้าง T7 RNA polymerase ซึ่งอยู่ใต้การควบคุมของ λp_L promoter	153
รูปที่ 3.10	Protein expression จาก <i>E. coli</i> strain E-2096 ซึ่งได้ transform plasmid จาก pBlueScript II KS (a) และ VC7 (b)	154
รูปที่ 3.11	Western blot analysis ของ mouse serum ต่อ bacterial lysate ของ <i>E. coli</i> clone ที่ผลิต TcpA protein	161
รูปที่ 3.12	แสดง SDS-PAGE patterns ของโปรตีน ของ expression vector pTrcHis2A ที่มีและไม่มี insert ของ <i>tcpA</i> gene	162
รูปที่ 3.13	Protein profile ของ purified TcpA protein fractions 1 (F_1) และ 2 (F_2) ที่ถูก elute จาก Probond Nickle affinity column ซึ่ง purified protein มี molecular weight ประมาณ 25 kDa	163
รูปที่ 3.14	แสดง protein profiles ในขั้นตอนการเตรียม recombinant CT	164

	หน้า
รูปที่ 3.15	
a) Anti-LPS producing cells in jejunal lamina propria of rat at villous core (group 1); 10 × ocular, 10 × objective	
b) Liposome control	173

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: สัญญาเลขที่ RTA/ 07/ 2543

ชื่อโครงการ: วิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อและการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกิน

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา และคณะ

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ก่อน กันยายน 2545)

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต (หลัง 30 กันยายน 2545)

E-mail Address : tmwcc@mahidol.ac.th

tmwcc@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (15 สิงหาคม 2543 ถึง 14 สิงหาคม 2546)

โครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

คณะผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาโคลน LF9 และ LD5 ซึ่งผลิตและหลั่งโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MAb) ต่อเชื้อในจินัสเลปโตสไปรา (genus *Leptospira*) และเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่ก่อโรค (pathogenic *Leptospira*) ตามลำดับ MAb จากโคลนทั้งสองโคลนนี้เป็น IgG1 และมีความเฉพาะต่อโปรตีนของเชื้อเลปโตสไปราซึ่งมีขนาด 38 กิโลดัลตันและ 35-36 กิโลดัลตัน ตามลำดับ คณะผู้วิจัยได้ใช้ MAb จากโคลน LD5 (MAbLD5) เป็นเครื่องมือในการค้นหาและจับแอนติเจนเฉพาะของเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่ก่อโรคในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (specimens) จากผู้ป่วยและตัวอย่างจากวัวโดยได้พัฒนาเป็นชุดตรวจที่ใช้หลักการของ dot-blot ELISA และ sandwich ELISA

สำหรับตัวอย่างจากมนุษย์ที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนของเลปโตสไปรานั้นมีทั้งปัสสาวะ ชีรุมพลาสมา และพลาสมา + buffy coat โดยได้ตัวอย่างผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสามแห่งในภาคอีสานซึ่งเป็น endemic areas ของโรคเลปโตสไปโรซิส นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมและคนปกติด้วย

ผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสกลุ่มที่ 1 จำนวน 60 คนจากโรงพยาบาลจังหวัดขอนแก่น ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสโดยใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการป่วยเฉลี่ย 2.97 วันก่อนไปโรงพยาบาล ในวันแรกก่อนการรักษาแพทย์ได้เจาะเลือดแยกซีรัมเพื่อตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้ IgM dipstick ซีรัมของผู้ป่วยรายใดให้ผลบวกก็จะ

ถูกส่งไปยืนยันด้วยวิธี MAT ต่อไป ผู้ป่วยรายที่สี่เริ่มในวันแรกให้ผล IgM dipstick เป็นลบจะถูกเจาะเลือดทดสอบซ้ำในวันที่ 5, 6 หรือ 7 และถ้าปรากฏว่ารายใดให้ผลบวก IgM dipstick ก็จะถูกทดสอบยืนยันด้วย MAT เช่นกัน นอกจากนี้แพทย์ยังได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยทุกคนในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลเพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAb based-dot-blot ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้น พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ผลบวก IgM dipstick คิดเป็น cumulative positivity จากการตรวจซ้ำสองครั้งรวมกัน 53.85% (ทราบผลรวมในวันที่ 7) และ MAT มี % cumulative positivity (sensitivity) 40% (ทราบผลภายหลังส่งซีรัมไปตรวจ 4 เดือน หรือนานกว่านั้น) ในขณะที่ปัสสาวะซึ่งเก็บเพียงครั้งเดียวในวันแรกที่ผู้ป่วยไปถึงโรงพยาบาลมี % positivity 61.67% และใช้เวลาในการทดสอบเพียง 1-2 ชั่วโมง

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา ที่แพทย์วินิจฉัยเบื้องต้นตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 8 คน มีไข้มาแล้วเฉลี่ย 6.9 วันก่อนไปโรงพยาบาล ผลการตรวจซีรัมโดย MAT พบว่า 4 จาก 8 ราย (50%) ให้ผลบวก (ทราบผลภายหลังส่งซีรัมไปตรวจ 4 เดือนหรือนานกว่านั้น และต้องส่งซีรัมมากกว่าหนึ่งตัวอย่าง) ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในวันแรกจากผู้ป่วยกลุ่มนี้เมื่อตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี MAb based-dot-ELISA พบว่ามีผลบวกถึง 5 ราย จากผู้ป่วย 8 ราย (62.5%) และเมื่อตรวจปัสสาวะผู้ป่วย 3 รายที่ให้ผลลบในวันแรกอีกครั้งหนึ่งพบว่าให้ผลบวกทั้ง 3 ราย ดังนั้นผลบวกสะสม (% cumulative positivity หรือ sensitivity) ของการตรวจหาแอนติเจนจึงเป็น 100%

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 เป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลขอนแก่นที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส มีอาการป่วยมาแล้วเฉลี่ย 3.4 วัน ในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลได้ถูกเจาะเลือดเพื่อทดสอบด้วย IgM dipstick เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 เมื่อ IgM dipstick ให้ผลบวกก็ได้ส่งซีรัมนั้นๆไปยืนยันด้วยวิธี immunofluorescence antibody test (IFA) ซึ่งรายใดที่ให้ผลบวก IFA ก็จะถูกส่งต่อไปทดสอบหา MAT titer ส่วนรายใดที่ซีรัมของวันแรกให้ผลลบเมื่อตรวจด้วย IgM dipstick ก็จะถูกตรวจซ้ำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ในวันที่ 5, 6 หรือ 7 ผู้ป่วยกลุ่มนี้แพทย์ได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะในวันแรกและวันที่ 2, 3, 7 และ 14 (Days 1, 2, 3, 7, และ 14) เพื่อตรวจหาแอนติเจน พบว่า IgM dipstick มี % cumulative positivity 69.4%, IFA จากตัวอย่างที่ให้ผลบวก IgM dipstick แล้ว มี % positivity 64% และ MAT จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง IgM dipstick และ IFA แล้ว มี % positivity 85.7% การตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างปัสสาวะในวันแรกมี % positivity 75.0% และเพิ่มเป็น 88.9%, 97.2%, 97.2% และ 100% ในวันที่ 2, 3, 7 และ 14 ตามลำดับ

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 4 จำนวน 22 คน จากโรงพยาบาลจังหวัดอุบลราชธานี เป็นผู้ป่วยที่ให้ผลบวกจากการเพาะเชื้อเลปโตสไปราในเลือดและ/หรือน้ำจากไขสันหลัง (ทราบผล 6 เดือนหลังป่วย) หรือมีผลบวก MAT (ทราบผลภายหลังส่งซีรัมไปตรวจ 4 เดือน) ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการป่วยมาก่อนแล้วเฉลี่ย 4.2 วัน ตัวอย่างปัสสาวะซึ่งเก็บจากผู้ป่วยในวันแรก และวันที่ 2, 3, 4, 5, 6

และ 7 และทำการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี MAb based-dot-blot ELISA พบว่ามี % positivity 81.8%, 95.5%, 100%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเฉพาะและความแม่นยำของชุดตรวจ MAb based-dot-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นกับปัสสาวะจากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมและจากคนปกติโดยตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ ซึ่งได้ผลดังนี้

ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมจำนวน 26 คน จากโรงพยาบาลขอนแก่นซึ่งมีอาการไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ (P.U.O.) แต่ต่อมาพบว่าสามารถจำแนกได้ดังนี้ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma; CCA) 10 ราย ผู้ป่วยโรคเม็ดเลือดโตซิส (จากการวินิจฉัยตามอาการ) 8 ราย ผู้ป่วยมาลาเรีย (พบเชื้อในเลือด) 3 ราย ผู้ป่วยสครับไทฟัส (พบแอนติบอดีโดยการตรวจทางซีโรโลยี) 1 รายและผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 4 ราย ผลการตรวจปัสสาวะที่เก็บจากผู้ป่วยคนละ 1 ครั้งพบว่าผู้ป่วย 3 ราย ที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นเม็ดเลือดโตซิสให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปโรซิส ซึ่งจากการนำปัสสาวะของผู้ป่วย 3 รายนี้ไปทดสอบด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอตพบว่ามีแถบแอนติเจน-แอนติบอดี ตรงตำแหน่ง 38 กิโลดัลตัน เมื่อตรวจด้วย MAbLF9 และมีแถบแอนติเจน-แอนติบอดีตรงตำแหน่ง 35-36 กิโลดัลตัน เมื่อตรวจด้วย MAbLD5 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราเป็นผลบวกจริง ส่วนอีก 23 รายให้ผลลบ

จากตัวอย่างปัสสาวะของคนสุขภาพปกติ 120 ราย ซึ่งเป็นชาวอีสานเช่นเดียวกับผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสพบว่ามีแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ 1 ราย เมื่อตรวจด้วย MAb based-dot-blot ELISA อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่มีตัวอย่างเหลือพอสำหรับการตรวจยืนยันด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอตจึงไม่อาจบอกได้ว่าเป็นผลบวกปลอมหรือผลบวกจริง กรณีนี้ผู้วิจัยมีความเห็นว่าอาจเป็นเพราะกำลังติดเชื่อโดยไม่มีอาการป่วย หรือเคยป่วยแต่ได้รับประทานยาเองและหายแล้วแต่ยังคงมีเชื้ออยู่ก็เป็นได้

นอกจากการพัฒนาชุดตรวจ MAb based-dot-blot ELISA สำหรับตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะแล้ว ผู้วิจัยยังได้พัฒนาชุดตรวจหาแอนติเจนในเลือดด้วยวิธี PAb-MAb based-sandwich ELISA ด้วย และพบว่าการตรวจหาแอนติเจนในเลือดโดยใช้ซีรัมและพลาสมานั้นมีความไวต่ำ ส่วนการใช้พลาสมาและ buffy coat รวมกันให้ความไวสูง 100%

ชุดตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะดังกล่าวข้างต้นได้ถูกนำไปใช้ตรวจกรองวัวจากฟาร์มที่เคยมีประวัติการแท้งเพราะโรคเลปโตสไปโรซิสพบที่สามารถใช้ได้ผลดี

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างน้ำเชื้อวัว (semen) จากคลั่งน้ำเชื้อของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ด้วย ซึ่งการ

ตรวจกรองดังกล่าวจะช่วยให้หลีกเลี่ยงการใช้ contaminated semen ในการผสมเทียมเพื่อป้องกันการแท้งลูกของแม่วัว

โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนากรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยาสำหรับวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล (อี โคไล) [กลุ่ม O157 และกลุ่มที่ผลิตสารพิษซิกา (Shiga toxin producing-*E. coli*; STEC)]

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี monoclonal antibody based dot-ELISA (dot-ELISA) เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้ออีโคไลกลุ่ม O157 และ STEC โดยการผลิตไฮบริโดมาซึ่งสร้างและหลั่งโมโนโคลนาลแอนติบอดี (MAb) เฉพาะต่อ O157 lipopolysaccharide (LPS) และสารพิษซิกาทั้งชนิดที่ 1 (Shiga toxin 1) และชนิดที่ 2 (Shiga toxin 2) ทั้งต่อส่วนเอ (A subunit) และส่วนบี (B subunit) ของสารพิษทั้งสองชนิดคือ MAbO157, MAbStx1A, MAbStx1B, MAbStx2A และ MAbStx2B และใช้ MAb เหล่านี้เป็น detection reagents เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างอุจจาระและ/หรือ rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงสีกลุ่มเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน (conventional culture method) ตัวอย่างใดที่ให้ผลไม่ตรงกัน ได้ตรวจยืนยันด้วยวิธีที่สามคือวิธี Verocytotoxic assay เพื่อตรวจหา Shiga toxin หรือวิธีที่สี่คือวิธี Western blot analysis เพื่อตรวจหา O157 lipopolysaccharide (O157 LPS)

ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ใช้ในโครงการย่อยที่ 2 นี้แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็น rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 499 คนจากโรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี การเพาะแยกเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อมาตรฐานทำให้โรงพยาบาลพระจอมเกล้าโดยนักเทคนิคการแพทย์ของโรงพยาบาล ส่วน rectal swabs ซึ่ง enriched ใน buffered peptone water (BPW) ส่งไปตรวจหาแอนติเจนที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน กรุงเทพฯ ผลการทดสอบนำมาเปรียบเทียบกับนภายหลังจากทดสอบเสร็จทั้งหมดทุกตัวอย่างแล้วทั้งสองวิธี กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยอุจจาระร่วงชาวญี่ปุ่นจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บโดย Dr. A. Kai, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น การเพาะแยกเชื้อทำโดย Dr. A. Kai ส่วนการทดสอบหาแอนติเจนทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ โดยวิธี dot-ELISA แล้วนำผลมาเทียบกันภายหลังตรวจเสร็จแล้วทั้งสองวิธี ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 เป็น rectal swabs ใน buffered glycerol saline (BGS) ของผู้ป่วยอุจจาระร่วงชาวเวียดนามจำนวน 42 คน ซึ่งไปขอรับการรักษาที่ 108 Hospital, Hanoi การเพาะแยกและตรวจหาเชื้อทำที่ห้องปฏิบัติการของ 108 Hospital และการตรวจหาแอนติเจนโดย dot-ELISA ทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ตัวอย่างกลุ่มที่ 4 เป็น rectal swabs ใน BPW ของผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 82 คน ซึ่งไปขอรับการรักษาที่โรงพยาบาลบาราคนราดัวร์ จังหวัดนันทบุรี การเพาะ

แยกเชื้อทำที่โรงพยาบาลบำราศนราดูร ส่วนการตรวจหาแอนติเจนโดย dot-ELISA ทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ เช่นเดียวกับตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

ผลการตรวจหาแอนติเจน O157 และ Shiga toxins ในตัวอย่างอุจจาระและ rectal swabs ทั้งหมด 628 ราย พบว่ามีผลเป็นบวกเพียง 9 ราย คือ ตัวอย่างอุจจาระจากชาวญี่ปุ่น 5 รายและชาวไทยจากโรงพยาบาลพระจอมเกล้า เพ็ชรบุรี 4 ราย ผลการเพาะแยกเชื้อพบว่าจากอุจจาระของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น 5 ราย สามารถแยกแบคทีเรียได้ดังนี้คือ 1 รายได้ *E. coli* non-O157, *stx1*⁺, *stx2*⁺, 2 รายได้ *E. coli* O157, *stx1*⁻, *stx2*⁺, 1 รายได้ *E. coli* O157, *stx1*⁺, *stx2*⁺, และ 1 รายเป็น *E. coli* O157, *stx1*⁺, *stx2*⁻ ส่วน rectal swabs จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ราย ที่ให้ผลบวก dot-ELISA นั้น 1 รายให้ผลบวกต่อ MAbO157 อีก 3 รายให้ผลบวกต่อ MAbStx2A และ MAbStx2B และผลการเพาะแยกเชื้อ แยกได้ *E. coli* แต่ไม่สามารถ type ได้ อย่างไรก็ตาม Western blot analysis ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MAb O157 โดย dot-ELISA พบว่ามี O157 LPS อยู่จริงและ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MAbStx2A และ MAbStx2B โดย dot-ELISA พบว่าให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วย Verocytotoxic assay ซึ่งแสดงว่ามี Shiga toxin อยู่ในตัวอย่างจริง แต่เนื่องจากปริมาณของตัวอย่างมีน้อยจึงไม่สามารถนำไปทำทดสอบเพื่อหาชนิดของ Shiga toxin โดยวิธี neutralization ว่าเป็น Stx1 หรือ Stx2 ได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้สำรวจหาเชื้อ STEC และ O157 *E. coli* จากอุจจาระวัวควายซึ่งมีรายงานจากประเทศอื่นๆว่าเป็นแหล่งกักตุนเชื้อ (reservoir) STEC โดยเก็บตัวอย่างจากวัว-ควาย ใน 5 จังหวัดคือ นครปฐม ราชบุรี ลพบุรี นนทบุรี และอุบลราชธานี พบว่าจากจำนวนอุจจาระของวัวปกติ 139 ตัว สามารถ isolate STEC ได้ 48 สายพันธุ์และ O157 *E. coli* 1 สายพันธุ์รวมเป็น 49 สายพันธุ์ จากการศึกษาจีโนมด้วยวิธีเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (พีซีอาร์) มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เอริก-พีซีอาร์ (ERIC-PCR) ศึกษาพลาสมิทและการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่า STEC และ O157 *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระวัวควาย จำนวน 22 สายพันธุ์จาก 49 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁺, 22 จาก 49 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁻/*stx2*⁺, 4 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁻, และ 1 สายพันธุ์เป็น O157⁺ *stx1*⁻/*stx2*⁻ ซึ่งผลการทดสอบด้วย Verocytotoxic assay และ MAb O157 dot-ELISA ให้ผลตรงกับพีซีอาร์และมัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์ จาก 49 สายพันธุ์พบว่า 38 สายพันธุ์มี *hlyA* gene จากการตรวจด้วยพีซีอาร์ และ 37 จาก 38 สายพันธุ์นี้ผลิต hemolysin ซึ่งทำให้เกิด α-hemolysis ใน blood agar plates จากการตรวจซีโรกรุปของเชื้อทั้ง 49 สายพันธุ์ด้วย serogroup specific antisera พบว่าสามารถบอกซีโรกรุปได้เพียง 16 สายพันธุ์คือ 7 สายพันธุ์เป็น O8 และ 3 สายพันธุ์เป็น O15 ส่วนอีก 6 สายพันธุ์พบว่าเป็น O27, O29, O142, O152, O157 และ O168 ซีโรกรุปละ 1 สายพันธุ์ สำหรับ 33 สายพันธุ์ที่ type ไม่ได้พบว่ามี *stx* gene (s) ทุกสายพันธุ์และ 30 สายพันธุ์เป็น smooth variants ส่วนอีก 3 สายพันธุ์เป็น rough mutants จากสายพันธุ์ที่ type ได้พบว่า 2 สายพันธุ์ที่เป็น O15 มี *eae* และ *tir* genes ซึ่งเป็น

virulence factors ที่สำคัญในการก่อโรค เมื่อศึกษาหา genes อื่นๆในพลาสมิดคือ *etpD* และ *katP* พบว่าไม่มี isolate ใดมี *etpD* gene และ 3 สายพันธุ์มี *katP* gene จากการตรวจความไวต่อยาปฏิชีวนะ (แอมพิซิลลิน 10 ไมโครกรัม คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม เซฟาโลทิน 30 ไมโครกรัมและซัลฟาเมท็อกซาโซล-ตรัยเมโทพริม 25 ไมโครกรัม) พบว่า 48 จาก 49 สายพันธุ์ไว (sensitive; S) ต่อยาที่ทดสอบ และมีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ดื้อ (resistant; R) ยาแอมพิซิลลิน คลอแรมเฟนิคอลและซัลฟาเมท็อกซาโซล-ตรัยเมโทพริม จากการจำแนก STEC และ O157 *E. coli* ทั้ง 49 สายพันธุ์โดยใช้ genes ในโครโมโซมและพลาสมิดและความไว (S) หรือความดื้อ (R) ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 9 กลุ่มและกลุ่มที่พบมากที่สุดคือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁺, *eae*⁻, *tir*⁻, *etpD*⁻, *hlyA*⁺, *katP*⁻, S

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 49 สายพันธุ์ตามจำนวนและขนาดของพลาสมิดออกเป็น 10 กลุ่ม โดย 46 สายพันธุ์มีพลาสมิดต่างกันเป็น 9 กลุ่มและ 3 สายพันธุ์ไม่มีพลาสมิด จำนวนพลาสมิดที่พบมีตั้งแต่ 1-9 plasmids และมีขนาดตั้งแต่ 1-9 Kb จากการใช้เทคนิค ERIC-PCR พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 49 สายพันธุ์ ได้เป็น 11 กลุ่ม คือมี bands 3-6 bands ซึ่งมีขนาดต่างกันตั้งแต่ >100 - 3,000 bp

ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า STEC และ O157 *E. coli* ที่พบในวัว-ควายสุขภาพปกติในประเทศไทยมีจีโนมัยและฟีโนทัยป์ที่หลากหลาย และแม้ว่าจะยังไม่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดมี virulence genes ที่ครบถ้วนสำหรับก่อโรคในมนุษย์แต่การที่มีแบคทีเรียที่มี virulence genes ต่างๆกันอยู่ในอุจจาระวัว-ควายตัวเดียวกัน หรือฝูงเดียวกัน อาจเอื้อให้เกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียและทำให้เชื่อมีวิวัฒนาการเป็นเชื้อก่อโรคในคนได้

โครงการย่อยที่ 3

การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกินและการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนหน่วยชนิดใหม่

ผู้วิจัยได้ผลิต recombinant *E. coli* clones ซึ่ง carry genes ในการสร้าง toxin co-regulated pili (*tcpA*) และ genes ที่ควบคุมการสร้างสารพิษ (*ctxA/ctxB*) ของเชื้ออหิวาต์และได้เตรียม purified TcpA และ CT จาก recombinant clones เพื่อใช้เป็น vaccine components โดยก่อนใช้ได้นำ CT ไปบ่มด้วยความร้อนจนความเป็นพิษของส่วนเอเกือบหมดแต่ส่วนบียังคงอยู่และจับกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ (polymers) เพื่อเพิ่ม immunogenicity และเรียกโมเลกุลของ CT ที่เปลี่ยนแปลงไปว่า procholeraenoid หรือ P จากนั้นเตรียม vaccine component อีกชนิดหนึ่งคือ *V. cholerae* lipopolysaccharide (LPS) แล้วนำ LPS, TcpA และ P ไปเตรียมวัคซีนสูตรต่างๆ 6 formulations ด้วยกันคือ vaccine 1 ประกอบด้วย LPS, TcpA และ P [รวมเรียกว่า antigen (Ag)] ใส่ในลิโปโซม (liposome; L) และผสม bacterial CpG (vaccine 1= Ag + L + CpG), vaccine 2 ประกอบด้วย Ag + L + non CpG DNA, vaccine 3 ประกอบด้วย L +

Ag, vaccine 4 ประกอบด้วย CpG DNA + Ag, vaccine 5 ประกอบด้วย non CpG DNA + Ag และ vaccine 6 ประกอบด้วย Ag (LPS, TcpA และ P) เท่านั้น นำวัคซีนทั้ง 6 formulations ไปทดสอบในหนู Wistar rats 6 กลุ่ม โดยให้หนูแต่ละกลุ่มกินวัคซีนแต่ละชนิดตัวละ 3 โดส โดยเว้นระยะห่างกันระหว่างโดส 14 วัน นอกจากนี้ยังมีหนูกลุ่มควบคุมอีก 3 กลุ่ม ซึ่งได้รับวัคซีนหลอก (placebos) คือ CpG-DNA, L, และ vaccine diluent (3 ml 5% NaHCO₃) ตามลำดับ หลังจากได้รับวัคซีนหรือ placebos โดสสุดท้ายแล้ว 7 วันได้เจาะเลือดหนู rats ทุกตัวเพื่อหาระดับชั้โตไคน์ รวมทั้งได้ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสามชนิดในลำไส้ส่วนเจอนัมด้วยวิธีแซนดวิชอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าวัคซีนทั้ง 6 สูตรมี immunogenicity จากสูงไปต่ำเมื่อเทียบกับตนเองและเทียบกับกลุ่ม placebos ดังนี้

Vaccine 1 > vaccine 2 = vaccine 3 > vaccine 4 > vaccine 5 = vaccine 6 > placebo 1 = placebo 2 = placebo 3

ส่วนการตรวจหาชั้โตไคน์คือ IL-4 และ IL-10 ในเลือดซึ่งเก็บในวันที่ 7 หลังจากหนูทดลองได้รับวัคซีนหรือ placebo โดสสุดท้ายไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงใดๆเมื่อเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้รับวัคซีนและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเจาะเลือดในวันที่ 7 หลังจากได้รับวัคซีนและ placebos โดสสุดท้ายนั้นค่อนข้างล่าช้าเกินไปและระดับชั้โตไคน์ต่างๆได้ลดระดับลงแล้วหรือเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของชั้โตไคน์มีอยู่เพียงในลำไส้และตรวจไม่พบในกระแสเลือด เนื่องจากเป็นที่ทราบว่ชั้โตไคน์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์แบบ paracrine เป็นระยะเวล่สั้นๆ ดังนั้นการวัดระดับชั้โตไคน์ในเลือดจึงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ

อย่างไรก็ดีสามารถสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยได้ผลิต recombinant vaccine components สำเร็จแล้วตามที่เสนอและได้ทดสอบประสิทธิภาพของ CpG-DNA ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ชนิดใหม่ในการเพิ่ม immunogenicity ของวัคซีนป้องกันอหิวาต์ชนิดกินแล้วและพบว่า CpG-DNA ได้ทำให้ immunogenicity ของวัคซีนเพิ่มขึ้น

คำหลัก : โรคเลปโตสไปโรซิส (โรคไข้ฉี่หนู) เชื้อเลปโตสไปรา ไชบริโดมา โมโนโคลนาลแอนติบอดี เชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิก เอชเชอริเชียโคไล สารพิษชึกาเชื้ออหิวาต์ (วิบรีโอ คอเรอเร) โรคอหิวาต์ วัคซีน อีไลซา การวินิจฉัยโรค พันธุวิศวกรรม แอดจูแวนท์

Abstract

Project Code: RTA/07/2543

Project Title : Immunodiagnosis of Infectious Diseases and Development of Oral
Cholera Vaccine

Investigators : Professor Dr. Wanpen Chaicumpa *et al.*

Affiliation : Faculty of Tropical Medicine

Mahidol University (Before September 30, 2002)

Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University (After
September 30, 2002)

E-mail Address : tmwcc@mahidol.ac.th

tmwcc@yahoo.com

Project Period : 3 years (August 15, 2000 to August 14, 2003)

Subproject I

Development of a Ready- to- Use Diagnostic Test Kit for Leptospirosis

Hybridomas secreting specific monoclonal antibodies (MAb) to all members of the genus *Leptospira* (clone LF9) and those that are specific only to the pathogenic species (clones LD5 and LE1) were produced. MAb LF9, which was immunoglobulin G1 (IgG1), reacted to a 38-kDa component of the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis-separated whole-cell homogenates of all *Leptospira* spp., while MAb LD5 and MAb LE1, which were IgG1 and IgG2a, respectively, reacted to the 35- to 36-kDa components of homogenates of all serogroups of the pathogenic species of *Leptospira*. The MAb LD5 was used in a dot blot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for detecting *Leptospira* antigen in urine samples either singly collected or serially collected from four groups of patients diagnosed with leptospirosis, i.e., **group 1**: 60 patients clinically diagnosed leptospirosis using WHO criteria. They had had fever for the average of 2.97 days before hospitalization. Single urine samples were collected from individual patients upon hospital arrival and before any treatment; **group 2** included 8 clinically diagnosed patients. Urine samples were collected from them three times, i.e. days 1, 7-19 and 22-38; **group 3** were 36 clinically diagnosed leptospirosis patients. Urine samples were collected on days 1, 2, 3, 7 and 14 of hospitalization and **group 4** were 22 patients whose samples were either culture positive for *Leptospira* spp. or MAT positive. Urine samples were collected from

them on days 1-7. The serum samples of patients were tested serologically by IgM dipstick assay, indirect immunofluorescence assay (IFA), and/or microscopic agglutination test (MAT). Urine samples of 26 patients diagnosed with other illnesses and 120 healthy individuals serve as controls.

For the first group of patients, their blood samples taken at the first day of hospital arrival and 5, 6 or 7 days later revealed cumulative positivity at 53.85% by IgM dipstick and 40% by MAT (the results were obtained about 4 months after sending the sera). Their single urine samples collected on the first day of hospitalization gave 61.67% positivity by MAb based-dot-ELISA and the test time was only 1-2 hours. For the second group of patients, who had been ill for an average of 6.9 days before hospitalization, the MAT were positive for 4 of 8 (50%) patients, while the *Leptospira* antigenuria tested by the MAb based-dot-ELISA was positive for 62.5%, 100% and 100% of the urine samples collected on days 1, 7-19 and 22-38, respectively. For the third group of patients who were 36 clinically diagnosed leptospirosis and who had been ill for an average of 3.4 days before hospitalization, the IgM dipstick (tested twice), IFA and MAT were positive for 83.3%, 70% and 85.7% of patients, while the *Leptospira* antigenuria tested by the MAb based-dot-ELISA was positive for 75%, 88.9%, 97.2%, 97.2% and 100% on days 1, 2, 3, 7 and 14 of hospitalization, respectively. All but 1 of 11 patients whose serum samples collected on the first day of hospitalization were IgM seronegative, were positive by urine antigen test on day 1. This is a strong evidence that detection of antigen in urine can provide diagnostic information that could be useful in directing early therapeutic intervention. For the fourth group of patients who had been ill for an average of 4.2 days before hospitalization, the cumulative positivity of MAT (tested twice on two serum samples and the results were obtained after 4 months) was 72.7% and the *Leptospira* antigen was found in 77.3%, 81.8%, 95.5%, 100, 100, 100, and 100% of the patients' urine samples collected on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 of hospitalization, respectively. *Leptospira* antigenuria was found in 3 of the 26 patients diagnosed with other illnesses (3 clinically diagnosed melioidosis) and 1 of the 120 healthy controls. Western blot analysis revealed that the samples really contained *Leptospira* specific antigens. The detection of antigen in urine by the monoclonal antibody-based dot-ELISA has high potential for rapid, sensitive, and specific diagnosis of leptospirosis at a low cost.

Besides urine antigen detection, we have developed an antigenemia detection assay in the form of PAb-MAb sandwich ELISA. The test revealed 100% specificity and sensitivity when buffy coat + plasma of patients who were MAT and IFA positive for leptospirosis were tested.

The urine antigen detection assay was also applied to study leptospirosis in cattle. The experiments and their results are the following:

Forty-five serum samples of leptospirosis suspected cattle [(serum MAT titer $\geq$ 1:50 as tested by the National Institute of Animal Health (NIAH)] were re-tested by MAT using a larger panel of live *Leptospira* serovars. On the day of serum collection, urine samples from these cattle were also collected for *Leptospira* culture, dark-field microscopy plus Fontana's Silver staining and *Leptospira* antigen detection by dot-ELISA. Serum and urine samples from twenty healthy cattle were used as negative controls.

Thirty of 45 (66.67%) serum samples of leptospirosis suspected cattle were positive by the re-tested MAT. Among them, 40% had antibodies to serovar hardjo, 26.67% of them had antibodies to serovar ranarum and sejroe, while antibodies to serovars ballum, hyos and wolffi were found in 16.67%, 13.33% and 13.33%, respectively. Fifty percent of the MAT positive serum samples revealed antibodies to more than one *Leptospira* serovar. All serum samples of the 20 healthy cattle were negative by MAT.

Dark-field microscopy for direct visualization of *Leptospira* in the freshly collected urine samples after centrifugation and Fontana's Silver staining revealed that 12 of 45 (26.7%) contained *Leptospira* spp. Among these 12 samples, *Leptospira* could be cultured from 6 of the different aliquots of same urine samples. Dot-ELISA for *Leptospira* antigen detection was positive for 21 of 45 (46.67%) urine samples

Thus, the diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy, and positive and negative predictive values of the dot-ELISA in comparison with the DFM were 100.0%, 72.72%, 80.00%, 57.14% and 100.0%, respectively; and when compared with the culture method, the figures were 100.0%, 61.54%, 66.68%, 88.51% and 100.0%, respectively. There were 9 urine samples which were dot-ELISA positive but DFM negative. Similarly, there were 15 samples which were dot-ELISA positive but culture

negative. All urine samples showing uncomformed results by dot-ELISA and DFM or culture were subjected to PCR using a pair of oligo-nucleotide primers designed from *Leptospira* 16S RNA, in order to detect the DNA of the organisms. It was found that all of the 21 dot-ELISA positive urine samples revealed *Leptospira* DNA amplicon (331 bp) by PCR which confirmed that the results of dot-ELISA antigen detection results were correct. Moreover, *Leptospira* DNA was detected by the PCR in one of the dot-ELISA negative, DFM negative and culture negative urine sample. The urine sample was MAbLF9 based dot-ELISA positive for non-pathogenic *Leptospira* spp. antigen, indicating that the PCR detects both pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* DNA while dot-ELISA detects only pathogenic *Leptospira* antigen. The diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy, and positive and negative predictive values of the dot-ELISA in comparison with the PCR were 95.45%, 100.0%, 97.77%, 100.0% and 95.83%, respectively. The DNA amplification by PCR could detect *Leptospira* DNA in semen specimens (30%) in this study. It is, therefore, useful for the screening of a semen in semen bank for work on artificial insemination of cattle. Dot-ELISA was not reactive when tested on urine samples of 20 healthy cattle which indicates 100% specificity of the assay.

Dot-ELISA detects only pathogenic *Leptospira* antigen at the diagnostic accuracy equal to PCR. The dot-ELISA is rapid, easy to perform and relatively and arbitrarily inexpensive. It appears to be a very useful test for diagnosis of leptospirosis in cattle where this disease predominates.

The dot-ELISA has been formulated into a test kit called “Lepto-Dot” for detection of antigenuria while the sandwich ELISA has been formulated into “A plate sandwich ELISA” for antigenemia detection. Both test kits are now ready for marketing.

Subproject II

Development of Diagnostic Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Shiga toxin producing-*E. coli*) Infection

Hybridomas secreting monoclonal antibody (MAb) to lipopolysaccharide (LPS) of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O157 and Shiga toxins 1 and 2 and their A and B subunits were produced. The mono-epitope specificities of the MAb

were screened using the homologous antigen and a wide range of heterologous antigens. The MAb to O157 LPS and MAbs to A-and B-subunits of Stx-1 and Stx-2 were used in a dot-ELISA for the detection of their respective antigens in stool rectal swab samples collected from patients with diarrhea. The MAb-based dot-ELISA, when performed in double-blinded manner, was positive for 9 samples (5 Japanese and 4 Thai samples) of 628 patients with diarrheas. Bacterial isolations from the dot-ELISA positive samples revealed 1 sample with non-O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁺ *E. coli*, 2 samples with O157, *stx-1*⁻, *stx-2*⁺ *E. coli*, 1 sample with O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁺ *E. coli*, 1 sample with O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁻ *E. coli*, and 4 samples with untypeable *E. coli*. The results of the 5 Japanese samples tested by the culture and isolation method and the dot-ELISA were conformed. However, the 4 stool samples of the Thai patients were found to harbour *E. coli* but the serotyping was not performed. The MAbO157 dot-ELISA positive sample was subjected to Western blot analysis and O157 lipopolysaccharide was revealed. The 3 samples which were Stx2 positive by dot-ELISA were subjected to Verocytotoxic assay which the positive results were obtained indicating the presence of Stx. The dot-ELISA was negative for other samples.

Shiga toxin producing-*Escherichia coli* (STEC) has not yet been identified as an important etiologic agent of human disease in Thailand. To evaluate the potential for STEC to contribute to human disease in Thailand, 139 fecal samples were collected from healthy cattle from 5 different provinces and the isolated bacteria were analyzed by genotypic and phenotypic methods for STEC. Of 139 samples, 27 (19.4%) were positive for *stx1* and/or *stx2* by multiplex polymerase chain reaction, or for O157 lipopolysaccharide (LPS) by immunoassay. Isolates positive for *stx* and/or O157 were subdivided into 49 strains that varied in the presence of the virulence determinants: *stx1*⁺/*stx2*⁺ (22 strains), *stx2*⁺ (22 strains), *stx1*⁺ (4 strains), and O157 LPS (1 strain). Within these 49 distinguishable strains, other virulence determinants varied as follows: *hlyA*⁺ (77.6%), *eae*⁺ and *tir*⁺ (4.1%), and *katP*⁺ (6.12%). The most predominant profile (22 isolates) was *stx1*⁺/*stx2*⁺, *eae*⁻, *tir*⁻, *etpD*⁻, *hlyA*⁺, *katP*⁻. For further characterization of the isolated strains 2 molecular typing assays, plasmid profiles and ERIC PCR, were performed. The results suggest that the genetic and phenotypic profiles of STEC associated with human disease are not prevalent at this time in cattle in Thailand.

The antigen detection assay, i.e. dot-ELISA is easy to perform and relatively inexpensive compared to the culture, verocytotoxic assay and DNA amplification (PCR)

methods. The procedure requires only 90 min; thus, the results are useful for treatment indication. The dot-ELISA provides multi-sample testing at a single time without significant increase in the turn around time. It does not require additional equipment and does not produce large quantities of contaminated waste. Most of all, the test using a cocktail of MAbs to the A-and B-subunits of both Stx offers detection of the respective antigens in clinical specimens of patients infected with non-O157 Shiga toxin-producing bacteria.

Subproject III

Preparation of oral cholera vaccine component and efficacy testing of a new vaccine adjuvant

Recombinant *V. cholerae* toxin co-regulated pili (TcpA) and cholera toxin (CT) clones were produced. An oral cholera vaccine made up of three *Vibrio cholerae* antigens, i.e. recombinant toxin co-regulated pili (rTcpA), procholeraenoid (P) which is a heat treated-high molecular weight CT, and lipopolysaccharide (LPS) has been formulated into six different formulations. Eight-week-old Wistar rats were divided into nine groups. The first group received the oral vaccine 1 consisting of the three antigens (rTcpA, P and LPS) associated with a liposome (L) and bacterial CpG-DNA (ODN#1826), whereas the rats of groups 2 and 3 received oral vaccines 2 and 3 consisting of the liposome-associated three antigens with and without non-bacterial CpG-DNA (ODN#1982), respectively. Rats of groups 4 received oral vaccine 4 consisting of the three antigens mixed with the ODN#1826 whereas rats of groups 5 and 6 received oral vaccines 5 and 6 consisting of the three antigens with and without ODN#1982, respectively. Rats of groups 7, 8 and 9 received oral placebos, namely ODN#1826 (CpG), liposomes (L), and vaccine diluent, i.e. 5% NaHCO₃ solution, respectively. All vaccines were given orally in three doses at 14-day intervals. It was found that liposomes and ODN#1826 in vaccine 1 displayed better adjuvant properties in terms of evoking the highest immune response to *V. cholerae* antigens compared to other vaccine formulations and placebos, as measured by the appearance of antigen-specific antibody-producing cells in the intestinal lamina propria. The immunogenicity in the order of magnitude of immune response: V1>V2=V3>V4>V5=V6>V7=V8=V9. The results of this study indicate that CpG-DNA and liposome may be effective as a mucosal adjuvant and a delivery vehicle, respectively, for an oral vaccine. Similar vaccine formulations should be tested in humans.

Keywords : Leptospirosis, *Leptospira* spp., hybridoma, monoclonal antibodies, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Shiga toxin, *Vibrio cholerae*, cholera, vaccine, ELISA, diagnosis, genetic engineering, adjuvants

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

โครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

ปัญหาการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคไข้น้ำหนู (Leptospirosis) อยู่ที่ยากต่อการตรวจหาเชื้อก่อโรคจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย (specimens) ทำได้ยากด้วยสาเหตุหลายประการ เช่น เชื้อเจริญเติบโตช้ามากในอาหารเพาะเลี้ยง อาหารเพาะเลี้ยงเตรียมยาก การเพาะเชื้อมีปัญหา การปนเปื้อนโดยเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ และเชื้อราได้ง่ายทำให้เพาะเชื้อเลปโตสไปราไม่ขึ้น มีความไวต่ำมาก (sensitivity) และใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะทราบผล การตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยการย้อมสีหรือใช้กล้องชนิดพื้นที่บ่งแสง (dark field - microscope) ขาดความเฉพาะ การฉีดเข้าสัตว์ทดลองใช้เวลานานและก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม เพราะสัตว์อาจกลายเป็นแหล่งกักตุนเชื้อ (reservoir) และต้องมีโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง การใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เช่น การตรวจหาสารพันธุกรรม [จีน (genes)] ของเชื้อโรคขาดความเฉพาะ มีความไวต่ำเพราะมีตัวยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitors) ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ ค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เครื่องมือพิเศษ รวมทั้งต้องใช้ผู้ชำนาญในการทำการทดสอบ การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรัมของผู้ที่สงสัยว่าติดเชื้อซึ่งองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้วิธีทดสอบแบบไมโครแอกกลูติเนชัน (Microscopic agglutination test; MAT) วิธีนี้ต้องใช้แอนติเจนคือเชื้อเลปโตสไปราที่มีชีวิตหลายกลุ่มและหลายสายพันธุ์ซึ่งเลี้ยงยาก การทดสอบใช้เวลานาน กระบวนการยุ่งยากและขาดความไวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะป่วยเฉียบพลัน (acute infection) และเมื่อเชื้อที่ใช้เป็นแอนติเจนไม่ครอบคลุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของอาการป่วย นอกจากนี้ยังอาจต้องเจาะเลือดจากผู้ป่วยสองครั้งห่างกัน 7-10 วัน การทดสอบแปรผลยากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีภูมิคุ้มกันอยู่ในท้องถิ่นที่มีโรคเลปโตสไปโรซิสประจำถิ่น (endemic) เทคนิค MAT นี้จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเช่น ศูนย์แห่งชาติหรือสถาบันที่รับรองโดยองค์การอนามัยโลก จึงทำให้ต้องรอผลการทดสอบเป็นเวลานานหลายเดือนเพราะห้องปฏิบัติการทั่วไปไม่สามารถทำได้ ดังนั้นผลการวินิจฉัยจึงไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อช่วยบ่งชี้การรักษาได้ ในปัจจุบันมีวิธีทดสอบหาแอนติบอดีที่พยายามทำให้ง่ายและใช้เวลาน้อยลง เช่น การตรวจหาแอนติบอดีชนิดเอ็ม (IgM antibodies) โดยการใช้แท่งจุ่ม (dipstick) หรือวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ แต่ก็พบว่ายังขาดความไวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะป่วยเฉียบพลัน หรือแอนติเจนที่ใช้เตรียม dipstick ซึ่งทำจากต่างประเทศไม่ครอบคลุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วยชาวไทย

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสใหม่ โดยเปลี่ยนแนวคิดและวิธีการจากการตรวจหาตัวเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อหรือการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไปเป็นวิธีตรวจหาแอนติเจนเฉพาะของเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย เช่น ปัสสาวะและเลือดโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเฉพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่ก่อโรคเป็นตัวตรวจจับ (detection reagent) แอนติเจน

คณะผู้วิจัยได้ผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีซึ่งมีความเฉพาะต่อแบคทีเรียในจิ้งนัสเลปโตสไปราทุกสายพันธุ์ทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคและให้ชื่อโมโนโคลนาลแอนติบอดีว่า “MAbLF9” ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG1 นอกจากนี้ยังได้ผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีที่มีความเฉพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคเท่านั้นและไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อที่ไม่ก่อโรคและให้ชื่อโมโนโคลนาลแอนติบอดีว่า MAbLD5 และ MAbLE1 ซึ่งเป็นอิมมูโนโกลบูลินชนิด IgG1 และ IgG2a ตามลำดับ

สำหรับตัวอย่างจากมนุษย์ที่ใช้ตรวจหาแอนติเจนของเลปโตสไปราที่มีทั้งปัสสาวะ ซีรัม พลาสมา และพลาสมาพร้อมกับบัฟเฟอร์ (buffy coat) ซึ่งมีเม็ดเลือดขาวรวมอยู่ด้วย โดยได้ตัวอย่างผู้ป่วยจากโรงพยาบาลสามแห่งในภาคอีสานซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีโรคเลปโตสไปโรซิส นอกจากนี้ยังได้เก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมและคนปกติด้วย

ผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสกลุ่มที่ 1 : จำนวน 60 คนจากโรงพยาบาลจังหวัดขอนแก่น ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสโดยใช้เกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการป่วยเฉลี่ย 2.97 วันก่อนไปโรงพยาบาล ในวันแรกก่อนการรักษาแพทย์ได้เจาะเลือดแยกซีรัมเพื่อตรวจหาแอนติบอดีโดยใช้แท่งจุ่ม (IgM dipstick) ซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศ ซีรัมของผู้ป่วยรายใดให้ผลบวกก็จะถูกส่งไปยืนยันด้วยวิธี MAT ต่อไป ผู้ป่วยรายที่ซีรัมในวันแรกให้ผลลบ IgM dipstick จะถูกเจาะเลือดทดสอบซ้ำในวันที่ 5, 6 หรือ 7 และถ้าปรากฏว่ารายใดให้ผลบวก IgM dipstick ก็จะถูกทดสอบยืนยันด้วย MAT เช่นกัน นอกจากนี้แพทย์ยังได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยทุกคนในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลเพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAb based-dot-blot ELISA ที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น พบว่าผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ผลบวก IgM dipstick คิดเป็นผลบวกสะสม (cumulative positivity) จากการตรวจซีรัมสองครั้งรวมกัน 53.85% และ MAT มี % cumulative positivity [ความไว (sensitivity)] 40% (ทราบผลภายหลังส่งซีรัมไปตรวจ 4 เดือนหรือนานกว่านั้น) ในขณะที่ปัสสาวะซึ่งเก็บเพียงครั้งเดียวในวันแรกที่ผู้ป่วยไปถึงโรงพยาบาล ให้ผลบวก 61.67% และใช้เวลาทดสอบเพียง 1-2 ชั่วโมง

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา ที่แพทย์วินิจฉัยเบื้องต้นตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 8 คน มีไข้มาแล้วเฉลี่ย 6.9 วันก่อนไปโรงพยาบาล ผลการตรวจซีรัมโดย MAT พบว่า 4 จาก 8 ราย (50%) ให้ผลบวก (ทราบผลภายหลังส่งซีรัมไปตรวจ 4 เดือนหรือนานกว่า และต้องส่งซีรัมมากกว่าหนึ่งตัวอย่าง) ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในวันแรกจากผู้ป่วยกลุ่มนี้เมื่อตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี MAb based-dot-ELISA พบว่ามีผลบวกถึง 5 ราย จากผู้ป่วย 8 ราย (62.5%) และเมื่อตรวจปัสสาวะผู้ป่วย 3 รายที่ให้ผลลบในวันแรกอีกครั้งหนึ่งพบว่าให้ผลบวกทั้ง 3 ราย ดังนั้น % cumulative positivity (sensitivity) ของการตรวจหาแอนติเจนจึงเป็น 100%

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 3 จำนวน 36 คน เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลขอนแก่นที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส มีอาการป่วยมาแล้วเฉลี่ย 3.4 วัน ในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลได้ถูกเจาะเลือดเพื่อทดสอบด้วย IgM dipstick เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 เมื่อ IgM dipstick ให้ผลบวกก็จะส่งซีรัมนั้นๆไปยืนยันด้วยวิธี immunofluorescence antibody test (IFA) ซึ่งรายได้ที่ให้ผลบวก IFA ก็จะถูกส่งต่อไปทดสอบหา MAT titer ส่วนรายได้ที่ซีรัมของวันแรกให้ผลลบเมื่อตรวจด้วย IgM dipstick ก็จะถูกตรวจซ้ำเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ในวันที่ 5, 6 หรือ 7 ผู้ป่วยกลุ่มนี้แพทย์ได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะในวันแรกและวันที่ 2, 3, 7 และ 14 เพื่อตรวจหาแอนติเจน พบว่า IgM dipstick มี % cumulative positivity 69.4%, IFA มี % positivity จากตัวอย่างที่ให้ผลบวก IgM dipstick 64% และ MAT มี % positivity จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้ง IgM dipstick และ IFA 85.7% การตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างปัสสาวะในวันแรกมี % positivity 75.0% และเพิ่มเป็น 88.9%, 97.2%, 97.2% และ 100% ในวันที่ 2, 3, 7 และ 14 ตามลำดับ

ผู้ป่วยกลุ่มที่ 4 เป็นผู้ป่วยที่การเพาะเชื้อเชื้อเลปโตสไปราในเลือดและ/หรือน้ำจากไขสันหลังหรือการทดสอบซีรัมโดย MAT ให้ผลบวก (ทราบผล 4-6 เดือนหลังป่วย) จำนวน 22 คน จากโรงพยาบาลจังหวัดอุบลราชธานี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการป่วยมาก่อนแล้วเฉลี่ย 4.2 วัน เมื่อทำการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี MAb based-dot-blot ELISA พบว่าปัสสาวะซึ่งเก็บจากผู้ป่วยในวันแรก และ วันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มี % positivity 81.8%, 95.5%, 100%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเฉพาะและความแม่นยำของชุดตรวจ MAb based-dot-ELISA ที่ได้พัฒนาขึ้นกับปัสสาวะจากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมและจากคนปกติโดยตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ ซึ่งได้ผลดังนี้

ผู้ป่วยกลุ่มควบคุมประกอบด้วย ผู้ป่วยซึ่งแพทย์ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามีไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ (P.U.O.) จำนวน 26 คน แต่ต่อมาพบว่าสามารถจำแนกได้ดังนี้ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma; CCA) 10 ราย ผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิส (จากการวินิจฉัยตามอาการ) 8 ราย ผู้ป่วยมาลาเรีย (พบเชื้อในเลือด) 3 ราย ผู้ป่วยสครับไทฟัส (พบแอนติบอดีโดยการตรวจทางซีโรโลยี) 1 รายและผู้ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 4 ราย ผลการตรวจปัสสาวะที่เก็บจากผู้ป่วยคนละ 1 ครั้งพบว่าผู้ป่วย 3 ราย ที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการว่าเป็นเมลิออยโดซิสให้ผลบวกต่อการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปโรซิส ดังนั้นจึงนำปัสสาวะของผู้ป่วย 3 รายนี้ไปทดสอบด้วยวิธีเวสต์เทิร์นบลอตพบว่าไม่มีแถบแอนติเจน-แอนติบอดี ตรงตำแหน่ง 38 กิโลดัลตัน เมื่อตรวจด้วย MAbLF9 และมีแถบแอนติเจน-แอนติบอดีตรงตำแหน่ง 35-36 กิโลดัลตัน เมื่อตรวจด้วย MAbLD5 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราเป็นผลบวกจริง ส่วนอีก 23 รายให้ผลลบ

จากตัวอย่างปัสสาวะของคนปกติ 120 ราย ซึ่งเป็นชาวอีสานเช่นเดียวกับผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสพบว่าไม่มีแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา 1 ราย อย่างไรก็ตามเนื่องจากไม่มีตัวอย่างเหลือพอสำหรับการตรวจยืนยันด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอตจึงไม่อาจบอกได้ว่าเป็นผลบวกปลอมหรือผลบวกจริง กรณีนี้ผู้วิจัยมีความเห็นว่าอาจเป็นเพราะกำลังติดเชื้อโดยไม่มีอาการป่วย หรือเคยป่วยแต่ได้รับประทานยาเองและหายแล้วแต่ยังคงมีเชื้ออยู่ก็เป็นได้

นอกจากการพัฒนาชุดตรวจ MAb based-dot-blot ELISA สำหรับตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะแล้ว ผู้วิจัยยังได้พัฒนาชุดตรวจหาแอนติเจนในเลือดด้วยวิธี PAb-MAb based-sandwich ELISA ด้วย และพบว่าการตรวจหาแอนติเจนในซีรัมหรือพลาสมานั้นมีความไวต่ำ แต่การใช้พลาสมาและ buffy coat รวมกันเป็นตัวอย่างสำหรับตรวจให้ความไวสูง 100% ทั้งในสัตว์ที่ทดลองให้ติดเชื้อและในผู้ป่วย

ชุดตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะดังกล่าวข้างต้นได้ถูกนำไปใช้ตรวจกรองวัวจากฟาร์มที่เคยมีประวัติการแท้งเพราะโรคเลปโตสไปโรซิสพบว่าสามารถใช้ได้ดี

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้พัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อใช้ตรวจการปนเปื้อนเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างน้ำเชื้อวัว (semen) จากคลั่งน้ำเชื้อของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ด้วย ซึ่งการตรวจกรองดังกล่าวจะช่วยให้หลีกเลี่ยงการใช้น้ำเชื้อซึ่งปนเปื้อน (contaminated semen) ในการผสมเทียมเพื่อป้องกันการแท้งลูกของแม่วัว

โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนากรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยาสำหรับวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล (อี โคไล) [กลุ่ม O157 และกลุ่มที่ผลิตสารพิษชิกา (Shiga toxin producing-*E. coli*; STEC)]

คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธี monoclonal antibody based dot-ELISA (dot-ELISA) เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้ออีโคไลกลุ่ม O157 และ STEC โดยการผลิตไฮบริโดมาซึ่งสร้างและหลั่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) เฉพาะต่อ O157 lipopolysaccharide (LPS) และสารพิษชิกาทั้งชนิดที่ 1 (Shiga toxin 1) และชนิดที่ 2 (Shiga toxin 2) ทั้งต่อส่วนเอ (A subunit) และส่วนบี (B subunit) ของสารพิษทั้งสองชนิดคือ MAbO157, MAbStx1A, MAbStx1B, MAbStx2A และ MAbStx2B และใช้ MAb เหล่านี้เป็น detection reagents เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างอุจจาระและ/หรือ rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงสีกลุ่มเปรียบเทียบกับวิธีเพาะแยกเชื้อโดยวิธีมาตรฐาน (conventional culture method) ตัวอย่างใดที่ให้ผลไม่ตรงกัน ได้ตรวจยืนยันด้วยวิธีที่สามคือวิธี Verocytotoxic assay เพื่อตรวจหา Shiga toxin หรือวิธีที่สี่คือวิธี Western blot analysis เพื่อตรวจหา O157 lipopolysaccharide (O157 LPS)

ตัวอย่างอุจจาระผู้ป่วยที่ใช้ในโครงการย่อยที่ 2 นี้แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างจากการใช้สำลีพันปลายไม้แฉะเข้าทางทวารหนักของผู้ป่วยเพื่อให้อุจจาระติดออกมา (rectal swabs) จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 499 คนจากโรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี การเพาะแยกเชื้อโดยวิธีเพาะเชื้อมาตรฐานทำที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้าโดยนักเทคนิคการแพทย์ของโรงพยาบาล ส่วน rectal swabs ซึ่งนำไปบ่มในอาหารพิเศษชื่อ buffered peptone water (BPW) ส่งไปตรวจหาแอนติเจนที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน กรุงเทพฯ ผลการทดสอบนำมาเปรียบเทียบกับหลังจากทดสอบเสร็จทั้งหมดทุกตัวอย่างแล้วทั้งสองวิธี กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยอุจจาระร่วงชาวญี่ปุ่นจำนวน 5 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บโดย Dr. A. Kai, Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo ประเทศญี่ปุ่น การเพาะแยกเชื้อทำโดย Dr. A. Kai ส่วนการทดสอบหาแอนติเจนทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ โดยวิธี dot-ELISA ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 เป็น rectal swabs ในอาหารถนอมเชื้อชื่อ buffered glycerol saline (BGS) ของผู้ป่วยอุจจาระร่วงชาวเวียดนามจำนวน 42 คน ซึ่งไปขอรับการรักษาที่ 108 Hospital, Hanoi การเพาะแยกและตรวจหาเชื้อทำที่ห้องปฏิบัติการของ 108 Hospital และการตรวจหาแอนติเจนโดย dot-ELISA ทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ตัวอย่างกลุ่มที่ 4 เป็น rectal swabs ใน BPW ของผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 82 คน ซึ่งไปขอรับการรักษาที่โรงพยาบาลบาราตุนราตอร์ จังหวัดนันทบุรี การเพาะแยกเชื้อทำที่โรงพยาบาลบาราตุนราตอร์ ส่วนการตรวจหาแอนติเจนโดย dot-ELISA ทำที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ เช่นเดียวกับตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

ผลการตรวจหาแอนติเจนชนิด O157 และสารพิษชิกา Shiga toxins ในตัวอย่างอุจจาระและ rectal swabs ทั้งหมด 628 ราย พบว่ามีผลเป็นบวกเพียง 9 ราย คือ ตัวอย่างอุจจาระจากชาวญี่ปุ่น 5 รายและชาวไทยจากโรงพยาบาลพระจอมเกล้า เพชรบุรี 4 ราย ผลการเพาะแยกเชื้อพบว่าจากอุจจาระของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น 5 ราย แยกแบคทีเรียได้ดังนี้คือ 1 รายได้ *E. coli* non-O157, *stx1*⁺, *stx2*⁺, 2 รายได้ *E. coli* O157, *stx1*⁺, *stx2*⁺, 1 รายได้ *E. coli* O157, *stx1*⁺, *stx2*⁺, และ 1 รายเป็น *E. coli* O157, *stx1*⁺, *stx2*⁻ ส่วน rectal swabs จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ราย ที่ให้ผลบวก dot-ELISA นั้น 1 รายให้ผลบวกต่อ MAbO157 อีก 3 รายให้ผลบวกต่อ MAbStx2A และ MAbStx2B และผลการเพาะแยกเชื้อ แยกได้ *E. coli* แต่ไม่สามารถ type ได้ อย่างไรก็ตามก็ Western blot analysis ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MAb O157 โดย dot-ELISA พบว่ามีลิโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) ชนิด O157 อยู่จริงและ 3 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MAbStx2A และ MAbStx2B โดย dot-ELISA พบว่าให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธีเดิมลงในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดวีโร ซึ่งถ้าตัวอย่างมีสารพิษชิกาก็จะทำให้เซลล์ตาย (Verocytotoxic assay) ซึ่งแสดงว่ามี Shiga toxin อยู่ในตัวอย่างจริง แต่เนื่องจากปริมาณของตัวอย่างมีน้อยจึงไม่สามารถนำไปทำการทดสอบเพื่อหาชนิดของ Shiga toxin ว่าเป็นชนิดที่ 1 (Stx1) หรือชนิดที่ 2 Stx2 ได้

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้สำรวจหาเชื้อ STEC และ O157 *E. coli* จากอุจจาระวัว-ควายซึ่งมีรายงานว่าเป็นแหล่งกักตุนเชื้อ (reservoir) STEC ในจังหวัดต่างๆ 5 จังหวัดคือนครปฐม ราชบุรี ลพบุรี นนทบุรี และอุบลราชธานี พบว่าจากจำนวนอุจจาระของวัวปกติ 139 ตัวสามารถเพาะแยกเชื้อ STEC ได้ 48 สายพันธุ์และ O157 *E. coli* 1 สายพันธุ์รวมเป็น 49 สายพันธุ์จากการศึกษาจีโนมด้วยวิธีเพิ่มสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (พีซีอาร์) มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ เอริก-พีซีอาร์ (ERIC-PCR) ศึกษาพลาสมิดและการดื้อยาปฏิชีวนะพบว่า STEC และ O157 *E. coli* ที่แยกได้จากอุจจาระวัว-ควาย จำนวน 22 สายพันธุ์จาก 49 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁺, 22 จาก 49 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁺, 4 สายพันธุ์เป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁻, และ 1 สายพันธุ์เป็น O157⁺*stx1*⁻/*stx2*⁻ ซึ่งผลการทดสอบด้วย Verocytotoxic assay และ MAb O157 dot-ELISA ให้ผลตรงกับพีซีอาร์และมัลติเพล็กซ์ พีซีอาร์จาก 49 สายพันธุ์พบว่า 38 สายพันธุ์มี *hlyA* gene จากการตรวจด้วยพีซีอาร์ และ 37 จาก 38 สายพันธุ์นี้ผลิตสารซึ่งทำให้เกิดเลือดแดงแตก (hemolysin) ซึ่งทำให้เกิดการแตกแบบนี้เรียกว่า α -hemolysis ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่ผสมเม็ดเลือดแดง (blood agar plates) จากการตรวจซีโรกรุ๊ปของเชื้อทั้ง 49 สายพันธุ์ด้วยแอนติซีรัมเฉพาะ (serogroup specific antisera) พบว่าสามารถบอกซีโรกรุ๊ปได้เพียง 16 สายพันธุ์คือ 7 สายพันธุ์เป็น O8 และ 3 สายพันธุ์เป็น O15 ส่วนอีก 6 สายพันธุ์พบว่าเป็น O27, O29, O142, O152, O157 และ O168 ซีโรกรุ๊ปละ 1 สายพันธุ์สำหรับ 33 สายพันธุ์ที่ type ไม่ได้นั้น พบว่ามี *stx* gene (s) ทุกสายพันธุ์ โดย 30 สายพันธุ์เป็น smooth variants และอีก 3 สายพันธุ์เป็น rough mutants จากสายพันธุ์ที่บอกชนิดได้นั้น ได้พบว่า 2 สายพันธุ์ที่เป็น O15 มี *eae* และ *tir* genes ซึ่งเป็น virulence factors ที่สำคัญในการก่อโรคเมื่อศึกษาหา genes อื่นๆในพลาสมิดคือ *etpD* และ *katP* พบว่าไม่มี isolate ใดมี *etpD* gene และ 3 สายพันธุ์มี *katP* gene จากการตรวจความไวต่อยาปฏิชีวนะ (แอมพิซิลลิน 10 ไมโครกรัม คลอแรมเฟนิคอล 30 ไมโครกรัม เชฟาลอซิทิน 30 ไมโครกรัมและซัลฟาเมท็อกซาโซล-ตรัยเมโทพริม 25 ไมโครกรัม) พบว่า 48 จาก 49 สายพันธุ์ไวต่อยาที่ทดสอบ และมีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ดื้อยาแอมพิซิลลิน คลอแรมเฟนิคอลและซัลฟาเมท็อกซาโซล-ตรัยเมโทพริม จากการจำแนก STEC และ O157 *E. coli* ทั้ง 49 สายพันธุ์โดยใช้ genes ในโครโมโซมและพลาสมิดและความไว (S) หรือความดื้อ (R) ต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 9 กลุ่มและกลุ่มที่พบมากที่สุดคือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็น non-O157, *stx1*⁺/*stx2*⁺, *eae*⁻, *tir*⁻, *etpD*⁻, *hlyA*⁺, *katP*⁻, S

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 49 สายพันธุ์ตามจำนวนและขนาดของ พลาสมิดออกเป็น 10 กลุ่ม โดย 46 สายพันธุ์มีพลาสมิดต่างกันเป็น 9 กลุ่มและ 3 สายพันธุ์ไม่มีพลาสมิดจำนวนพลาสมิดที่พบมีตั้งแต่ 1-9 พลาสมิด และมีขนาดตั้งแต่ 1-9 กิโลเบส (Kb) จากการใช้เทคนิค ERIC-PCR พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียทั้ง 49 สายพันธุ์ได้เป็น 11 กลุ่ม คือมี bands 3-6 bands ซึ่งมีขนาดต่างกันตั้งแต่ >100 - 3,000 bp

ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า STEC และ O157 *E. coli* ที่พบในวัว-ควายสุขภาพปกติในประเทศไทยมีจีโนมที่คล้ายกันและฟีโนไทป์ที่หลากหลาย และแม้ว่าจะยังไม่พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดมี virulence genes ที่ครบถ้วนสำหรับก่อโรคในมนุษย์แต่การที่มีแบคทีเรียที่มี virulence genes ต่างๆกันอยู่ในอุจจาระวัว-ควายตัวเดียวกัน หรือฝูงเดียวกัน อาจเอื้อให้เกิดการถ่ายทอดยีนระหว่างแบคทีเรียและเชื้ออาจมีวิวัฒนาการเป็นเชื้อก่อโรคในคนได้

โครงการย่อยที่ 3

การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกินและการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเจนชนิดใหม่

ผู้วิจัยได้ผลิตส่วนที่เชื้ออหิวาต์ใช้จับกับเซลล์ในลำไส้ของโฮสต์คือ toxin co-regulated pili และ สารพิษ (CT) ของเชื้ออหิวาต์โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกิน โดยก่อนใช้ได้นำ CT ไปบ่มด้วยความร้อนจนความเป็นพิษของส่วนเอ็กโซทอกซินหมดแต่ส่วนที่ยังคงอยู่และจับกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ (polymers) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในโฮสต์ (immunogenicity) และเรียกโมเลกุลของ CT ที่เปลี่ยนแปลงไปว่า procholeraeagenoid หรือ P จากนั้นเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนอีกชนิดหนึ่งคือ ลิโปโซมแซคคาไรด์ [*V. cholerae* lipopolysaccharide (LPS)] แล้วนำ LPS, TcpA และ P ไปเตรียมวัคซีนสูตร (formulation) ต่างๆ 6 สูตรด้วยกันคือ vaccine 1 ประกอบด้วย LPS, TcpA และ P [รวมเรียกว่า antigen (Ag)] ใส่ในลิโปโซม (liposome; L) และผสม bacterial CpG (vaccine 1 = Ag + L + CpG), vaccine 2 ประกอบด้วย Ag + L + non CpG DNA, vaccine 3 ประกอบด้วย L + Ag, vaccine 4 ประกอบด้วย CpG DNA + Ag, vaccine 5 ประกอบด้วย non CpG DNA + Ag และ vaccine 6 ประกอบด้วย Ag (LPS, TcpA และ P) เท่านั้น นำวัคซีนทั้ง 6 formulations ไปทดสอบในหนู Wistar rats 6 กลุ่ม โดยให้หนูแต่ละกลุ่มกินวัคซีนแต่ละชนิดรวม 3 doses ห่างกันโดสละ 14 วัน นอกจากนี้ยังมีหนูกลุ่มควบคุมอีก 3 กลุ่ม ซึ่งได้รับวัคซีนหลอก (placebos) คือ CpG DNA, L, และ vaccine diluent (3 ml 5% NaHCO₃) ตามลำดับ หลังจากได้รับวัคซีนหรือ placebos โดสสุดท้ายแล้ว 7 วันได้เจาะเลือดหนู rats ทุกตัวเพื่อหาระดับซีบีไอโคไลน์ รวมทั้งได้ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนทั้งสามชนิดในลำไส้ส่วนเจจูนัมด้วยวิธีแซนด์วิชอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าวัคซีนทั้ง 6 สูตรมี immunogenicity จากสูงไปต่ำเมื่อเทียบกับตนเองและเทียบกับกลุ่ม placebos ดังนี้

Vaccine 1 > vaccine 2 = vaccine 3 > vaccine 4 > vaccine 5 = vaccine 6 > placebo 1 = placebo 2 = placebo 3

ส่วนการตรวจหาซีบีไอโคไลน์คือ IL-4 และ IL-10 ในเลือดซึ่งเก็บในวันที่ 7 หลังจากหนูทดลองได้รับวัคซีนหรือ placebos โดสสุดท้ายไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงใดๆเมื่อเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้รับวัคซีนและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเจาะเลือดในวัน

ที่ 7 หลังจากได้รับวัคซีนและ placebos โดสสุดท้ายนั้นค่อนข้างล่าช้าเกินไปและระดับชั้โตไคน์ต่างๆได้ลดระดับลงแล้วหรือเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของชั้โตไคน์มีอยู่เพียงในลำไส้และตรวจไม่พบในกระแสเลือด เนื่องจากเป็นที่ทราบว่ชั้โตไคน์ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์แบบ paracrine เป็นระยะเวลาสั้นๆ ดังนั้นการวัดระดับชั้โตไคน์ในเลือดจึงไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ และควรวัดระดับ mRNA ของชั้โตไคน์แต่ละชนิดในเซลล์มากกว่า

อย่างไรก็ดีสามารถสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยได้ผลิต recombinant vaccine components แล้วตามที่เสนอและได้ทดสอบประสิทธิภาพของ CpG-DNA ซึ่งเป็นแอดจูแวนท์ชนิดใหม่ในการเพิ่ม immunogenicity ของวัคซีนป้องกันอหิวาต์ชนิดกินแล้วและพบว่า CpG-DNA ได้ทำให้ immunogenicity ของวัคซีนเพิ่มขึ้น

คำหลัก : โรคเลปโตสไปโรซิส (โรคไข้ฉี่หนู) เชื้อเลปโตสไปรา ไฮบริโดมา โมโนโคลนาล แอนติบอดี เชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิก เอชเชอริเชียโคไล สารพิษชิกกา เชื้ออหิวาต์ (วิริโอ คอโรเรีย) โรคอหิวาต์ วัคซีน อีไลซา การวินิจฉัยโรค พันธุวิศวกรรม แอดจูแวนท์

Executive Summary

Subproject I

Development of a Ready- to- Use Diagnostic Test Kit for Leptospirosis

Hybridomas secreting specific monoclonal antibodies (MAb) to all members of the genus *Leptospira* (clone LF9) and those that are specific only to the pathogenic species (clones LD5 and LE1) were produced. MAb LF9, which was immunoglobulin G1 (IgG1), reacted to a 38-kDa component of the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis-separated whole-cell homogenates of all *Leptospira* spp., while MAb LD5 and MAb LE1, which were IgG1 and IgG2a, respectively, reacted to the 35- to 36-kDa components of homogenates of all serogroups of the pathogenic species of *Leptospira*. The MAb LD5 was used in a dot blot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for detecting *Leptospira* antigen in urine samples either singly collected or serially collected from four groups of patients diagnosed with leptospirosis, i.e., **group 1**: 60 patients clinically diagnosed leptospirosis using WHO criteria. They had had fever for the average of 2.97 days before hospitalization. Single urine samples were collected from individual patients upon hospital arrival and before any treatment; **group 2** included 8 clinically diagnosed patients. Urine samples were collected from them three times, i.e. days 1, 7-19 and 22-38; **group 3** were 36 clinically diagnosed leptospirosis patients. Urine samples were collected on days 1, 2, 3, 7 and 14 of hospitalization and **group 4** were 22 patients whose samples were positive either by culture for *Leptospira* spp. or by MAT. Urine samples were collected from them on days 1-7. The serum samples of patients were tested serologically by IgM dipstick assay, indirect immunofluorescence assay (IFA), and/or microscopic agglutination test (MAT). Urine samples of 26 patients diagnosed with other illnesses and 120 healthy individuals serve as controls.

For the first group of patients, their blood samples taken at the first day of hospital arrival and 5, 6 or 7 days later revealed cumulative positivity at 53.85% by IgM dipstick (tested twice at 5-7 days interval) and 40% by MAT (the results were obtained about 4 months after sending the sera). Their single urine samples collected on the first day of hospitalization gave 61.67% positivity by MAb based dot-ELISA and the test time was only 1-2 hours. For the second group of patients, who had been ill for an average of 6.9 days before hospitalization, the MAT were positive for 4 of 8 (50%) patients, while the *Leptospira* antigenuria tested by the MAb-based dot-ELISA was positive for 62.5%, 100%

and 100% of the urine samples collected on days 1, 7-19 and 22-38, respectively. For the third group of patients who were 36 clinically diagnosed leptospirosis and who had been ill for an average of 3.4 days before hospitalization, the IgM dipstick (tested twice), IFA and MAT were positive for 83.3%, 70% and 85.7% of patients, while the *Leptospira* antigenuria tested by the MAb based dot-ELISA was positive for 75%, 88.9%, 97.2%, 97.2% and 100% on days 1, 2, 3, 7 and 14 of hospitalization, respectively. All but 1 of 11 patients whose serum samples collected on the first day of hospitalization were IgM seronegative, were positive by urine antigen test on day 1. This is a strong evidence that detection of antigen in urine can provide diagnostic information that could be useful in directing early therapeutic intervention. For the fourth group of patients who had been ill for an average of 4.2 days before hospitalization, the cumulative positivity of MAT (tested twice on two serum samples and the results were obtained after 4 months) was 72.7% and the *Leptospira* antigen was found in 77.3%, 81.8%, 95.5%, 100, 100, 100, and 100% of the patients' urine samples collected on days 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 of hospitalization, respectively. *Leptospira* antigenuria was found in 3 of the 26 patients diagnosed with other illnesses (3 clinically diagnosed melioidosis) and 1 of the 120 healthy controls. Western blot analysis revealed that the samples really contained *Leptospira* specific antigens. The detection of antigen in urine by the monoclonal antibody-based dot-ELISA has high potential for rapid, sensitive, and specific diagnosis of leptospirosis at a low cost.

Besides urine antigen detection, we have developed an antigenemia detection assay in the form of PAb-MAb sandwich ELISA. The test revealed 100% specificity and sensitivity when buffy coat + plasma of patients who were MAT and IFA positive for leptospirosis were tested.

The urine antigen detection assay was also applied to study leptospirosis in cattle. The experiments and their results are the following:

Forty-five serum samples of leptospirosis suspected cattle [(serum MAT titer $\geq$ 1:50 as tested by the National Institute of Animal Health (NIAH)] were re-tested by MAT using a larger panel of live *Leptospira* serovars. On the day of serum collection, urine samples from these cattle were also collected for *Leptospira* culture, dark-field microscopy plus Fontana's Silver staining and *Leptospira* antigen detection by dot-ELISA. Serum and urine samples from twenty healthy cattle were used as negative controls.

Thirty out of 45 (66.67%) serum samples of leptospirosis suspected cattle were positive by the re-tested MAT. Among them, 40% had antibodies to serovar hardjo, 26.67% of them had antibodies to serovar ranarum and sejroe, while antibodies to serovars ballum, hyos and wolffi were found in 16.67%, 13.33% and 13.33%, respectively. Fifty percent of the MAT positive serum samples revealed antibodies to more than one *Leptospira* serovar. All serum samples of the 20 healthy cattle were negative by MAT.

Dark-field microscopy for direct visualization of *Leptospira* in the freshly collected urine samples after centrifugation and Fontana's Silver staining revealed that 12 of 45 (26.7%) contained *Leptospira* spp. Among these 12 samples, *Leptospira* could be cultured from 6 of the different aliquots of the same urine samples. Dot-ELISA for *Leptospira* antigen detection was positive for 21 of 45 (46.67%) urine samples.

Thus, the diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy, and positive and negative predictive values of the dot-ELISA in comparison with the DFM were 100.0%, 72.72%, 80.00%, 57.14% and 100.0%, respectively; and when compared with the culture method, the figures were 100.0%, 61.54%, 66.68%, 88.51% and 100.0%, respectively. There were 9 urine samples which were dot-ELISA positive but DFM negative. Similarly, there were 15 samples which were dot-ELISA positive but culture negative. All urine samples showing uncomformed results by dot-ELISA and DFM or culture were subjected to PCR using a pair of oligo-nucleotide primers designed from *Leptospira* 16S RNA, in order to detect the DNA of the organisms. It was found that all of the 21 dot-ELISA positive urine samples revealed *Leptospira* DNA amplicon (331 bp) by PCR which confirmed that the results of dot-ELISA antigen detection results were correct. Moreover, *Leptospira* DNA was detected by the PCR in one of the dot-ELISA negative, DFM negative and culture negative urine sample. The urine sample was MAbLF9 based dot-ELISA positive for non-pathogenic *Leptospira* spp. antigen, indicating that the PCR detects both pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* DNA while dot-ELISA detects only pathogenic *Leptospira* antigen. The diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy, and positive and negative predictive values of the dot-ELISA in comparison with the PCR were 95.45%, 100.0%, 97.77%, 100.0% and 95.83%, respectively. The DNA amplification by PCR could detect *Leptospira* DNA in semen specimens (30%) in this study. It is, therefore, useful for screening of a semen in semen bank for the work on artificial insemination of cattle. Dot-ELISA was not reactive when tested on urine samples of 20 healthy cattle which indicates 100% specificity of the assay.

Dot-ELISA detects only pathogenic *Leptospira* antigen at the diagnostic accuracy equal to PCR. The dot-ELISA is rapid, easy to perform and relatively and arbitrarily inexpensive. It appears to be a very useful test for diagnosis of leptospirosis in cattle where this disease predominates.

The dot-ELISA has been formulated into a test kit called “Lepto-Dot” for detection of antigenuria while the sandwich ELISA has been formulated into “A plate sandwich ELISA” for antigenemia detection. Both test kits are now ready for marketing.

Subproject II

Development of Diagnostic Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Shiga toxin producing-*E. coli*) Infection

Hybridomas secreting monoclonal antibody (MAb) to lipopolysaccharide (LPS) of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O157 and Shiga toxins 1 and 2 and their A and B subunits were produced. The mono-epitope specificities of the MAb were screened using the homologous antigen and a wide range of heterologous antigens. The MAb to O157 LPS and MAbs to A-and B-subunits of Stx-1 and Stx-2 were used in a dot-ELISA for the detection of their respective antigens in stool rectal swab samples collected from patients with diarrhea. The MAb-based dot-ELISA, when performed in double-blinded manner, was positive for 9 samples (5 Japanese and 4 Thai samples) of 628 patients with diarrheas. Bacterial isolations from the dot-ELISA positive samples revealed 1 sample with non-O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁺ *E. coli*, 2 samples with O157, *stx-1*⁻, *stx-2*⁺ *E. coli*, 1 sample with O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁺ *E. coli*, 1 sample with O157, *stx-1*⁺, *stx-2*⁻ *E. coli*, and 4 samples with untypeable *E. coli*. The results of the 5 Japanese samples tested by the culture and isolation method and the dot-ELISA were conformed. However, the 4 stool samples of the Thai patients were found to harbour *E. coli* but the serotyping was not performed. The MAbO157 dot-ELISA positive sample was subjected to Western blot analysis and O157 lipopolysaccharide was revealed. The 3 samples which were Stx2 positive by dot-ELISA were subjected to Verocytotoxic assay which the positive results were obtained indicating the presence of Stx. The dot-ELISA was negative for other samples.

Shiga toxin producing-*Escherichia coli* (STEC) has not yet been identified as an important etiologic agent of human disease in Thailand. To evaluate the potential for STEC to contribute to human disease in Thailand, 139 fecal samples were collected from healthy cattle from 5 different provinces and the isolated bacteria were analyzed by genotypic and phenotypic methods for STEC. Of 139 samples, 27 (19.4%) were positive for *stx1* and/or *stx2* by multiplex polymerase chain reaction, or for O157 lipopolysaccharide (LPS) by immunoassay. Isolates positive for *stx* and/or O157 were subdivided into 49 strains that varied in the presence of the virulence determinants: *stx1*⁺/*stx2*⁺ (22 strains), *stx2*⁺ (22 strains), *stx1*⁺ (4 strains), and O157 LPS (1 strain). Within these 49 distinguishable strains, other virulence determinants varied as follows: *hlyA*⁺ (77.6%), *eae*⁺ and *tir*⁺ (4.1%), and *katP*⁺ (6.12%). The most predominant profile (22 isolates) was *stx1*⁺/*stx2*⁺, *eae*⁻, *tir*⁻, *etpD*⁻, *hlyA*⁺, *katP*⁻. For further characterization of the isolated strains 2 molecular typing assays, plasmid profiles and ERIC-PCR, were performed. The results suggest that the genetic and phenotypic profiles of STEC associated with human disease are not prevalent at this time in cattle in Thailand.

The antigen detection assay, i.e. dot-ELISA is easy to perform and relatively inexpensive compared to the culture, Verocytotoxic assay and DNA amplification (PCR) methods. The procedure requires only 90 min; thus, the results are useful for treatment indication. The dot-ELISA provides multi-sample testing at a single time without significant increase in the turn around time. It does not require additional equipment and does not produce large quantities of contaminated waste. Most of all, the test using a cocktail of MAbs to the A-and B-subunits of both Stx offers detection of the respective antigens in clinical specimens of patients infected with non-O157 Shiga toxin-producing bacteria.

Subproject III

Preparation of oral cholera vaccine component and efficacy testing of a new vaccine adjuvant

Recombinant *V. cholerae* toxin co-regulated pili (TcpA) and cholera toxin (CT) clones were produced. An oral cholera vaccine made up of three *Vibrio cholerae* antigens, i.e. recombinant toxin co-regulated pili (rTcpA), procholeraenoid (P) which is a heat treated-high molecular weight CT, and lipopolysaccharide (LPS) has been formulated into six different formulations. Eight-week-old Wistar rats were divided into nine groups.

The first group received the oral vaccine 1 consisting of the three antigens (rTcpA, P and LPS) associated with a liposome (L) and bacterial CpG-DNA (ODN#1826), whereas the rats of groups 2 and 3 received oral vaccines 2 and 3 consisting of the liposome-associated three antigens with and without non-bacterial CpG-DNA (ODN#1982), respectively. Rats of groups 4 received oral vaccine 4 consisting of the three antigens mixed with the ODN#1826 whereas rats of groups 5 and 6 received oral vaccines 5 and 6 consisting of the three antigens with and without ODN#1982, respectively. Rats of groups 7, 8 and 9 received oral placebos, namely ODN#1826 (CpG), liposomes (L), and vaccine diluent, i.e. 5% NaHCO₃ solution, respectively. All vaccines were given orally in three doses at 14-day intervals. It was found that liposomes and ODN#1826 in vaccine 1 displayed better adjuvant properties in terms of evoking the highest immune response to *V. cholerae* antigens compared to other vaccine formulations and placebos, as measured by the appearance of antigen-specific antibody-producing cells in the intestinal lamina propria. The immunogenicity in the order of magnitude of immune response: V1>V2=V3>V4>V5=V6>V7=V8=V9. The results of this study indicate that CpG-DNA and liposome may be effective as a mucosal adjuvant and a delivery vehicle, respectively, for an oral vaccine. Similar vaccine formulations should be tested in humans.

Keywords : Leptospirosis, *Leptospira* spp., hybridoma, monoclonal antibodies, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Shiga toxin, *Vibrio cholerae*, cholera, vaccine, ELISA, diagnosis, genetic engineering, adjuvants

โครงการวิจัยเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา

เรื่อง “วิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อและ

การพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนดิกัน”

สิงหาคม 2543 ถึง สิงหาคม 2546

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเขตร้อนที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น อหิวาต์ (อุจจาระร่วงอย่างแรง) ไทฟอยด์ โรคติดเชื้อซัลโมเนลลา โรคติดเชื้อแบคทีเรียเอชเชอริเชียโคไล โรคบิด โรคฉี่หนู (โรคเลปโตสไปโรซิส) และโรคติดเชื้อพยาธิต่าง ๆ เช่น โรคฝีบิดในตับ มาลาเรีย โรคพยาธิใบไม้ตับ โรคพยาธิใบไม้เลือด โรคพยาธิตัวจิ๊ด โรคเท้าช้าง (ฟิลาเรียซิส) และอื่นๆล้วนเป็นโรคประจำถิ่น (endemics) และเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนชื้น ซึ่งมักเป็นประเทศกำลังพัฒนาและประชาชนส่วนใหญ่มีฐานะยากจน สำหรับประเทศที่พัฒนาแล้วโรคเหล่านี้มีเพียงประปราย โรคเขตร้อนที่กล่าวถึงแล้วข้างต้นและโรคอื่นๆ อีกหลายโรค นอกจากความจำเป็นในการพัฒนาวัคซีนและการพัฒนายา เพื่อการรักษาที่มีประสิทธิภาพตลอดจนป้องกันมิให้เชื้อเกิดสายพันธุ์ที่ดื้อยาแล้ว การวินิจฉัยโรคให้ถูกต้องแม่นยำมีความสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่งหลายประการ กล่าวคือ สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการเลือกใช้ยา กำหนดข้อบ่งใช้ยา (indication) ห้ามใช้ยา (contra-indication) และการบริหารยา (drug administration) อย่างถูกต้องเหมาะสมกับผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อเพื่อการรักษาให้หายขาดโดยเร็ว เพื่อช่วยชีวิตผู้ป่วยและป้องกันไม่ให้เกิดเป็นพาหะนำโรคหรือป้องกันไม่ให้เกิดเชื้อดื้อยา นอกจากนี้การวินิจฉัยโรคทางวิทยาภูมิคุ้มกันหลายวิธี ยังสามารถใช้จำแนกผู้ป่วยที่กำลังติดเชื้อ (acute/current infection) เคยติดเชื้อเมื่อไม่นานมานี้ (recent infection) หรือเคยติดเชื้อในอดีต (past-cured infection) ได้อีกด้วย หลายวิธีสามารถใช้ประเมินผลการรักษาว่าผู้ป่วยหายขาดแล้วหรือไม่ อีกทั้งมีประโยชน์ต่อการศึกษาวินิจฉัยทางวิทยาการระบาดของโรคอันมีจุดประสงค์เพื่อป้องกัน ควบคุม กำจัดและเฝ้าระวังโรคอีกด้วย การพัฒนาวัคซีนและการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปหรือการคิดค้นพัฒนากรรมวิธี กระบวนการและวิธีการเพื่อวินิจฉัยโรคเขตร้อนเหล่านี้ ประเทศไทยจำเป็นต้องพึ่งตนเอง เนื่องจากบางโรคเป็นปัญหาเฉพาะของประเทศ ในขณะที่หลายโรคไม่มีข้อมูลหรือเทคโนโลยีจากต่างประเทศให้สามารถนำมาดัดแปลงประยุกต์ใช้ได้ การวินิจฉัยโรคโดยปกติจะทำได้หลายวิธีกล่าวคือ (1) แพทย์อาจวินิจฉัยตามอาการหรือสิ่งที่ตรวจพบทางคลินิก (โดยใช้ประสบการณ์ของแพทย์) หรือใช้ imaging ต่างๆ (2) ใช้กรรมวิธีทางจุลชีววิทยา เช่น เพาะแยกเชื้อหรือวิธีทางปรสิตวิทยา (ตรวจหาพยาธิหรือผลิตภัณฑ์ของพยาธิ เช่น ไข่พยาธิ) (3) ใช้กรรมวิธีทางอณูชีววิทยา (ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อก่อโรค) (4) ใช้กรรมวิธีทางชีวเคมี และ (5) กรรมวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามกรรมวิธีเหล่านี้ ล้วนมีข้อดีและข้อเสียด้วยกันทั้งสิ้น ใน

บางครั้งเพื่อให้เป็นผลดีที่สุดแก่ผู้ป่วย และเพื่อให้การควบคุมป้องกันและการเฝ้าระวังโรคมีประสิทธิภาพ ก็จำเป็นต้องใช้หลาย ๆ วิธี ร่วมกันหรือเสริมกัน

โครงการวิจัยนี้ แบ่งเป็นโครงการย่อย 3 โครงการ คือ

- โครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส (Development of a ready-to-use diagnostic test kit for leptospirosis)

- โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาวิธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิก เอสเชอริเชียโคไล (Development of diagnostic method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection)

- โครงการย่อยที่ 3

การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกินและการทดสอบประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ชนิดใหม่ (Preparation of oral cholera vaccine component and efficacy testing of a new vaccine adjuvant)

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 1

เพื่อพัฒนาวิธีการวินิจฉัยและผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในผู้ป่วยระยะเฉียบพลัน (acute) อย่างรวดเร็ว (ใช้เวลาน้อย) และแม่นยำ (มากกว่าวิธีที่มีอยู่เดิม) โดยการตรวจหาแอนติเจนเฉพาะของเชื้อในปัสสาวะและ/หรือในเลือดของผู้ที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยใช้โมโนโคลนาลแอนติบอดีเฉพาะ genus *Leptospira* และโมโนโคลนาลแอนติบอดีเฉพาะต่อ pathogenic species เป็น detection reagents

วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 2

เพื่อพัฒนากรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยาสำหรับวินิจฉัยโรคติดเชื้อ enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) โดยใช้ specific monoclonal antibodies เป็น detection reagents เพื่อตรวจหา Shiga toxins และ O-antigen ของ EHEC (O157) ใน ตัวอย่างส่งตรวจ (specimens) จากผู้ติดเชื้อ

วัตถุประสงค์ของโครงการย่อยที่ 3

- เพื่อเตรียม recombinant clones ซึ่งผลิต *Vibrio cholerae* adhesin (TcpA) โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม สำหรับที่จะใช้ TcpA เป็นส่วนประกอบชนิดหนึ่งในสามชนิดของ oral cholera vaccine
- เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ oral adjuvant ชนิดใหม่คือ bacterial CpG-DNA สำหรับวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ ซึ่งเป็นวัคซีนชนิดกิน

ระเบียบวิธีวิจัยที่เสนอไว้โดยสรุป

โครงการย่อยที่ 1: ผลิตแอนติบอดีชนิดโมโนโคลนาลที่มีความเฉพาะต่อแบคทีเรียตระกูลเลปโตสไปรา และ pathogenic species จากเซลล์ไฮบริโดมาโคลน LF9 และ LD5 ที่มีอยู่แล้วโดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงและใช้แอนติบอดีเหล่านี้เป็นเครื่องมือในการตรวจจับแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราในสิ่งส่งตรวจ (specimens) จากผู้ป่วยที่สงสัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส โดยคาดหวังว่าจะสามารถตรวจพบแอนติเจนของเชื้อ ซึ่งบ่งชี้ว่าผู้ป่วยกำลังเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส/ติดเชื้อเลปโตสไปรา ได้เร็วกว่าการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธีตรวจหา IgM และวิธีไมโครแอกกลูติเนชัน (MAT) หรือวิธีเพาะเชื้อซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน

โครงการย่อยที่ 2: ใช้เทคนิคไฮบริโดมาในการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา ซึ่งสร้างแอนติบอดีที่มีความเฉพาะต่อพิษที่ออกซินทั้งสองชนิดของอีโคไลชนิดเอ็นเทอโรฮีโมราจิกและผลิตไฮบริโดมาซึ่งสร้างแอนติบอดีเฉพาะต่อโอแอนติเจนของอีโคไลชนิดเอ็นเทอโรฮีโมราจิก กลุ่ม O157 และใช้โมโนโคลนาลแอนติบอดีเหล่านี้ในการตรวจจับแอนติเจนเป้าหมายในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่มีอาการอุจจาระร่วงทั้งชนิดถ่ายเป็นน้ำและอุจจาระมีเลือดปน ด้วยกรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยา เปรียบเทียบกับวิธีวินิจฉัยโรคที่มีอยู่เดิม ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง เช่น วิธีเพาะแยกเชื้อ วิธีตรวจหาที่ออกซินด้วย bioassay (cytotoxic test) และ/หรือวิธีเพิ่มขยายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์

โครงการย่อยที่ 3:

ส่วนที่ 1: เพื่อเตรียม recombinant fimbrial antigen (Toxin-coregulated pili A; TcpA) ของเชื้ออหิวาต์โดยเริ่มจากการ เตรียม PCR probe เพื่อนำไปใช้ทำ Southern hybridization และ colony hybridization เพื่อเลือก enzyme digestion fragments ที่เหมาะสมของ genomic DNA จากเชื้ออหิวาต์สายพันธุ์ที่ผลิต fimbriae (TcpA) นำ PCR product ของ fragments ที่เลือกได้ไป clone ใน vector ที่เหมาะสมเพื่อใส่เข้าไปใน host จากนั้นเลือก recombinant host ที่ carry fimbrial (*tcp A*) gene นำ gene fragment (insert) ที่อยู่ใน recombinant host มาตรวจดู sequence ว่ามี homology ต่อ fimbrial gene (*tcp A*) หรือไม่

ก่อนนำ selected recombinant clone ไปเลี้ยงให้สร้าง recombinant protein ออกมามากๆ (TcpA) แล้ว purify protein ที่ต้องการโดย commercialized protein purification system

ส่วนที่ 2: นำ purified fimbriae (TcpA) จากส่วนที่ 1 มาใช้เป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งในสามชนิดของวัคซีนอหิวาต์ชนิดกิน แอนติเจนอีกสองชนิดในวัคซีน คือ ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) และโปรตีนเลอร่าจिनอยด์ (P) ซึ่งเตรียมโดยการ extract จากเชื้ออหิวาต์และจาก recombinant clone ซึ่ง carries cholera toxin gene (*ctx*) ตามลำดับ นำแอนติเจนทั้งสามชนิดมาผสมรวมกันในสัดส่วนที่เหมาะสมแล้วนำไปทดสอบ immunogenicity โดยป้อนให้แก่สัตว์ทดลองคือ Wistar rats ที่แบ่งเป็นกลุ่ม ๆ โดยแต่ละกลุ่มได้รับ formulations ไม่เหมือนกัน คือ

กลุ่มที่ 1 ได้รับแอนติเจนสามชนิด (LPS, TcpA และ P) ซึ่งใส่ไว้ในลิโปโซม (Liposome; L) และผสม CpG-DNA (แอดจูแวนท์ชนิดใหม่) โดยมี 5% NaHCO₃ ปริมาตร 3 มล. เป็น vaccine diluent (vaccine 1)

กลุ่มที่ 2 ได้รับแอนติเจนทั้งสามชนิดซึ่งใส่ไว้ในลิโปโซมและผสมกับ non-CpG-DNA โดยมี 5% NaHCO₃ ปริมาตร 3 มล. เป็น vaccine diluent (vaccine 2)

กลุ่มที่ 3 ได้รับแอนติเจนทั้งสามชนิดซึ่งใส่ไว้ในลิโปโซม (ไม่มี CpG-DNA) โดยมี 5% NaHCO₃ ปริมาตร 3 มล. เป็น diluent (vaccine 3)

กลุ่มที่ 4 ได้รับแอนติเจนทั้งสามชนิดผสม CpG-DNA ใน 3 มล. 5% NaHCO₃ (ไม่มีลิโปโซม) (vaccine 4)

กลุ่มที่ 5 ได้รับแอนติเจนทั้งสามชนิดผสม non-CpG-DNA ใน 3 มล. 5% NaHCO₃ (vaccine 5)

กลุ่มที่ 6 ได้รับแอนติเจนทั้งสามชนิดใน 3 มล. 5% NaHCO₃ (ไม่มีลิโปโซม และ CpG-DNA) (vaccine 6)

กลุ่มที่ 7 ได้รับลิโปโซมใน 3 มล. 5% NaHCO₃ (placebo 1)

กลุ่มที่ 8 ได้รับ CpG-DNA ใน 3 มล. 5% NaHCO₃ (placebo 2)

กลุ่มที่ 9 ได้รับ 3 มล. 5% NaHCO₃ (placebo 3)

หนูทุกกลุ่มจะถูก treat แบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้นอีกสองครั้ง ห่างกัน 14 วัน หลังจากนั้น 7 วัน จึงเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมสำหรับตรวจหา specific antibodies และตรวจนับ antibody producing cells ต่อแอนติเจนแต่ละอย่างโดยวิธี antibody sandwich immunofluorescence เปรียบเทียบจำนวน antibody producing cells ในกลุ่มต่าง ๆ เพื่อประเมินประสิทธิภาพความเป็นแอดจูแวนท์ของลิโปโซม และ CpG-DNA ในการ enhance ให้โฮสต์สร้างแอนติบอดี

โครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

(Development of a ready-to-use diagnostic test kit for leptospirosis)

รายละเอียดของงานวิจัยโครงการย่อยที่ 1

การพัฒนาชุดตรวจสำเร็จรูปสำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

วัสดุและวิธีการ (Materials and Methods)

I. การเพาะเลี้ยง *Leptospira* spp. serovars ต่าง ๆ เพื่อเตรียมแอนติเจน และการเตรียม heterologous antigens

Leptospira serovars ต่าง ๆ และแบคทีเรียอื่น ๆ รวมทั้งไวรัส ริกเกตเซียและเชื้อรา ที่ใช้เป็นแอนติเจนในโครงการวิจัยย่อยที่ 1 นี้ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.1

ได้นำ *Leptospira* จาก seed cultures ที่ซื้อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงทั้งชนิดเหลว (liquid medium) คือ EMJH (Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris) medium และครึ่งแข็งครึ่งเหลว (semisolid medium) คือ EMJH + 0.2% bacto-agar (semisolid EMJH)

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Leptospira*

1. Liquid medium

อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ ชื่อ EMJH medium แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ EMJH basal medium และส่วนที่เป็น supplements ซึ่งประกอบด้วย bovine serum albumin (BSA), pyruvate, Tween-80, Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} และ vitamin B12 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองสาร supplements ผ่าน sterile filter membrane ที่มีขนาด pore size 0.22 μm หลังจากนั้นเติม supplements ต่างๆลงใน EMJH basal medium (ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่ 121 lb/inch² นาน 15 นาที) ในอัตราส่วน 1:10 และก่อนนำไปใช้ได้ตรวจสอบก่อนว่าปลอดจากการปนเปื้อนโดยนำไปอบที่อุณหภูมิห้อง 5-7 วัน จนแน่ใจว่าปราศจากเชื้อแล้วจึงเก็บไว้ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาใช้

2. Semisolid medium

เตรียมเหมือน liquid medium แต่ผสม bacto agar (Difco, USA) 0.2% ใน EMJH basal medium หลังจาก autoclave ที่ 121 lb/inch² นาน 15 นาทีแล้ว รอให้เย็นลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55°C จึงเติม supplements ลงผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด หลอดละ 5 มล. ในการแบ่งใส่หลอด ต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว จากนั้นตรวจสอบการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นก่อนนำไปใช้

การ culture หรือ subculture ทุกครั้งต้องทำด้วยความระมัดระวังอย่างมาก เนื่องจาก bacteria เกือบทุกชนิดและเชื้อราต่างๆ สามารถเจริญเติบโตในอาหารชนิดที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Leptospira* ได้

ในกรณีการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาเพาะเชื้อได้ใช้ supplemented EMJH semisolid medium ที่มี ยา 5-Fluorouracil (5-FU) 200 µg/ml ผสมอยู่ด้วย ส่วน medium ที่ใช้ในการ subculture เชื้อใช้ EMJH liquid medium หลังจาก subculture ต้องเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* ไว้ที่อุณหภูมิ 28-30°C ในที่มืด สำหรับเชื้อ *Leptospira* ที่จะนำมาเตรียมแอนติเจนแต่ละ serovars นั้นเมื่อ culture ได้ถึง stationary phase แล้ว (ประมาณ 7-14 วัน) ต้องนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด dark-field ว่าไม่มี bacteria ชนิดอื่นหรือเชื้อราเจือปนและต้องทดสอบก่อนการ harvest โดยการ streak culture ลงบน Tryptic Soy Agar (TSA) slant แล้วนำ TSA ไป incubate ที่ 37°C ประมาณ 3-7 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อ *Leptospira* จาก culture ไม่มีการปนเปื้อนโดย bacteria ชนิดอื่น ๆ และเชื้อรา

II. การเตรียม *Leptospira* homogenates และ homogenates จาก bacteria อื่น ๆ ไวรัส ริกเก็ตเซีย และเชื้อรา

นำ *Leptospira* spp. serovars ต่าง ๆ ที่ subculture ไว้ใน liquid EMJH เป็นเวลา 7-14 วัน มาปั่น ที่ 10,000 × g ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาทีและปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนนำไป sonicate ที่ 20 kHz ที่ 4°C, 5 นาที 3 ครั้ง นำไปหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) และปริมาณโปรตีน

สำหรับ homogenates ของแบคทีเรียต่างๆ ก็ทำเช่นเดียวกัน โดยนำ packed bacterial cells ที่ได้จากการปั่น overnight broth culture มา suspend ในน้ำกลั่นก่อนนำไป sonicate

Extracts ของ ไวรัสต่างๆ ได้ชื่อมาจากการมหาวิทยาลัยการแพทย์ extract ของริกเก็ตเซียได้รับจากนางสาวพรสวรรค์ อัมระपाल ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เชื้อรา (*Candida albicans*) ได้รับจาก *in vitro* culture โดยนางสาวเสาวลักษณ์ จุลนิมิ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้นำเซลล์มาเตรียม homogenate เช่นเดียวกับแบคทีเรียต่างๆ

III. แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

3.1 โมโนโคลนาลแอนติบอดี (Monoclonal antibodies; MAb)

MAb ที่ใช้ในการวิจัยนี้มีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* และเตรียมจาก hybridomas 2 clones คือ clone LF9 และ clone LD5 ของบริษัท Science Development and Management Ltd. กรุงเทพฯ โดยนำเซลล์ของทั้งสองโคลนมาเพาะเลี้ยงใน flasks ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่ supplemented ด้วย 7% bovine serum (BS) ใน 5% CO₂ incubator

ตารางที่ 1.2 Characteristics ของโมโนโคลนาลแอนติบอดี (MAb) LF9 และ (MAb) LD5

Hybridoma	Ig isotype		Reciprocal indirect ELISA titer*
	H-chain	L-chain	
LF9	$\gamma 1$	kappa	512
LD5	$\gamma 1$	kappa	1,024

* Reciprocal indirect ELISA titer against homologous antigen of the spent culture medium when the cells have grown to stationary phase

ที่ 37°C เมื่อเซลล์เจริญเติบโตเต็มที่และถึงระยะ stationary phase แล้วเก็บ culture supernatants รวมไว้เป็น pool ของ MAb ส่วนเซลล์ใน flasks เดิมเลี้ยงต่อไปโดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไป characteristics ของ MAb จาก clone LF9 (MAb LF9) และ clone LD5 (MAb LD5) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.2

ได้นำ MAb LF9 และ MAb LD5 ไปทดสอบด้วยวิธี dot-blot ELISA (ข้อ 11.2.2) ต่อแอนติเจนของ *Leptospira* serovars ต่าง ๆ และแอนติเจนที่เตรียมจากแบคทีเรียอื่น ๆ ไวรัส ริกเกตเซีย และเชื้อรา (โปรดดูตารางที่ 1.1) พบว่า MAb LF9 มีความเฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* ทุก serovar และไม่ react ต่อแอนติเจนจากแบคทีเรียอื่น ๆ (รูปที่ 1.1, lanes B ของ Blocks I และ II) ซึ่งแสดงความเฉพาะของ MAb LF9 ต่อ *Leptospira* homogenates ของทุก serovars เมื่อทดสอบด้วย dot-blot ELISA ส่วน MAb LD5 นั้นจะให้ปฏิกิริยาเฉพาะต่อ แอนติเจนของ *Leptospira* serovars ที่ก่อโรคเท่านั้นแต่จะไม่ react กับแอนติเจนของ non-pathogenic serovar เช่น *L. biflexa* serovar patoc (รูปที่ 1.1, lanes C ของ Blocks I และ II) และแอนติเจนจากเชื้ออื่น ๆ

เมื่อนำ MAb LF9 และ MAb LD5 ไปทำ Western blot analysis กับ SDS-PAGE separated-homogenates ของ *Leptospira* serovars ต่าง ๆ พบว่า MAb LF9 react กับ component ประมาณ 38 kDa ของ homogenates จากทุก serovar ทั้ง pathogenic serovars และ non-pathogenic serovars (เช่น *L. biflexa* serovar patoc) แต่ reaction pattern จะแตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อ MAb LF9 react กับ homogenates ของ pathogenic serovars จะปรากฏเป็น doublets ของ upper และ lower bands (รูปที่ 1.2, Block I, lanes B, C และ E) แต่เมื่อ react กับแอนติเจนของ non-pathogenic strain จะให้เพียง upper band เท่านั้น (รูปที่ 1.2, Block I, lane D)

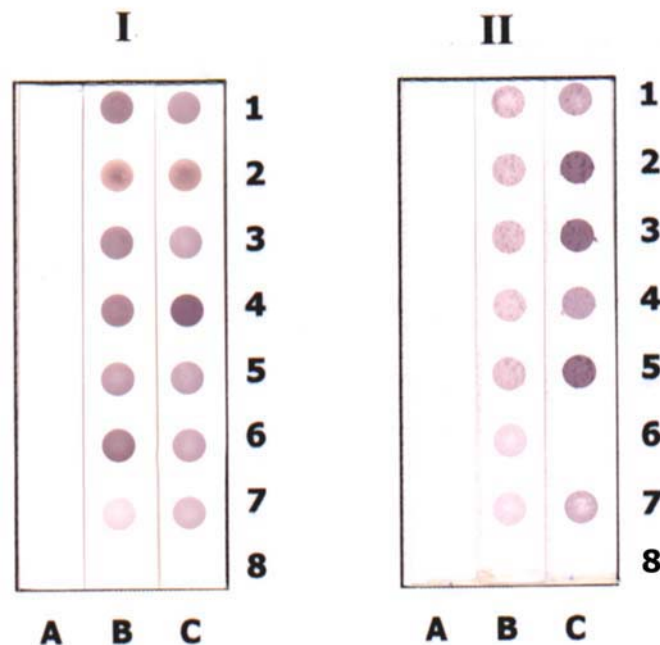
MAb LD5 ให้ปฏิกิริยาใน Western blot analysis ตรงตำแหน่งประมาณ 35.5-36 kDa ของแอนติเจนที่เตรียมจาก pathogenic serovars (รูปที่ 1.2, Block II, lanes B, C และ E) แต่จะไม่มี reaction กับแอนติเจนจาก non-pathogenic serovar (รูปที่ 1.2, Block II, lane D)

จึงสรุปได้ว่า MAb LF9 จะสามารถ react ได้กับแอนติเจนจาก *Leptospira* ทุก serovars อย่างเฉพาะเจาะจงโดยไม่ react กับแอนติเจนของเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *Leptospira* ในขณะที่ MAb LD5 ไม่ react กับเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ใช่ *Leptospira* และไม่ react กับแอนติเจนของ non-pathogenic *Leptospira*

ในงานวิจัยขั้นต่อไปได้ใช้ MAb LD5 ซึ่งมีความเฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira* สำหรับพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างส่งตรวจต่าง ๆ

3.2 Polyclonal antibodies (PAb)

ได้ immunized กระต่าย (น้ำหนักประมาณ 2.5 กิโลกรัม) ด้วย heat-killed whole cells *Leptospira* serovar icterohaemorrhagiae ปริมาณ 150 µg ใน 1 มล. normal saline solution (NSS) เข้าเส้นเลือด marginal ear vein หลังจากนั้นฉีดซ้ำอีกสองครั้งด้วย route เดิมและแอนติเจนเดิม โดยเว้นระยะห่างจากการฉีดครั้งก่อนประมาณสองสัปดาห์ ใช้แอนติเจนในโดสที่สองปริมาณ 300 µg และโดสที่สามปริมาณ 600 µg หลังจากนั้น 7 วันได้ทำ test bleeding และนำซีรัมไปตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี indirect ELISA (โปรโตคอล 11.2.1) ต่อ homologous antigen พบว่ามี titer 1:409,600 (4,096,000 EU/ml) จึงเจาะเลือดจากหัวใจ กระต่ายปริมาตรประมาณ 50 ml แยกซีรัมเก็บไว้เป็น antiserum ต่อ *Leptospira* หลังจากนั้นให้กระต่ายพักในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองประมาณ 1 เดือน แล้วจึงให้ booster dose ขนาด 1.2 mg ใน 1 ml NSS เข้าเส้นเลือด ทุกเดือนเพื่อเป็น source ของ antiserum และได้เตรียม immunoglobulins โดยการตกตะกอน rabbit antiserum ด้วย saturated ammonium sulphate แล้วจึงแยก IgG ออกมาด้วยวิธี protein-A affinity column chromatography เพื่อใช้เป็น polyclonal antibodies (PAb) สำหรับ antigen detection assay ต่อไป



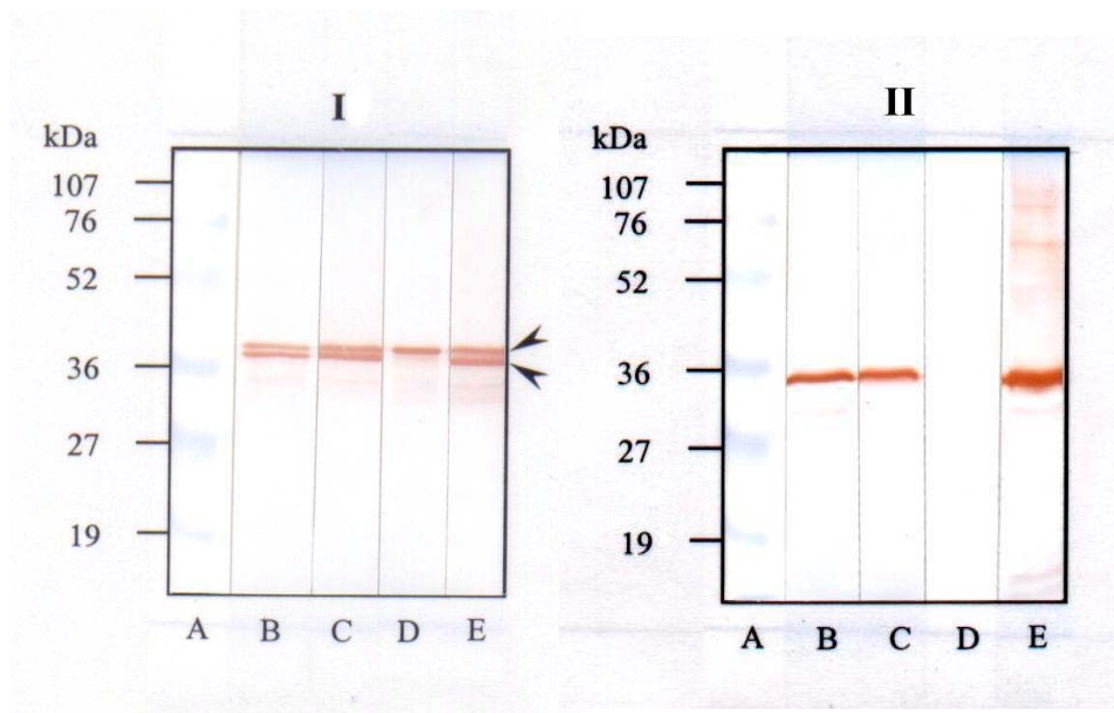
รูปที่ 1.1 Dot-blot ELISA results showing specificities of MAb LF9 and MAb LD5 against boiled homogenates of various *Leptospira* serovars

Rows 1 to 7 of “Block I” were blotted with antigens of serovars cynopteri (strain 3522C), andamana (strain CH11), bangkok, grippotyphosa, hebdomadis, javanica and icterohaemorrhagiae (positive control), respectively; row 8 was blotted with PBS (negative control)

Rows 1 to 7 of “Block II” were blotted with antigens of serovars autumnalis (strain Akiyami A), bullum, djasiman, saigon, wolffi, patoc and icterohaemorrhagiae (positive control); row 8 was blotted with PBS (negative control)

Strip A was reacted with culture supernatant of P3x-63-Ag8.653 myeloma cells (Ab negative control); strips B and C were reacted with MAb LF9 and MAb LD5, respectively

Note: MAb LD5 did not react to homogenate of serovar patoc (non-pathogenic) in strip C, row 6 of Block II



รูปที่ 1.2 Western blot (WB) patterns of MAb LF9 and MAb LD5 against SDS-PAGE-separated homogenates of *Leptospira* spp. (Blocks I and II, respectively)

Lanes B, C, D and E contain SDS-PAGE homogenates of *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae, *L. biflexa* serovar andamana (strain CH11), *L. biflexa* serovar potoc (strain Patoc 1) and *L. interrogans* serovar djasiman, respectively

Lanes A contain SDS-PAGE-separated standard molecular weight markers

Numbers at left of each block indicate molecular weights in kDa

Note: MAb LF9 also reacted to homogenate of non-pathogenic serovar patoc (lane D, Block I) but only reveals upper band of the doublet

MAb LD5 did not react to homogenate of non-pathogenic serovar patoc (lane D, Block II)

III. ตัวอย่างส่งตรวจ

4.1 ตัวอย่างส่งตรวจจากมนุษย์ (human specimens)

Human specimens ที่ใช้ในการวิจัยโครงการย่อยที่ 1 ประกอบด้วย

- ปัสสาวะ เพื่อตรวจหา *Leptospira* antigen และเพื่อเพาะเลี้ยง *Leptospira*
- **Fresh blood** เพื่อเพาะเชื้อ *Leptospira*
- **Clot blood** เพื่อแยกเอาซีรัม
- **Heparinized blood** เพื่อเก็บ buffy coat และพลาสมาสำหรับตรวจหา *Leptospira* antigen
- **Cerebrospinal fluid (CSF)** เพื่อเพาะเลี้ยง *Leptospira*

Specimens เหล่านี้แบ่งเป็นสามกลุ่มด้วยกัน คือ

- 3.1.1 Specimens จากผู้ป่วยที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการทางคลินิกว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส
- 3.1.2 Specimens จากผู้ป่วยที่แพทย์วินิจฉัยตามอาการและ/หรือโดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการว่าเป็นไข้เนื่องจากโรคอื่นที่ไม่ใช่เลปโตสไปโรซิส
- 3.1.3 Samples จากคนปกติที่ไม่มีอาการป่วยใดๆ

4.1.1 ผู้ป่วย Leptospirosis

ผู้ป่วย leptospirosis เป็นผู้ป่วยซึ่งไปพบแพทย์ที่โรงพยาบาลสามแห่งในจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือโรงพยาบาลขอนแก่น โรงพยาบาลมหาราชน และโรงพยาบาลจังหวัดอุบลราชธานี

เงื่อนไขการเลือกผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสใช้ clinical criteria และ score ตามแบบ World Health Organization (WHO, 1982) คือ Part A score ได้แก่ ปวดศีรษะรุนแรงและเกิดขึ้นอย่างปัจจุบันทันด่วน (2 คะแนน) มีไข้มากกว่า 38.5°C (2 คะแนน) มีตาจ้ำ (conjunctival suffusion) ทั้งสองข้าง (4 คะแนน) มีอาการของระบบสมอง (4 คะแนน) ปวดกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้ามเนื้อน่อง (4 คะแนน) หากผู้ป่วยมีอาการ 3 อย่าง คือ ตาจ้ำ มีอาการทางสมอง ปวดกล้ามเนื้อร่วมกันให้ 10 คะแนน ดีซ่าน (1 คะแนน) มีไข่ขาวในปัสสาวะ (albuminuria) หรือ nitrogen retention (2 คะแนน) ผู้ป่วยที่มีคะแนน clinical features 26 คะแนนหรือมากกว่าถือว่าเป็น “presumptive leptospirosis” นอกจากนี้ยังใช้ part B score และ part C score ของ WHO (1982) อีกด้วย การให้คะแนน parts B และ C มีดังนี้คือ part B เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาได้แก่

อาชีพและโอกาสที่ผู้ป่วยจะสัมผัสกับแหล่งรังโรคที่มีเชื้อ *Leptospira* เช่น ทำสวน ทำนา เลี้ยงสัตว์ แชน้ำหรือเดินลุยน้ำ หรือสัมผัสดิน/น้ำที่ contaminate ด้วย *Leptospira* สัมผัสซากสัตว์/ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่เป็นรังโรค เป็นต้น หากผู้ป่วยมีประวัติและโอกาสดังกล่าวให้ 10 คะแนน สำหรับ part C ได้แก่ ผลการตรวจ specimens ของผู้ป่วยทาง serology เช่นวิธี microscopic agglutination test (MAT) ซึ่ง WHO (1982) กำหนดว่า หากเป็น single serum specimen และได้ titer สูง ($> 1:200$) ในการทดสอบด้วย MAT ให้คะแนน 10 คะแนน แต่ถ้า titer ต่ำ ($< 1:200$) ให้คะแนน 2 คะแนน และถ้าสามารถตรวจ paired serum specimens พบ rising titers ให้ 10 คะแนน ผู้ป่วยที่ Parts A + B + C มีคะแนน 25 หรือมากกว่าถือเป็น “presumptive leptospirosis” ขณะที่ score ระหว่าง 20-25 ถือเป็น “possible, unconfirmed leptospirosis”

ผู้ป่วยหรือผู้แทนตามกฎหมายของผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมโครงการ ภายหลังจากแพทย์ผู้ร่วมวิจัยได้อธิบายให้ทราบถึงวัตถุประสงค์และวิธีการของการวิจัย โดยได้เซ็นใบยินยอม (informed consent)

ผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส สำหรับโครงการย่อยที่ 1 แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1: จำนวน 60 ราย (ตารางที่ 1.3) จากโรงพยาบาลขอนแก่น ผู้ร่วมวิจัยคือ นายแพทย์ ธนชัย พนพุกและนางสาวกาญจนา โทมณาการ ได้เก็บ single urine samples และ clot blood samples เมื่อผู้ป่วยไปถึงโรงพยาบาลในวันแรก (โรงพยาบาลขอนแก่น) ก่อนได้รับการรักษา (D1) โดยผู้ป่วยกลุ่มนี้มีไข้มาแล้ว 2-5 วัน (เฉลี่ย 2.97 วัน) ก่อนไปโรงพยาบาล ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยตามอาการโดยใช้ criteria ของ WHO ได้เก็บ urine samples ใส่ freezer -20°C ไว้และต่อมาได้ส่งไปตรวจหาแอนติเจนที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ส่วน serum samples ได้ถูกทดสอบด้วย IgM dipstick (บริษัท Organon, Belgium) ก่อนส่งไปหา MAT titer เฉพาะที่ IgM dipstick ให้ผลบวก ที่ศูนย์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งทราบผลใน 4 เดือนต่อมา หรือหลังจากนั้น โดยถือว่า MAT low titers คือ $1:100-1:400$ และ MAT high titers คือ $> 1:400$ (โปรดดูกลุ่มที่ 3 ด้วย)

กลุ่มที่ 2 : ผู้ป่วย 8 ราย จากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา (ตารางที่ 1.4) ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีไข้มาแล้ว 5-11 วัน (เฉลี่ย 6.9 วัน) ได้เก็บเลือดแยกซีรัมและเก็บ urine samples ในวันแรกที่ผู้ป่วยไปโรงพยาบาล (D1) และเก็บ follow-up urine samples อีก 2 ครั้งในช่วงวันที่ 7-19 (F1) และวันที่ 22-38 (F2) ตามลำดับ ผู้ป่วยกลุ่มนี้ให้ MAT titer $> 1:320$ หรือให้ $\geq$ four-fold rising titer โดยการตรวจโดย WHO Leptospirosis Reference Culture ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์

กลุ่มที่ 3 : จำนวน 36 คน จากโรงพยาบาลขอนแก่น (ตารางที่ 1.5) ได้เก็บ urine samples ในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลและเก็บ follow-up samples ในวันที่ 2, 3, 7 และ 14 ผู้ป่วยมีไข้มาแล้ว 1-8 วัน (เฉลี่ย 3.4 วัน) ซีรัมที่เก็บวันแรกถูกทดสอบด้วย IgM dipstick ของบริษัท Organon, Belgium ในกรณีที่ซีรัมใดให้ผลบวกได้ส่งไป confirm ด้วย IFA test ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้ป่วยคนใดที่ซีรัมในวันแรกที่ไปถึงโรงพยาบาลให้ผลลบด้วย IgM dipstick จะถูกเจาะเลือดเพื่อตรวจซีรัมซ้ำด้วย IgM dipstick อีกครั้งหนึ่งในวันที่

5, 6 หรือ 7 เมื่อให้ผลบวกก็จะถูกส่งไป confirm ด้วย IFA test เช่นกัน ซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกโดย IgM dipstick และ IFA จะถูกส่งไปตรวจหา MAT titers ต่อไป ส่วน urine samples ทั้ง D1, D2, D3, D7 และ D14 ถูกเก็บไว้ที่ -20°C ซึ่งต่อมาได้ถูกส่งไปตรวจหาแอนติเจนโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ คือ MAb based dot-blot ELISA ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

กลุ่มที่ 4: จำนวน 22 ราย จากโรงพยาบาลจังหวัดอุบลราชธานี ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีอาการป่วยมาแล้ว 1-15 วัน (เฉลี่ย 4.2 วัน) (ตารางที่ 1.6) ได้เก็บปัสสาวะตั้งแต่วันที่ไปโรงพยาบาลและทุกวัน จนถึงวันที่ 7 (D1, D2, D3, D4, D5, D6 และ D7) รวมทั้งได้ทำการเพาะเชื้อจากเลือดและ/หรือน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid; CSF) ด้วย นอกจากนี้ยังตรวจหา MAT titers ในซีรัมที่เก็บสองครั้งคือ ในวันที่แรก (1st sample) และวันที่ 5, 6 หรือ 7 (second sample) ด้วย

กลุ่มที่ 5: ผู้ป่วยจำนวน 45 ราย จากโรงพยาบาลขอนแก่น ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการโดย WHO criteria ว่าเป็นเลปโตสไปโรซิส ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีไข้มาแล้ว 1-8 วัน (เฉลี่ย 3.34 วัน) (ตารางที่ 1.7, 1.8, 1.10, 1.11 และ 1.12) ได้เก็บซีรัม 41 ราย พลาสมา 34 ราย และปัสสาวะ 45 ราย เพื่อตรวจหา IgM ต่อ *Leptospira* ด้วย IgM dipstick ตรวจ IFA และ MAT titers เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 และตรวจหาแอนติเจนในซีรัม ตารางที่ 1.7 และ 1.10 ในพลาสมา (ตารางที่ 1.8 และ 1.11) และในปัสสาวะ (ตารางที่ 1.12) โดย sandwich ELISA

กลุ่มที่ 6: ผู้ป่วยที่แพทย์วินิจฉัยว่าเป็น leptospirosis จำนวน 3 ราย จากโรงพยาบาลมหาราชนิคม จัหวัดนครราชสีมา ผู้ป่วย 3 รายนี้ ให้ผลบวก *Leptospira* hemoculture และ MAT titers ได้เจาะ heparinized blood เก็บ plasma และ buffy coat เพื่อใช้เป็น samples สำหรับตรวจหา *Leptospira* antigenemia โดย sandwich ELISA

ตารางที่ 1.3 Informations of the 60 patients who were presumptively diagnosed leptospirosis (first batch) and the results of serological assays

Patient	WHO criteria of leptospirosis						Diagnosis of	Dipstick
No.	Days of fever before hospital arrival	Clinical findings (part A score)	Epidemiological factor(s) (part B score)	Laboratory findings (part C score)		Final score	leptospirosis by WHO criteria	for IgM
				Reciprocal	Score			
				MAT titer				
1	5	>20	10	200	2	>32	presumptive	nd
2	4	21	10	800	10	41	presumptive	—
3	4	>20	10	1,600	10	>40	presumptive	+
4	3	>20	10	200	2	>32	presumptive	+
5	4	>20	10	800	10	>40	presumptive	+
6	3	22	10	100	2	34	presumptive	—
7	3	25	10	800	10	45	presumptive	+
8	3	25	10	100	2	37	presumptive	—
9	2	>20	10	200	2	>32	presumptive	nd
10	5	21	10	800	10	>41	presumptive	+
11	3	>20	10	400	10	>41	presumptive	+
12	3	>20	10	200	2	>32	presumptive	+
13	3	25	10	400	10	45	presumptive	+
14	4	>20	10	200	2	>32	presumptive	+
15	4	>20	10	400	10	>40	presumptive	+
16	3	>20	10	400	10	>40	presumptive	nd
17	3	>20	10	100	2	>32	presumptive	+
18	5	>20	10	200	2	>32	presumptive	nd
19	3	>20	10	800	10	>40	presumptive	nd
20	3	>20	10	200	2	>32	presumptive	+
21	3	>20	10	100	2	>32	presumptive	+
22	2	>20	10	200	2	>32	presumptive	nd
23	2	>20	10	400	10	>40	presumptive	+
24	4	25	10	100	2	>37	presumptive	+
25	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
26	3	25	10	—	0	35	presumptive	+
27	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
28	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
29	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
30	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
31	4	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
32	3	25	10	—	0	35	presumptive	+

nd, not done; +, positive result; —, negative result.

score of fever before the hospital arrival

ตารางที่ 1.3

Informations of the 60 patients who were presumptively diagnosed leptospirosis (first batch) and the results of serological assays (continued)

Patient No.	WHO criteria of leptospirosis					Final score	Diagnosis of	
	Days of fever before hospital arrival	Clinical findings (part A score)	Epidemiological factor(s) (part B score)	Laboratory findings (part C score)			leptospirosis by WHO criteria	Dipstick for IgM
				Reciprocal	Score			
33	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
34	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
35	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
36	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
37	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
38	4	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
39	2	>20	10	—	0	>30	Presumptive	+
40	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
41	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
42	4	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
43	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
44	3	24	10	—	0	34	presumptive	nd
45	3	21	10	—	0	31	presumptive	-
46	4	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
47	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
48	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
49	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
50	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
51	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	nd
52	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
53	4	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
54	3	25	10	—	0	35	presumptive	—
55	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
56	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
57	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
58	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	—
59	3	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
60	2	>20	10	—	0	>30	presumptive	+
2.97*								
Positive/total				24/60		28/52		
%positivity				40%		53.85%		

nd, not done; +, positive result; —, negative result;

*, average days of fever before the hospital arrival

ตารางที่ 1.4 Results of MAT of the clinically diagnosed leptospirosis patients (second batch patients)

Clinically diagnosed leptospirosis patient no.	Days of fever before hospital arrival	MAT result [rising titer to serovar(s)]
1	5	bratislava, rachmati, new, and patoc
2	6	bratislava, new, cynopteri, saigon and patoc
3	5	bratislava
4	5	bratislava and patoc
5	11	—
6	8	—
7	8	—
8	7	—
	6.9*	
Positive/total		4/8
% positivity		(50)
Cumulative positivity (%)		4/8 (50)

+, positive result; —, negative result;

*, average days of fever before the hospital arrival

ตารางที่ 1.5 Results of IgM Dipstick, IFA and MAT on specimens of the 36 clinically diagnosed leptospirosis patients (third batch)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)
		1 st	2 nd		
1	3	—	+	+	1:100 copenhagen and saigon
2	3	—	+	+	1:400 bratislava
3	3	—	+	+	1:100 seiroe
4	6	—	+	+	1:100 bangkok, copenhagen and saigon
5	3	—	+	+	1:200 seiroe
6	3	+	0	+	1:100 bratislava
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and seiroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and seiroe; 1:200 bratislava
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and seiroe; 1:200 bratislava
11	4	+	0	+	1:200 saigon; 1:400 pyrogenes
12	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and seiroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava
13	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhagen; 1:200 seiroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon
14	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhagen; 1:800 bangkok and bratislava
15	2	+	0	+	1:100 bangkok, seiroe and rachmati; 1:200 bratislava
16	5	+	0	+	1:200 saigon
17	3	+	0	+	1:100 wolffi
18	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava
19	1	+	0	+	—
20	4	+	0	+	—

Continued next page

ตารางที่ 1.5 Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and dot-ELISA performed on specimens of the 36 clinically diagnosed leptospirosis patients (third batch) (continued)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)										
		1 st	2 nd												
21	3	+	0	+	-										
22	4	+	0	-	0										
23	4	+	0	-	0										
24	3	+	0	-	0										
25	2	+	0	-	0										
26	2	+	0	-	0										
27	3	+	0	-	0										
28	2	+	0	-	0										
29	2	+	0	-	0										
30	3	+	0	-	0										
31	2	-	-	0	0										
32	3	-	-	0	0										
33	5	-	-	0	0										
34	3	-	-	0	0										
35	3	-	-	0	0										
36	2	-	-	0	0										
3.4*															
Positive / total		25/36	5/11	21/30	18/21										
% Positivity		69.4	45.5	70.0	85.7										
Cumulative positivity (%)		25/36(69.4)	30/36 (83.3)	21/30(70.0)	18/21 (85.7)										

+, positive; -, negative; 0, no sample; nd, not done;

1st, serum sample of the first day of hospitalization; 2nd, serum samples collected on day 5 or 6 of hospitalization

*, average days of illness before hospitalization

ตารางที่ 1.6 Results of MAT and culture of specimens of the fourth batch patients

Patient No	Day(s) of fever before hospital arrival	MAT titer(s) to serovar(s)		culture result on day 1 specimen
		1 st	2 nd	
1	4	—	1:1,600 pyrogenes	BI
2	1	—	0	BI
3	4	—	0	BI
4	2	—	0	BI
5	5	—	0	BI
6	3	—	0	BI
7	2	—	0	BI
8	3	1:200 bratislava	1:1,600 bratislava	BI & CSF
9	4	—	1:400 pyrogenes	CSF
10	3	—	1:400 sejroe	—
11	6	—	1:400 sejroe	—
12	1	—	1:200 sejroe	—
13	2	—	1:1,600 pyrogenes	—
14	6	1:200 sejroe	1:400 sejroe	—
15	3	1:200 sejroe	1:200 sejroe	—
16	15	1:3,200 bratislava	1:3,200 bratislava	—
17	5	1:1,600 bratislava	1:1,600 bratislava	—
18	4	1:200 saigon	1:400 saigon	—
19	9	—	1:200 saigon	—
20	4	—	1:200 sejroe	—
21	3	—	1:400 bangkok; 1:3,200 bratislava	—
22	4	1:200 bangkok, saigon; 1:1,600 sejroe	1:1,600 bangkok, sejroe, saigon	—
4.2 *				
Positive / total		7/22	16/22	
% Positivity		31.8	72.7	
Cumulative positivity (%)		7/22 (31.8%)	16/22 (72.7%)	

1st, first serum sample; 2nd second serum sample; +, positive result; —, negative result; 0, sample not available; *, days of fever before hospital arrival

ตารางที่ 1.7 Results of IgM Dipstick, IFA and MAT performed on serum specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)
		1 st	2 nd		
1	3	-	+	+	1:100 copenhagen and saigon
2	3	-	+	+	1:400 bratislava
3	3	-	+	+	1:100 sejroe
4	6	-	+	+	1:100 bangkok, copenhagen and saigon
5	3	-	+	+	1:200 sejroe
6	3	+	0	+	1:100 bratislava
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava
11	4	+	0	+	1:200 saigon; 1:400 pyrogenes
12	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and sejroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava
13	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhagen; 1:200 sejroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon
14	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhagen; 1:800 bangkok and bratislava
15	2	+	0	+	1:100 bangkok, sejroe and rachmati; 1:200 bratislava
16	5	+	0	+	1:200 saigon
17	3	+	0	+	1:100 wolffi
18	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava
19	1	+	0	+	-
20	4	+	0	+	-
21	3	+	0	+	-
22	4	+	0	-	0
23	4	+	0	-	0
24	3	+	0	-	0
25	2	+	0	-	0
26	2	+	0	-	0
27	3	+	0	-	0
28	2	+	0	-	0
29	2	+	0	-	0
30	3	+	0	-	0
31	3	+	0	0	0
32	2	+	0	0	0
33	3	+	0	0	0
34	4	+	0	0	0
35	4	+	0	0	0
36	3	+	0	0	0
37	3	+	0	0	0
38	4	-	0	0	0
39	2	-	0	0	0
40	2	-	0	0	0
41	3	-	0	0	0
3.34*					
Positive / total		32/41	5/5	22/31	18/21
% Positivity		78.0	100	70.9	85.7
Cumulative positivity (%)		32/41(78.0)	37/41(90.2)	22/31(70.9)	18/21 (85.7)

+, positive result; -, negative result; 0, sample not available; *, days of fever before hospital arrival

ตารางที่ 1.8 Results of IgM Dipstick, IFA and MAT performed on plasma samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)
		1 st	2 nd		
1	3	-	+	+	1:100 copenhageni and saigon
2	3	-	+	+	1:400 bratislava
3	3	-	+	+	1:100 sejroe
4	6	-	+	+	1:100 bangkok, copenhageni and saigon
5	3	-	+	+	1:200 sejroe
6	3	+	0	+	1:100 bratislava
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava
11	4	+	0	+	1:200 saigon; 1:400 pyrogenes
12	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and sejroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava
13	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhageni; 1:200 sejroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon
14	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhageni; 1:800 bangkok and bratislava
15	2	+	0	+	1:100 bangkok, sejroe and rachmati;
16	5	+	0	+	1:200 saigon
17	3	+	0	+	1:100 wolffi
18	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava
19	1	+	0	+	-
20	4	+	0	+	-
21	3	+	0	+	-
22	4	+	0	-	0
23	4	+	0	-	0
24	3	+	0	-	0
25	2	+	0	-	0
26	2	+	0	-	0
27	3	+	0	-	0
28	2	+	0	-	0
29	4	+	0	0	0
30	3	+	0	0	0
31	3	+	0	0	0
32	4	-	0	0	0
33	2	-	0	0	0
34	3	-	0	0	0
3.47*					
Positive / total		26/34	5/5	7/28	18/21
% Positivity		76.5	100	25.0	85.7
Cumulative positivity (%)		26/34 (76.5)	31/34 (91.2)	7/28 (25.0)	18/21 (85.7)

+, positive result; -, negative result; 0, sample not available; *, days of fever before hospital arrival

4.1.2 ผู้ป่วยกลุ่มควบคุม (Patient controls)

ได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วยที่มีไข้และแพทย์ได้ให้การวินิจฉัยเบื้องต้นว่ามีไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ (pyrexia with unknown origin; PUO) จำนวน 26 คน จากโรงพยาบาลขอนแก่น ต่อมาภายหลังพบว่า 10 ราย เป็น cholangio-carcinoma (CCA) 8 รายถูกวินิจฉัยตามอาการว่าเป็น melioidosis (ซึ่ง มี endemic area อยู่ในภาคอีสาน) 3 รายพบว่าเป็นมาลาเรีย 3 ราย (พบเชื้อมาลาเรีย ใน blood smears) ใช้สครับไรฟัส 1 ราย (antibody-positive) และ ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวน 4 ราย

4.1.3 กลุ่มควบคุมลบ (Negative controls)

4.1.3.1 ได้เก็บ urine samples จากคนปกติที่ไม่มีอาการป่วยใดๆ และมีภูมิคุ้มกันในภาคอีสาน (endemic areas ของเลปโตสไปโรซิส) จำนวน 120 ราย โดยเก็บปัสสาวะไว้ที่ -20°C ก่อนส่งไปทดสอบหาแอนติเจนของ *Leptospira* ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยวิธี MAb based-dot-blot ELISA

4.1.3.2 Heparinized blood samples ของคนปกติที่ไม่ไปตรวจร่างกายประจำปี ที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และนักศึกษารวม 100 คน แยกพลาสมาและ buffy coat ไว้เพื่อเป็น negative controls ในการตรวจหาแอนติเจนของ *Leptospira* ในเลือดโดยวิธี sandwich ELISA

4.2 ตัวอย่างจากวัว

4.2.1 ตัวอย่างปัสสาวะและเลือด

4.2.1.1 ตัวอย่างจากวัวที่เคยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Test samples)

ได้เก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะจากวัวนมและวัวเนื้อจากฟาร์มหลายๆ แห่งในจังหวัดชลบุรี และจังหวัดขอนแก่น จากการตรวจซีรัมของวัวกลุ่มนี้ด้วยวิธี microscopic agglutination test (MAT) โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในช่วง 2-3 เดือน ก่อนเก็บตัวอย่างเพื่องานวิจัยนี้พบว่าได้ผลบวกและเป็นข้อบ่งชี้ว่าเคยเป็น leptospirosis

Inclusion criteria ในการเลือกวัวที่เคยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสประกอบด้วย

1. แม่วัว 25 ตัว จากฟาร์มที่มีประวัติการแท้งลูกจากการติดเชื้อ *Leptospira* ซึ่งได้ข้อมูลจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และเมื่อ 2-3 เดือนก่อน มี MAT titer เท่ากับหรือมากกว่า 1:50 แม่วัวเหล่านี้ไม่พบว่าเป็นโรค brucellosis จากการตรวจซีรัมด้วยวิธี rapid plate agglutination test

ได้เก็บซีรัมและปัสสาวะจากแม่วัวเหล่านี้ทันทีที่ทราบผล MAT จากการตรวจโดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ นำซีรัมไปตรวจซ้ำโดย MAT และปัสสาวะสดใช้ตรวจหาเชื้อโดย dark-field microscopy (DFM) และเก็บปัสสาวะส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -70°C เพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี dot-ELISA ในภายหลัง

2. พ่วัวจำนวน 20 ตัว จากฟาร์มเดียวกับแม่วัว ข้อ 1 ซึ่งพ่วัวเหล่านี้เคยมี MAT titers เท่ากับหรือสูงกว่า 1:50 ได้เก็บซีรัมและปัสสาวะไปตรวจเช่นเดียวกับแม่วัว

4.2.1.2 ตัวอย่างจากวัวที่ไม่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (Control samples)

ได้เก็บเลือดและปัสสาวะจากแม่วัวและพ่วัวอย่างละ 10 ตัวจากฟาร์มเดียวกับ test samples ซึ่งวัวเหล่านี้ไม่เคยมีประวัติป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสและซีรัมให้ผลลบเมื่อตรวจด้วย MAT โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ได้เก็บและนำตัวอย่างซีรัมและปัสสาวะไปตรวจเช่นเดียวกับ test samples

Processing of cattle samples

ก. ตัวอย่างปัสสาวะ

ได้เก็บ mid-stream urine ใส่ลงในขวดปลอดเชื้อใช้วิธีเก็บด้วยการ induce ให้วัวถ่ายปัสสาวะ โดยการนวดบริเวณท้องน้อย หรือเก็บปัสสาวะจากการถ่ายตามปกติของวัว หยดปัสสาวะ 1 หยด ใส่ลงใน semisolid EMJH medium ทันทีเพื่อการเพาะแยกและ identify เชื้อ *Leptospira* ปัสสาวะในขวดและใน EMJH ได้ถูกนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ในวันเดียวกัน โดยใช้รถยนต์ปรับอากาศเพื่อให้อุณหภูมิของ specimens และ EMJH medium อยู่ระหว่าง $25-30^{\circ}\text{C}$ เมื่อไปถึงห้องปฏิบัติการได้นำหลอด semisolid EMJH medium ไป incubate ที่ $28-30^{\circ}\text{C}$ ส่วนปัสสาวะในขวด ส่วนหนึ่งแบ่งเก็บไว้ที่ -70°C เพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนโดย dot-ELISA อีกส่วนหนึ่งนำไปตรวจหาเชื้อ *Leptospira* โดยตรงด้วยวิธี dark-field microscopy และการย้อม samples ด้วยวิธี Fontana's Silver staining

ข. ตัวอย่างเลือด

นำเลือดวัวแต่ละตัวซึ่งเจาะจาก coccegeal veins ด้วยเข็มเบอร์ 18 และ ปล่อยให้เลือดไหลเข้า venoject tubes บั่นแยกเอาซีรัมเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อการตรวจหา antibody titers ด้วยวิธี MAT ต่อไป

4.2.2. ตัวอย่าง semen ของวัว

ได้รับตัวอย่าง frozen semen ของพ่วัว 10 ตัว ซึ่งเก็บไว้ใน semen bank เพื่อการทำผสมเทียม (artificial insemination) ของกองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและ

สหกรณ์ ตัวอย่างชุดนี้ใช้เพื่อการพัฒนาวิธีพีซีอาร์เพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อ *Leptospira* ใน contaminated semen samples

V. การเพาะเชื้อ *Leptospira* จาก specimens ของผู้ป่วย

การเพาะเชื้อแบคทีเรียจาก clinical specimens ของผู้ป่วยถือเป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) สำหรับการวินิจฉัยโรคทางจุลชีววิทยา อย่างไรก็ตามเชื้อ *Leptospira* เป็นแบคทีเรียที่เพาะแยกได้ยากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ มาก อาหารเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* มีส่วนประกอบที่ซับซ้อน มีราคาแพง เติร์มยาก นอกจากนี้เชื้อ *Leptospira* ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีความเปราะบาง และตายได้ง่ายถ้าอุณหภูมิไม่เหมาะสม มีแสงสว่าง หรือมีการปนเปื้อนของ specimen ที่นำมาเพาะเชื้อด้วยเชื้อแบคทีเรียหรือ saprophytes อื่นๆ สิ่งเหล่านี้ทำให้การเพาะแยกเชื้อ *Leptospira* ในทางจุลชีววิทยามีความไวต่ำ (low sensitivity) แม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีความเฉพาะ (100% specificity) และแม่นยำแน่นอน (accurate and definite) ที่สุดก็ตาม

การเพาะแยกเชื้อ *Leptospira* จากเลือดของผู้ป่วย (hemoculture)

เจาะเลือดผู้ป่วยจากเส้นเลือดดำด้วย sterile technique ประมาณ 1-2 มล. หยดเลือดลงใน semisolid EMJH medium ทันที โดยใช้ EMJH 3 หลอด (triplicate) การหยดต้องใช้ sterile capillary pipette หยด โดย EMJH หลอดที่ 1 หยดเลือด 1 หยด หลอดที่ 2 หยดเลือด 2 หยด และหลอดที่ 3 จำนวน 3 หยด บันทึกชื่อผู้ป่วย วันที่เก็บตัวอย่างและจำนวนหยดของเลือดที่ใส่ลงในหลอด นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30°C ในที่มืดทำการตรวจดูด้วยกล้อง dark-field microscope ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 2-6 เดือน เลือดส่วนที่เหลือปล่อยให้แข็งตัวแล้วแยกซีรัมเก็บไว้

การเพาะแยก *Leptospira* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย

เก็บปัสสาวะช่วงกลาง (mid-stream) ประมาณ 50 มล. แล้วใช้ sterile capillary tube หยดปัสสาวะลงใน semisolid EMJH 1 หยด ทันที label หลอดเช่นเดียวกับการเพาะแยกจากเลือด และนำไปบ่มเช่นเดียวกัน ตรวจหาเชื้อใน culture ทุกสัปดาห์ 2-6 เดือน เช่นกัน ปัสสาวะส่วนที่เหลือเก็บที่ -20°C เพื่อใช้ในการวิจัยต่อไป

VI. การตรวจหาเชื้อใน culture ด้วย dark-field microscope

อาหาร EMJH ที่มีเชื้อ *Leptospira* เจริญเติบโตอยู่จะมีวงแหวนขาวขุ่น (Dinger's ring) ใช้ sterile capillary pipette ดูดอาหารบริเวณวงแหวนขาวขุ่นหยดลงบนกระจกสไลด์ 1 หยด (ระมัดระวังไม่ให้ culture มี contamination) ใช้ cover slip ปิดลงบนหยดของ medium แล้วนำไปตรวจด้วยกล้อง dark-field microscope จะมองเห็นเชื้อ *Leptospira* ที่มีชีวิตเป็นแท่งเกลียว บางคล้ายสว่าน (spirochete) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 μm มีความยาวประมาณ 6-

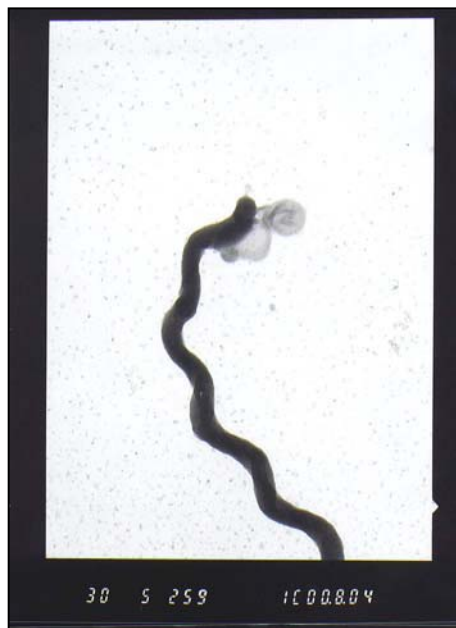
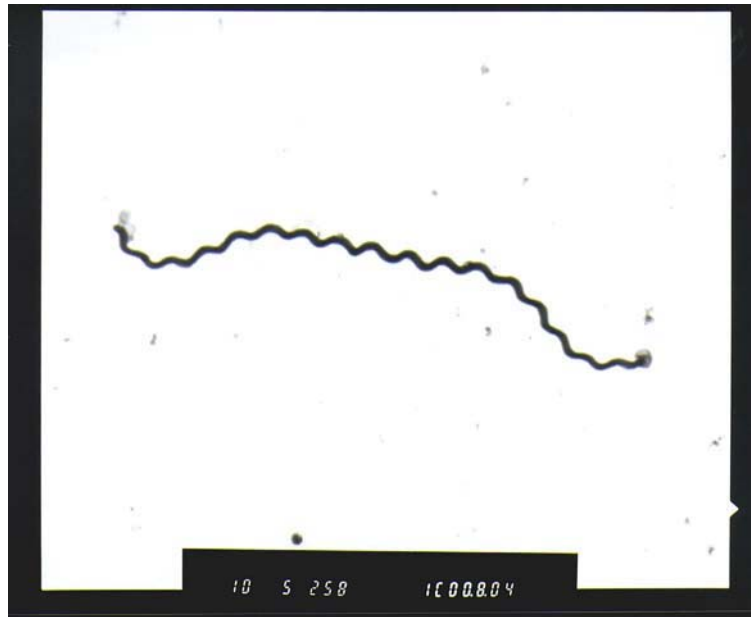
20 μ m ปลายข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างโค้งงอเป็นรูปคล้ายตะขอ (hooks) และเคลื่อนไหวเร็วมาก โดยการหมุนตัวไปรอบ ๆ บางครั้งงอตัวไปมา (โปรดดูรูปที่ 1.3)

VII. การ subculture เชื้อ *Leptospira*

Leptospira จาก specimens ของผู้ป่วยที่เพาะเลี้ยงได้ใน semisolid EMJH ต้อง subculture ไว้เพื่อการศึกษาวิจัยต่อไป ซึ่งทำโดยใช้ sterile capillary pipette ตูด medium บริเวณที่มีวงแหวนสีขาวขุ่นประมาณ 0.5 มล. ใส่ลงใน medium ชนิดเหลว neopeptone ประมาณ 5 มล. โดย sterile technique แล้วนำไปบ่มที่ 28-30°C ในที่มืด 7 วัน ตรวจดูอีกครั้งด้วย dark-field microscopy แล้วถ่ายเชื้อจาก neopeptone 1 หยด ลงใน semisolid EMJH แล้วบ่มที่ 28-30°C ในที่มืดเช่นเดิม การ subculture จะช่วยให้ได้ *Leptospira* ที่เป็น pure culture มากขึ้น

VIII. การทดสอบยืนยัน *Leptospira* ใน specimens ที่เพาะเลี้ยงไว้

ใช้วิธี direct immunofluorescence โดยนำเชื้อที่เหลือในหลอด neopeptone ไปปั่นที่ $5,000 \times g$ 10 นาที ตูด supernatant ทิ้งแล้วเติม NSS ลงไปใน sediment 5 มล. ปั่นล้าง 3 ครั้งด้วย NSS นำไปปรับความขุ่นใน NSS ให้เท่ากับ Standard McFarland no. 0.5 ตูดเชื้อ 10 μ l หยดลงในหลุมของ slide หลุม ปล่อยให้แห้งแล้ว fix ด้วยความร้อน หยด MAb เจาะต่อ *Leptospira* (MAb LD5) ลงในหลุมที่มีแอนติเจน fix อยู่แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ล้าง slide หลาย ๆ ครั้ง ด้วย PBS, pH 7.4, blot-dry แล้วหยด anti-mouse immunoglobulins-FITC conjugate ลงบน slide บ่มที่ 37°C อีก 30 นาที ล้าง slide ด้วย PBS นำ slide ไป mount ด้วย mounting glycerol ปิด slide ด้วย cover glass แล้วตรวจดูด้วย fluorescent microscope เชื้อ *Leptospira* จะติดสี fluorescein ปรากฏให้เห็นเป็นรูป แขนงเกลียวสีเขียว-เหลือง



รูปที่ 1.3 ภาพ electron micrograph ของ *Leptospira* ที่แยกมาจากผู้ป่วย

Electron microscopy ถ่ายภาพโดย ดร. อุไร ไชยศรี (อาจารย์ภาควิชาพยาธิวิทยา
เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน)

IX. Serological assays ที่ใช้ตรวจหา antibodies ในซีรัมของผู้ป่วย presumptive leptospirosis

Microscopic agglutination test (MAT)

การตรวจหา MAT titer และ serovar(s) ของเชื้อ *Leptospira* ที่เป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วย presumptive leptospirosis ในโครงการวิจัยนี้ทำที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดขอนแก่น ที่ WHO Collaborating Center ที่เนเธอร์แลนด์ หรือที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน โดยทีมงานของผู้วิจัย ซึ่งทั้งสามแห่งใช้หลักการและวิธีการเดียวกัน

หลักการของ MAT

ใช้ living *Leptospira* ที่เพาะเลี้ยงไว้อย่างน้อย 26 serovars นอกจากนี้ยังใช้ serovars ที่แยกได้ใหม่ในประเทศไทยด้วย นำแต่ละ serovar มาทำปฏิกิริยากับ serial dilution ของซีรัมของผู้ป่วยที่ heat-inactivate เพื่อกำจัดคอมพลีเมนต์แล้ว ซีรัมผู้ป่วย dilution ใดที่มีแอนติบอดีต่อ *Leptospira* serovar ใดก็จะทำให้ *Leptospira* serovar นั้นเกาะกันเป็นกลุ่ม (microagglutination) ซึ่งมองเห็นได้ภายใต้ dark-field microscopy

วิธีการ

1. เจือจางซีรัมผู้ป่วยด้วย PBS, pH 7.4 เป็น 1:50
2. ตูต diluted serum หยดลงในภาตหลุม 26 หลุม หลุมละ 50 μ l
3. เติม living *Leptospira* ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน liquid EMJH (โปรตดูซ้อ III) เป็นเวลา 5-6 วัน มาหยดลง serovar ละ 1 หลุม (หลุมละ 50 μ l) เก็บภาตหลุมไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชม. อ่านผล agglutination ด้วยกล้อง dark-field
4. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ serovar ใด นำไปหา titer ต่อ serovar นั้น ๆ โดยทำ serial dilution ของ serum เริ่มจาก 1:50, 1:100, 1:200 เป็นต้นไป แล้วเติม serovar ที่เคยให้ผลบวกลงไป 50 μ l ในหลุมที่มี diluted serum 50 μ l เช่นกัน incubate ที่อุณหภูมิห้องแล้วอ่านผล titer คือ dilution สูงสุดของซีรัมที่สามารถ agglutinate เชื้อ *Leptospira* serovar นั้น ๆ ได้ 50%

X. วิธี Immuno-fluorescence assay (IFA)

หลักการ

แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสจะทำปฏิกิริยาต่อแอนติเจนของเชื้อเป็น immune complexes ที่มองไม่เห็นซึ่งเมื่อ immune complexes ถูกย้อมทับด้วย anti-human immunoglobulins ที่ติดฉลากด้วย fluorescein (FITC) และนำไปตรวจด้วย fluorescence

microscope จะปรากฏการเรืองแสงสีเขียว-เหลือง โดยที่ anti-human immunoglobulin-FITC อาจเป็น anti-human IgM-FITC และ/ หรือ anti-human IgG-FITC ก็ได้ สามารถบอก immunoglobulin isotype ของแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยต่อ *Leptospira* ได้จากชนิดของ FITC conjugate ซึ่งให้ผลบวกในการทดสอบ

วิธีการ

1. นำแอนติเจนของ *Leptospira* serovar(s) ที่พบว่าเป็นสาเหตุใน endemic area นั้นๆ มา fix ลงบน microscopic slide ด้วยความร้อน
2. หยดซีรัมผู้ป่วยที่เจือจาง 1:50 ปริมาตร 10 μ l ลงบนหยดแอนติเจน โดยบน slide ต้องมี positive control (ซีรัมของผู้ป่วยที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส) และ negative control (ซีรัมของคนปกติ) ที่หยดลงบนแอนติเจนของ *Leptospira* อยู่ด้วย
3. บ่ม slide ที่ 37°C ใน humid chamber 30 นาทีแล้วล้างด้วย PBS หลาย ๆ ครั้ง
4. หยด anti-human immunoglobulin (class specific, i.e. anti-IgM และ/ หรือ anti-IgG-FITC conjugate) ลงบน slide แล้วนำไปบ่มที่ 37°C อีก 30 นาที ใน humid chamber ล้าง slide ด้วย PBS อีกหลาย ๆ ครั้ง blot-dry สไลด์ แล้วนำไป mount ด้วย mounting glycerol ปิดทับด้วย cover slip แล้วนำไปตรวจปฏิกิริยาด้วย fluorescence microscope นำซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกพบ titer โดยทำ serial dilution แล้วทดสอบแต่ละ dilution แบบเดิม titer คือ dilutions สูงสุดของซีรัมที่ยังให้ผลบวกในการทดสอบ

XI. การพัฒนาวิธี monoclonal antibody-based dot-blot ELISA (MAb dot-ELISA) เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะของผู้ป่วย

11.1 การเตรียม detection reagent (monoclonal antibodies เฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira*)

ได้เลือก hybridoma clone LD5 เพื่อการผลิต monoclonal antibodies (MAb) ที่จะใช้เป็น detection reagent ทั้งนี้เพราะ MAb จาก clone LD5 (MAbLD5) ให้ปฏิกิริยาเฉพาะต่อ pathogenic *Leptospira* เท่านั้น ในขณะที่ MAb จาก clone LF9 ให้ปฏิกิริยาทั้งกับแอนติเจนของ pathogenic และ non-pathogenic *Leptospira* spp. แอนติบอดีจาก clone LD5 เป็น γ 1K immunoglobulins ซึ่งเป็น isotype ที่เหมาะสมสำหรับ functional assay

เมื่อนำ clone LD5 มาเพาะเลี้ยงจนถึง stationary phase พบว่า spent culture medium มีเนื้อแอนติบอดี 10,240 indirect ELISA units (EU) ต่อ 1 มล. ในการใช้เป็น detection reagent เพื่อตรวจหา *Leptospira* antigen ในปัสสาวะของผู้ป่วยผู้วิจัยได้ปรับความเข้มข้นของ MAb LD5 เป็น 80 EU/มล.

11.2 ELISAs

11.2.1 Indirect ELISA

Coat homogenate ของ *Leptospira* serovar icterohaemorrhagiae (homologous antigen) หรือ heterologous antigens (Table 1.1) ความเข้มข้น 10 µg ต่อมล. ใน carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 ลงในแต่ละหลุมใน microtiter plates (หลุมละ 100 µl) แล้ว incubate plate ที่ 37°C ใน humid chamber เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ plate ไปเก็บที่ 4°C ข้ามคืน จากนั้นล้างเอา unbound antigen ออกด้วย washing buffer คือ phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ที่มี Tween-20 ผสมอยู่ 0.5% (PBST) แล้วทำการ block unoccupied sites ในหลุมแต่ละหลุมด้วยการเติม 1% bovine serum albumin (BSA) ใน PBS, pH 7.4 ลงไปหลุมละ 100 µl นำ plate ไป incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเอา excess BSA ออกด้วย washing buffer ก่อนเติมแอนติบอดีที่จะตรวจหา titer ปริมาณ 100 µl ลงไป (serial dilutions สำหรับ immune mouse sera และ spent culture medium ของ selected hybridomas หรือ เติม undiluted spent medium ของ hybrids จากแต่ละหลุมเมื่อ screen หา antibody producing cells ในแต่ละ culture well) ในแต่ละ plate มี negative control คือ spent culture medium ของ P3x-63-Ag 8.653 และ blank คือ PBS, pH 7.4 อยู่ด้วยทุก plate จากนั้น incubate plate ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนที่ fix อยู่บน solid surface ในหลุมกับ antibody ที่เติมลงไป หลังจากนั้นล้างทุกหลุมด้วย washing buffer แล้วเติม rabbit anti-mouse immunoglobulins (Ig)-horseradish peroxidase conjugate (Dakopatts Glostrup, Denmark) ซึ่ง dilute ไว้แล้ว 1:1,000 ด้วย PBS ที่มี 0.2% BSA และ 0.2% gelatin ผสมอยู่ ลงไปหลุมละ 100 µl หลังจาก incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 37°C จึงล้างเอา excess Ig-enzyme ออกด้วย PBST แล้วเติม peroxidase substrate ลงไปหลุมละ 100 µl เก็บ plate ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีแล้ว เติม 1 N NaOH ลงไปหลุมละ 50 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำ plate ไป อ่าน optical density (OD) ของแต่ละหลุมด้วย ELISA Reader (Multiscan Ex, Labsystems, Helsinki, Finland) แปลผลเป็น ELISA titer และ ELISA units (EU) โดย ELISA titer ได้แก่ dilution สูงสุดของ antibody preparation ที่ให้ OD ≥ 0.05 เมื่อตัดค่า OD ของ blank และ negative control ออกไปแล้ว ส่วน EU คือ ปริมาณน้อยที่สุดของแอนติบอดีที่ยังคงให้ผลบวกด้วย indirect ELISA คือ OD ≥ 0.05

11.2.2 Monoclonal antibody-based dot-(blot) ELISA (MAb dot-ELISA)

ได้พัฒนาวิธี MAb dot-ELISA สำหรับการทดสอบความเฉพาะและปฏิกิริยาข้ามของ monoclonal antibodies ที่ secrete ออกมาจาก hybridomas ต่างๆ และ เพื่อใช้ตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ในตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วย รายละเอียดมีดังต่อไปนี้

ในการตรวจความเฉพาะของ MAb ต่อ homologous antigen ซึ่งไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับ heterologous antigens อื่นๆ นอกจาก *Leptospira* นั้นทำโดยการต้มแอนติเจนเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเอาแอนติเจน 3 μ l (1 mg/ml) ไปหยดลงบน nitrocellulose membrane (NC) จำนวน 2 ชั้น (duplicates) สำหรับการตรวจหาแอนติเจนของ *Leptospira* spp. ในปัสสาวะของผู้ป่วยใช้ slot-blot machine (BioRad, USA) ในการ apply ตัวอย่างปัสสาวะ ตัวอย่างละประมาณ 200-300 μ l ลงบน nitrocellulose strip แต่ละ strip โดยทำ duplicates เช่นกัน ในการทำ dot-ELISA ทุกครั้ง ต้องมี positive control คือ homogenate ของ serovar icterohaemorrhagiae และ homogenate ของ *E. coli* เป็น negative control บน NC เดียวกัน ด้วย ปลอ่ยให้ NC ทั้งสองชั้นแห้ง แล้วจึงนำไปแช่ใน blocking solution คือ 5% skim milk ใน PBS, pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้าง NC ด้วย washing buffer A แล้วนำ NC 1 ชั้น (Test strip) ไป incubate กับ MAb LD5 (80 EU/ml) ในขณะที่นำชั้นที่ 2 (control strip) ซึ่งหยดตัวอย่างเดียวกับ NC ชั้นที่ 1 ไป incubate กับ spent medium ของ P3x-63- Ag8.653 เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วล้าง NC ด้วย washing buffer A ประมาณ 3-4 ครั้งแล้ว incubate NC กับ biotinylated rabbit anti-mouse Ig (1:2,000; Dakopatts) เป็นเวลา 30 นาทีแล้วล้าง NC ทู่นชั้นเช่นเดียวกับครั้งก่อน จากนั้น incubate กับ alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (1:2,000; Dakopatts) หลังจาก incubate 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วล้าง NC ทุกชั้นด้วย washing buffer A 2-3 ครั้งและครั้งสุดท้ายล้างด้วย washing buffer B แล้วนำ NC ทุกชั้นไปใส่ใน substrate solution เป็นเวลา 5 นาที ล้าง NC ด้วยน้ำกลั่นแล้ววางบนกระดาษกรองโดย หายด้านที่หยดตัวอย่างขึ้น ปลอ่ย NC ให้แห้งแล้วจึงอ่านผลดังนี้ ผลบวก (มีแอนติเจนในปัสสาวะผู้ป่วย หรือ MAb มีปฏิกิริยากับแอนติเจนที่หยดไว้บน NC) ก็จะเห็นว่าตรงบริเวณที่หยดตัวอย่างหรือแอนติเจนไว้บน Test NC มีสีน้ำเงินปนม่วง ซึ่งแตกต่างจากสียบน control strip ซึ่งตัวอย่างหรือแอนติเจนเดียวกันที่หยดไว้บน Control NC ไม่ได้ react กับ MAb

11.3 การเตรียมตัวอย่างปัสสาวะเพื่อการทดสอบหา *Leptospira* antigen

สำหรับตัวอย่างที่เก็บจากโรงพยาบาลศูนย์ขอนแก่น 60 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1.3) และตัวอย่างชุดแรกที่เก็บจากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา 8 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1.4) แบ่ง aliquots ของแต่ละตัวอย่างออกมาต้มใน water bath เป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที การต้มตัวอย่างมีจุดประสงค์ 3 ประการ คือ (1) ทำลาย endogenous enzymes ในตัวอย่างซึ่งหากไม่ต้มจะ interfere กับ enzyme ที่ใช้ใน dot-ELISA ทำให้อ่านผลยาก (2) เพื่อฆ่าเชื้อต่างๆ ที่อาจเป็น pathogens และปนเปื้อนอยู่ในปัสสาวะ ของผู้ป่วยรวมทั้งเชื้อ *Leptospira* ด้วย และ (3) เพื่อ release antigen เป้าหมายออกมาจาก intact *Leptospira* ให้มากขึ้น หลังจากต้มแล้ว ตัวอย่างทั้ง 2 ชุดนี้นำไป slot-blot ลงบน nitrocellulose membrane 2 ชั้น (Test strip และ

Control strip) ตัวอย่างละ 300 μ l ต่อจุด ดังกล่าวแล้วในข้อ 11.2.2 แล้วตรวจสอบหา *Leptospira* antigen ต่อไปโดย MAb dot-ELISA

สำหรับตัวอย่างปัสสาวะชุดอื่นๆ นั้นได้นำตัวอย่างละ 3-10 มล. ไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูด supernatant ออกไปจนเหลือประมาณ 0.5 มล. นำส่วนที่เหลือไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 20 นาที ก่อน slot-blot ลงบน nitrocellulose membrane 2 ชั้น (เป็น duplicates; Test strip และ Control strip) ตัวอย่างละ 200 μ l บน NC แต่ละแผ่น เมื่อ NC แห้งแล้วจึงนำไปตรวจหาแอนติเจน โดยวิธี MAb dot-ELISA ต่อไป การปั่นทำให้ sensitivity ของการตรวจหาแอนติเจนเพิ่มขึ้น

XII. การทำ SDS-PAGE และ Western blot analysis (WB)

การแยกแอนติเจนด้วย SDS-PAGE นั้นทำใน vertical slab gel apparatus (BioRad) ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ stacking gel 4% และ separating gel 12.5% การ transblot แอนติเจนลงบน nitrocellulose membrane ได้ใช้วิธีของ Towbin *et al.* (1979) หลังจาก electrotransblot แอนติเจนลงบน NC แล้ว block NC ด้วย blocking buffer (3% BSA, 5% gelatin ใน PBS, pH 7.4) ที่อุณหภูมิห้องบน rocking platform เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง NC ด้วย washing buffer แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยากับ antibodies (monoclonal หรือ polyclonal) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer อีกครั้งหนึ่งแล้วให้ NC ทำปฏิกิริยากับ rabbit anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate (Dakopatts) 1:1,000 ใน PBS, pH 7.4 หลังจาก incubate กับ substrate 5 นาที แล้วจึงล้าง NC ด้วยน้ำกลั่น และปล่อยให้แห้ง Ag-Ab reactive bands จะปรากฏให้เห็นเป็นสีน้ำตาลแดง

ในกรณีของตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยที่ปรากฏผลการตรวจเป็น culture-negative, antibody-negative แต่ MAb dot-ELISA positive นั้นผู้วิจัยได้ใช้ Western blot analysis เพื่อตรวจยืนยันว่าในปัสสาวะของผู้ป่วยมีแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* อยู่จริง (หรืออีกนัยหนึ่ง ผล MAb dot-ELISA เป็น true positive ไม่ใช่ false positive) โดยนำปัสสาวะประมาณ 10 มล. ไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที หลังจาก discard ส่วน supernatant ออกไปเกือบหมดแล้ว นำส่วนกันเหลือไปแยกด้วย SDS-PAGE ก่อนนำไป react กับ monoclonal antibodies (MAbLD5 หรือ MAb LF9) อย่างไรก็ดีในการ reveal antigen-antibody band นั้น ได้ใช้ reagents และวิธีการที่ต่างออกไปเล็กน้อยจาก Western blot ที่เคยใช้มาก่อน ทั้งนี้เพื่อเพิ่ม sensitivity ของการทดสอบ เนื่องจากไม่ทราบว่าในตัวอย่างปัสสาวะมี *Leptospira* antigen อยู่มาก-น้อย เพียงใด กล่าวคือ ใช้ biotinylated rabbit anti-mouse IgG แทน enzyme labelled-rabbit anti-mouse IgG และเมื่อล้าง NC แล้วจึง react กับ streptavidin-enzyme conjugate ล้างอีกครั้งหนึ่ง แล้วเติม enzyme substrate ตามลำดับ ผลบวก (มีแอนติเจนของ *Leptospira*

ในปัสสาวะ) ก็จะพบ Ag-Ab reactive band ตรงตำแหน่ง 35-36 kDa และ 38 kDa เมื่อใช้ MAbLD5 และ MAbLF9 เป็น antigen detection reagent ตามลำดับ

XIII. การพัฒนาเทคนิค PCR เพื่อวินิจฉัยการปนเปื้อนเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะและ semen bank ของวัว

13.1 การ extract DNA จากตัวอย่างของวัว

นำตัวอย่างปัสสาวะมา extract เอา DNA โดยใช้ Chelex ตามวิธีของ Cano *et al.* (1993) ส่วนตัวอย่าง semens ได้ extract โดยวิธี protenase-K treatment, phenol/chloroform extraction และ ethanol precipitation (Ausubal *et al.*, 1993) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การ extract DNA จากปัสสาวะ

นำตัวอย่างปัสสาวะปริมาตร 1.5 มล. มาปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C นำ sediment ที่ได้มา suspend ในน้ำกลั่น 100 μl หลังจากนั้นเติม Chelex (5% Chelex-100) ลงไป 200 μl ผสมให้เข้ากันโดย vortexing แล้ว incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วต้มอีก 8 นาที ก่อนนำไปปั่นที่ $12,000 \times g$ นาน 3 นาที จากนั้นเก็บ supernatant มา precipitate ด้วย ethanol ในอัตราส่วน absolute ethanol 500 μl ต่อ supernatant 200 μl และ 3 M sodium acetate, pH 4.2 ปริมาตร 20 μl เก็บไว้ที่ -20°C ช้ามคืน หรือ -70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ DNA ตกเป็น pellet ล้าง pellet หนึ่งครั้งด้วย 70% ethanol ปล่อยให้แห้งก่อนนำไปละลายใน TE buffer 20 μl

การ extract DNA จาก semen

นำ semen sample ปริมาตร 500 μl มาปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที นำ sediment ไป suspend ใน TE buffer เติม 10% SDS และ protienase-K ลงไป 30 μl และ 3 μl ตามลำดับ mix โดย invert หลอดหลาย ๆ ครั้ง แล้ว incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ precipitate ที่ได้ไป extract ด้วย phenol และ chloraform แล้วดูดเก็บชั้นบน (aqueous) ใส่หลอด Eppendorf หลอดใหม่ ทำการ precipitate DNA โดยใช้ 3 M sodium acetate, pH 4.6 ปริมาตร 1/10 และ absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตร DNA เก็บของผสมที่ -70°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ pellet ไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol แล้วปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 15-30 นาที นำไปละลายในน้ำกลั่น 15 μl

13.2 PCR Primers

ได้ใช้ oligonucleotides สองคู่ในการ amplify *Leptospira* DNA โดย generate จาก *rrs* gene (16S RNA) คือ oligonucleotides A และ B ซึ่ง correspond กับ nucleotides 38-57

และ 348-368 ใน primary structure ของ *L. interrogans* serovar canicola strain Moulton 16S RNA gene ตามลำดับ

13.3 DNA amplification

Mixture ที่นำไปทำ DNA amplification มีปริมาตรทั้งหมด 25 μ l ประกอบด้วย 2 μ M dNTPs, 10 $\times$ PCR buffer, 50 pM ของ primers แต่ละตัว (A และ B) และ 0.25 units ของ Taq DNA polymerase (Amersham, USA) โดยใช้ DNA extract ปริมาตร 5 μ l เป็น template ทำการ amplify ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer 9600, Thermal Cycler (Roche Molecular System Inc, Branchburg, New Jersey, USA) โดยตั้งคำสั่งให้ maintain first cycle คือ denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที annealing ที่ 63°C เป็นเวลา 1.5 นาที และ extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งหมด 30 cycles ตามด้วย extension cycle ที่ 72°C อีก 10 นาทีก่อนจบ cycles

13.4 การตรวจ PCR products

ขนาดของ expected PCR product คือ 331 bp ซึ่งจะตรวจพบได้เมื่อนำ PCR mixture ไป run ใน 0.8% agarose gel- electrophoresis และใช้ ethidium bromide ย้อมก่อนตรวจดูด้วย U-V transilluminator

13.5 Analytical sensitivity ของ PCR

ได้ทำการตรวจหา analytical sensitivity ของ PCR โดยการ ใช้ bacteria ต่างๆ และ genomic DNA โดยได้เตรียม DNA จาก pure *Leptospira* serovar bataviae จากการเพาะเลี้ยง และนำมานับจำนวนเซลล์ในแต่ละ มล. ของ culture โดยใช้ Petroff-Hausser chamber โดย original DNA extract ได้มาจาก 10^7 เซลล์/มล. แล้วเจือจางให้ลงไปจนถึง 1 เซลล์/มล. นำไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที และ extract โดย Chelex เช่นเดียวกับการ extract DNA จากตัวอย่างปัสสาวะ จากนั้นนำไปทำ PCR และตรวจหา PCR amplicon โดย 0.8% agarose gel-electrophoresis

สำหรับ genomic DNA ของเชื้อ *Leptospira* และ genomic DNA ของ bacteria อื่นๆ ได้เตรียมโดยวิธี CTAB lysis ตามวิธี Asubel *et al.* (1993) นำมา run ใน 0.8% agarose gel-electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อตรวจดูความเข้มของ DNA โดยใช้ molecular marker คือ λ -HindIII โดยถือว่าปริมาตร DNA คือ 50 ng เมื่อเทียบเท่ากับความเข้มข้นของ marker จากนั้นเจือจาง DNA ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 ng ถึง 0.5 fg ด้วยน้ำเกลือปกติ นำไป run ที่ 0.8% agarose gel-electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide ก่อนอ่านผล

13.6 Analytical specificity (ความเฉพาะ) ของ PCR

ได้เตรียม DNA จากแบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Leptospira* อีก 26 สายพันธุ์ (ตารางที่ 9) เพื่อนำมาทำเป็น templates สำหรับ PCR จากนั้น run amplicons ใน 0.8 % agarose gel-electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide เช่นกัน

XIV. การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในคนโดยการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างเลือด

14.1 ตัวอย่างเลือด และการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาแอนติเจน

14.1.1 ตัวอย่างกลุ่มที่ 5 ใช้ซีรัม พลาสมา และปัสสาวะ

14.1.2 ตัวอย่างกลุ่มที่ 6 ผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสที่แพทย์วินิจฉัยเบื้องต้นตามอาการ (WHO criteria) ว่าเป็นเลปโตสไปโรซิส และต่อมาผลการตรวจ IgM Dipstick, IFA และ MAT เป็นบวกจำนวน 3 คน จากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา เก็บตัวอย่างช่วงเดือนธันวาคม 2545 (กลุ่มที่ 6)

14.1.3 กลุ่มควบคุมลบ (negative controls) เป็นตัวอย่างเลือดของคนปกติจำนวน 100 คน (นักศึกษามหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์และจากผู้มาตรวจสุขภาพประจำปีที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์) เจาะเลือดของแต่ละคนใส่ในหลอดที่มี heparin เพื่อกันเลือดแข็งตัว ทุกคนได้รับ verbal informed consent จากผู้วิจัยก่อนเจาะเลือดรายละเอียด 3 มล. นำเลือดไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บพลาสมา 60 μ l รวมกับ buffy coat นำไปเติมลงในส่วนของผสมของน้ำกลั่น 50 μ l 10% SDS 25 μ l และ 2% Triton X-100 25 μ l และนำไปต้ม 20 นาที ก่อนใช้ตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี sandwich ELISA

14.2 Sandwich ELISA มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ คือ

- Coat wells ทุก well ของ Maxisorb ELISA plates ด้วย 100 μ l rabbit polyclonal antibodies (PAb) ต่อ *Leptospira* ใน coating buffer (20 μ g protein/ml) เก็บที่ 4°C ข้ามคืน
- ล้าง unbound antibodies ออกด้วย washing buffer แล้ว coat แต่ละหลุมด้วย blocking solution (200 μ l / well) incubate ที่ 37°C, 1 ชั่วโมง
- ล้าง plates แล้วเติม sample แต่ละ sample ลงในแต่ละหลุม (sample คือ plasma + buffy coat ซึ่งต้มใน SDS และ Triton X-100 ไว้แล้ว) ทั้งนี้ทุกครั้งต้องมี *Leptospira* antigen เป็น positive control และ *E. coli* lysate เป็น negative control ด้วยทุกครั้ง incubate ที่ 37°C, 2 ชั่วโมง

- ล้าง plate แล้วเติม MAb LD5 (256 indirect ELISA units / well) incubate ที่ 37°C, 2 ชั่วโมง
- ล้างแล้วเติม rabbit anti-mouse immunoglobulin ซึ่ง labelled ด้วย Biotin (diluted 1:1,000) ลงไปทุกหลุม หลุมละ 100 μ l แล้ว incubate ที่ 37°C, 1 ชั่วโมง
- ล้าง plates แล้วเติม streptavidin – horseradish peroxidase conjugate (dilution 1:1,000) ลงทุกหลุม หลุมละ 100 μ l แล้ว incubate ที่ 37°C, 1 ชั่วโมง แล้วล้าง 5 ครั้ง
- เติม freshly prepared substrate solution ลงทุกหลุม หลุมละ 100 μ l แล้ว incubate ในที่มืด 30 นาที
- หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stop solution ลงไปทุกหลุม หลุมละ 50 μ l
- ใช้ ELISA reader ตั้งคลื่นความถี่แสงที่ 492 nm อ่าน optical density (OD) ของ content ทุกหลุม against blank ซึ่งเป็นหลุมที่ไม่ได้เติมพลาสมา buffy coat แต่เติม SDS และ Triton X-100 ที่ใช้เป็น lysis buffer ของ sample แทน (นำไปต้มเช่นเดียวกับตัวอย่างตรวจ buffy coat + พลาสมา) แทน

ผลการวิจัยโครงการย่อย ที่ 1

1. ผลการตรวจหา *Leptospira* antigen ในตัวอย่าง ปัสสาวะของคน

ได้นำ urine samples ของผู้ป่วย leptospirosis กลุ่มที่ 1 และ 2 ไปต้ม 30 นาที โดยใช้ 96-well slot-blot machine (Pierce, USA) หยด 300 μ l ของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างลงบน nitrocellulose membrane (NC) ปลอ่ยให้แห้งแล้วจึง block หลังจากนั้นให้ทำปฏิกิริยากับ MAb LD5 ในการทดสอบแบบ dot-blot ELISA

สำหรับตัวอย่างปัสสาวะกลุ่มที่ 3 และ 4 ได้นำแต่ละตัวอย่างปริมาตร 3-10 ml ไปปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจาก discard supernatant ออกไปจนเหลือประมาณ 0.5 ml แล้ว นำส่วนที่เหลือในหลอดไปต้มเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไป slot-blot ลงบน NC ด้วย 96-well slot-blot machine ปลอ่ยให้แห้ง block NC ก่อนนำไป react กับ MAb LD5 เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 และ 2 จากนั้นทำปฏิกิริยากับ reagent ต่างๆ ตามลำดับของวิธี dot-blot ELISA จนกระทั่ง positive control (urine ของคนปกติ + whole cell homogenate ของเชื้อ *Leptospira* serovar icterohaemorrhagiae) เป็นจุดสีม่วง หรือน้ำเงินปนม่วง ส่วน negative control (urine ของคนปกติ + whole cell homogenate ของเชื้อ *E. coli* K12) เป็นสีอื่นหรือไม่สี

ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ผลการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ โดย MAb based - dot-blot ELISA ของผู้ป่วย leptospirosis กลุ่มที่ 1 จำนวน 60 คน ซึ่งมีไข้เฉลี่ย 2.97 วันก่อนไปโรงพยาบาล พบว่า urine samples 37 จาก 60 samples (61.67%) ให้ผลบวก (ตารางที่ 1.3, column สุดท้าย) ในขณะที่ serum samples ของผู้ป่วยกลุ่มนี้ 24 จาก 60 ราย (40%) ให้ผลบวกโดย MAT (ทราบผลภายหลังส่ง serum samples ประมาณ 4 เดือน) ในจำนวน 60 รายนี้ ได้ทดสอบซีรัมด้วย IgM dipstick 52 ราย พบว่า 28 ราย (53.85%) ให้ผลบวก ในผู้ป่วยที่ผล MAT เป็นบวก 24 รายนั้นพบว่า 15 รายให้ผลบวก antigen test โดย dot-blot ELISA ด้วย นอกจากนี้ antigen test โดย dot-blot ELISA ยังให้ผลบวกแก่ urine samples ของผู้ป่วยอีก 22 ราย จาก 36 รายที่ให้ผล MAT เป็นลบ ส่วนในกลุ่มผู้ป่วย 28 รายที่ให้ผล IgM dipstick เป็นบวกนั้นพบว่า 17 ราย (60.7%) ตรวจพบแอนติเจนในปัสสาวะด้วยวิธี dot-blot ELISA และผู้ป่วย 21 ราย ซึ่งผล IgM dipstick และ MAT เป็นลบ พบว่า 14 ราย (66.7%) ให้ผลบวกด้วยการตรวจหาแอนติเจน (ตารางที่ 1.3)

ตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ผู้ป่วยกลุ่มนี้มาจากโรงพยาบาลมหาราช จังหวัดนครราชสีมา มีไข้มาแล้ว 6.9 วัน พบว่าซีรัมของผู้ป่วย 4 จาก 8 ราย (50%) ให้ผล MAT เป็นบวก ส่วนตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บในวันแรกที่ผู้ป่วยไปถึงโรงพยาบาล 5 จาก 8 ราย (62.5%) พบว่ามีแอนติเจนของ *Leptospira* และเมื่อทดสอบตัวอย่างปัสสาวะของผู้ที่ให้ผลลบในวันแรก (D1) ในตัวอย่างที่เก็บ

ซ้ำครั้งที่ 1 (F1) และเก็บซ้ำครั้งที่ 2 (F2) พบว่าให้ผลบวกโดย antigen detection dot-blot ELISA (ตารางที่ 1.4) ดังนั้น diagnostic sensitivity ของ antigen detection assay ของผู้ป่วยกลุ่มที่สองนี้จึงเป็น 100%

ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ตัวอย่างกลุ่มนี้เป็นผู้ป่วยจากโรงพยาบาลขอนแก่น 36 ราย ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการในเบื้องต้นว่าเป็น leptospirosis ผู้ป่วยมีไข้มาแล้ว 1-8 วัน (เฉลี่ย 3.4 วัน) ได้เก็บ urine samples ในวันแรกที่ผู้ป่วยไปโรงพยาบาล (D1) และ D2, D3, D7 และ D14 ตามลำดับ ได้ทดสอบซีรัมของผู้ป่วยในวันแรกที่ไปโรงพยาบาลด้วย IgM dipstick หากรายใดให้ผลลบก็จะทดสอบซ้ำอีกครั้งหนึ่งในวันที่ 5, 6 หรือ 7 ต่อมา ซีรัมของรายใดให้ผล IgM dipstick เป็นบวกจะถูกส่งไป confirm ด้วย IFA และคัดเลือกซีรัมที่ให้ผลบวกทั้ง IgM dipstick และ IFA จะถูกส่งไปตรวจด้วย MAT เพื่อหา responsible serovar(s)

ผลการทดสอบแอนติเจนใน urine samples ของ D1 จำนวน 36 ราย พบผลบวกจำนวน 27 ราย (75.0%) และเมื่อทดสอบ D2, D3, D7 และ D14 urine samples พบว่าให้ผลบวกแอนติเจนคิดเป็น cumulative positivity 32 ราย จาก 36 ราย (88.9%), 35 จาก 36 ราย (97.2%), 35 จาก 36 ราย (97.2%) และ 36 จาก 36 ราย (100%) ตามลำดับ ผลของ IgM dipstick ของตัวอย่างซีรัมที่เก็บในวันแรกพบผลบวก 25 จาก 36 ราย (69.4%) และซีรัม 25 รายนี้ 16 ราย (64%) ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วย IFA ตัวอย่างซีรัมที่ IgM dipstick ให้ผลลบในวันแรก (จำนวน 11 ราย) เมื่อทดสอบซ้ำในวันที่ 5, 6 หรือ 7 พบว่า 5 จาก 11 ราย ให้ผลบวกซึ่งทำให้ cumulative percent positivity ของ IgM dipstick ในวันที่ 7 ของการอยู่โรงพยาบาลเป็น 83.3% ซีรัม 5 ราย ที่ให้ผลบวก IgM dipstick ภายหลังนี้ให้ผลบวก IFA ทุกราย ดังนั้น cumulative percent positivity ของ IFA เมื่อทดสอบซีรัมที่ IgM dipstick เป็นบวกจึงเป็น 21 ราย จาก 30 ราย (70%) ซีรัม 21 รายที่ให้ผลบวกทั้ง IgM dipstick และ IFA นี้ 18 จาก 21 ราย (85.7%) ให้ผลบวก MAT (ทราบภายหลังส่งซีรัมไปตรวจเป็นเวลา 4 เดือนหรือนานกว่านั้น) (ตารางที่ 1.5)

เพื่อยืนยันว่ามีแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* อยู่จริงในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย 6 คน ซึ่งให้ผลลบเมื่อตรวจหาแอนติบอดีทั้งสามวิธี (No. 31-36 ตารางที่ 1.5) และให้ผลบวกแอนติเจนในปัสสาวะ ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างปัสสาวะที่เหลือไป dialyse ในน้ำกลั่นแล้ว lyophilized เมื่อแห้งแล้วนำ concentrated urine samples ไปแยกด้วย SDS-PAGE แล้ว react กับ MAb LF9 และ MAb LD5 ตามด้วย biotinylated-rabbit anti-mouse immunoglobulins, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate และ substrate ตามลำดับ โดยใช้ homogenate ของ *Leptospira* serovar icterohaemorrhagiae ใส่ใน urine samples ของคนปกติเป็นตัวควบคุมบวก ผล Western blot analysis พบว่า dot-ELISA results ถูกต้องเพราะในตัวอย่างปัสสาวะทั้ง 6 ราย ที่การทดสอบหาแอนติเจนให้ผลบวกนั้นมี Ag-Ab bands ตรงตำแหน่ง 35-36 kDa เมื่อ

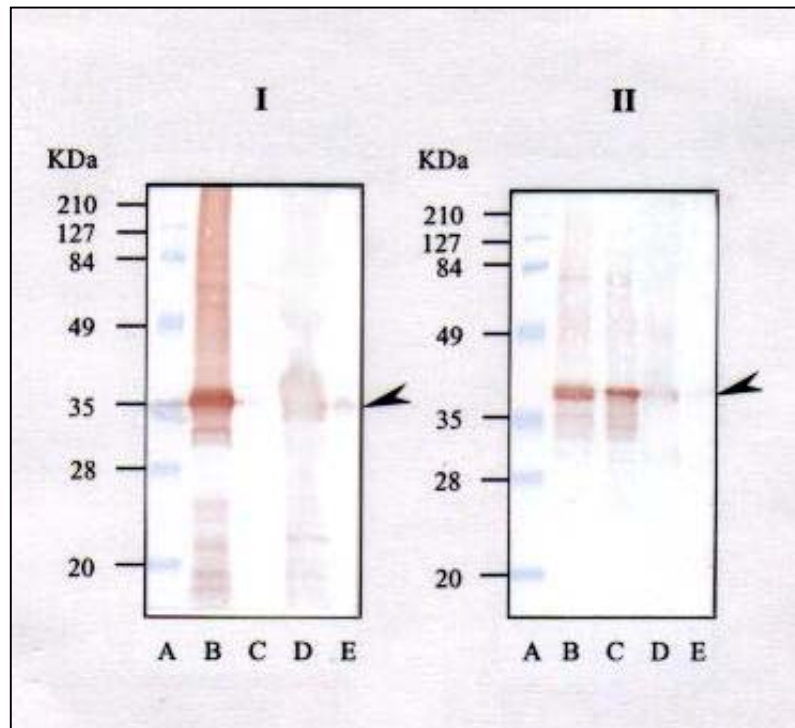
SDS-PAGE separated-urine samples react กับ MAb LD5 และมี Ag-Ab reactive band ตรงตำแหน่ง 38 kDa เมื่อ react กับ MAbLF9 (Figure 1.4)

ตัวอย่างกลุ่มที่ 4 ผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ไปพบแพทย์ที่โรงพยาบาลจังหวัดอุบลราชธานี เป็นกลุ่มที่พบเชื้อ *Leptospira* spp. ด้วยวิธีการเพาะเชื้อจาก clinical specimens (เลือด และ/หรือ CSF) หรือให้ผลบวก MAT ผู้ป่วยมีไข้มาแล้วเฉลี่ย 4.2 วัน ได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะในวันแรกที่ผู้ป่วยไปพบแพทย์ และวันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ ผลการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะโดย MAbLD5 dot-blot ELISA พบว่า 17 จาก 22 D1 samples (77.3%) ให้ผลบวก และ cumulative positivity ของ antigenuria เพิ่มขึ้น 18 จาก 22 (81.8%), 21 จาก 22 (95.5%), 22 จาก 22 (100%), 22 จาก 22 (100%) และ 22 จาก 22 (100%) ในวันที่ 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีด้วย MAT พบว่าซีรัมที่เก็บในวันแรก (D1) 7 จาก 22 ราย (31.8%) ให้ผลบวก และเมื่อตรวจซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยเก็บตัวอย่างซีรัมในช่วงวันที่ 7-14 ของการอยู่โรงพยาบาลพบว่าใน cumulative positivity เป็น 72.2% กล่าวคือตัวอย่างซีรัม 16 ราย จาก 22 ราย ให้ผลบวก MAT หลังจากส่งซีรัมไปตรวจหลายเดือน (ตารางที่ 1.6)

การตรวจหา *Leptospira* antigen จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมและคนปกติ

ผู้ป่วยกลุ่มควบคุม (กลุ่ม 4.1.2)

ตารางที่ 1.9 แสดงผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ในซีรัมของกลุ่มควบคุมที่เป็นผู้ป่วยมีไข้จำนวน 26 ราย ซึ่งแพทย์วินิจฉัยเบื้องต้นว่าเป็นไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ (P.U.O.) และต่อมาได้วินิจฉัยเพิ่มเติมพบว่า 10 รายเป็น cholangiocarcinoma (CCA) 8 รายได้ถูกวินิจฉัยตามอาการว่าเป็น melioidosis 3 รายพบว่าเป็นมาลาเรียโดยตรวจพบเชื้อใน blood smears 1 ราย เป็นสครับไทฟัส (positive antibody) และ 4 รายเป็นโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*Opisthorchiosis viverrini*) จากการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* โดย MAb LD5 dot-blot ELISA พบว่าปัสสาวะของผู้ป่วย clinically diagnosed melioidosis 3 รายให้ผลบวก และเมื่อนำ urine samples ส่วนที่เหลือของผู้ป่วยทั้งสามรายนี้ไปทำ Western blot analysis และ react กับ MAb LD5 และ MAb LF9 พบว่าให้ Ag-Ab reactive bands ตรงตำแหน่ง 35-36 kDa และ 38 kDa ตามลำดับซึ่งแสดงว่ามีแอนติเจนของ *Leptospira* อยู่ในตัวอย่างปัสสาวะจริง จึงอาจเป็นไปได้ว่าผู้ป่วยสามรายนี้เป็น mixed infection ของ *Leptospira* และ *Burkholderia pseudomallei* หรือเป็นเพราะการ diagnosis ว่าเป็น melioidosis แต่แรกนั้นทำโดยดูจากอาการป่วยซึ่งอาจไม่แม่นยำนัก ทั้งนี้เพราะอาการป่วยของ melioidosis และ leptospirosis มีความคล้ายคลึงกันมาก



រូបភាព 1.4 Western blot patterns of representative samples which MAb dot-ELISA were positive for *Leptospira* antigen but the serum antibody tests (IgM dipstick, IFA และ MAT) were negative

Note: The presence of Ag-Ab band at the 38 kDa region when the MAbLF9 was used in the WB (II) and at the 35 kDa region when the MAbLD5 was used in the WB (I)

ตัวอย่างของคนปกติจาก endemic area ของ leptospirosis (กลุ่ม 4.1.3.1)

จาก urine samples จำนวน 120 samples ซึ่งได้มาจากคนปกติที่ไม่มีอาการป่วยใดๆ ในภาคอีสานนั้น พบว่าการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ในตัวอย่างปัสสาวะให้ผลบวก 1 ราย อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัวอย่างปัสสาวะของรายนี้มีเชื้อไม่พอที่จะทำ Western blot analysis เพื่อยืนยันการมีอยู่ของแอนติเจนของ *Leptospira* ในตัวอย่าง จึงสันนิษฐานว่าผู้นี้ติดเชื้อ *Leptospira* โดยไม่มีอาการใดๆ (asymptomatic) หรือเพิ่งหายจากการเป็นไข้ (mild leptospirosis) และยังมีแอนติเจนอยู่ก็เป็นได้

2. Antibody Sandwich ELISA เพื่อการตรวจหาแอนติเจนในซีรัม พลาสมา และ ปัสสาวะของตัวอย่างกลุ่มที่ 5

ในการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างของกลุ่มที่ 5 ด้วย sandwich ELISA นั้น คณะผู้วิจัยได้ใช้ทั้ง polyclonal IgG anti-*Leptospira* จากกระต่าย (PAb IgG) หรือ MAb เป็น capture reagent สำหรับ coat wells ใน ELISA plates (Greiner, Germany) โดยใช้ antibody 10 µg/ml carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 (100 µl per well) หลังจาก incubate plates ที่ 37°C จนกระทั่งแห้งแล้ว ได้ล้าง unbound antibodies ออกด้วย PBST จากนั้น block ด้วย 1% BSA (200 µl per well) ที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม urine samples หรือ known antigen (1 µg-15.6 ng/ml) ลงไป incubate ล้าง แล้วเติม MAb LD5 (ในกรณี PAb IgG เป็น capture antibody) หรือเติม PAb IgG (ในกรณีใช้ MAb เป็น capture antibody) ลงไปเป็น detection reagent จากนั้นทำตามขั้นตอนของ sandwich ELISA จนครบทุกขั้นตอน พบว่าการใช้ PAb เป็น capture antibody ได้ผลดีกว่าการใช้ MAb เป็น capture antibody

ตารางที่ 1.10, 1.11 และ 1.12 แสดงผลการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่าง ซีรัม พลาสมาและปัสสาวะของผู้ป่วย leptospirosis กลุ่มที่ 5 โดยใช้ PAb เป็น capture antibody เปรียบเทียบกับผลการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธี IgM dipstick, IFA และ MAT ตามลำดับ จะเห็นว่าการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างทั้งสามชนิดให้ผลไม่ค่อยดีนัก คือให้ผลบวกเพียง 2/41 (4.9%), 6/34 (17.6%) และ 0/40 (0%) ตามลำดับ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการใช้วิธี sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่าง ซีรัม พลาสมา และปัสสาวะ ยังไม่มีความไวไม่เพียงพอ

3. Antibody Sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนของ *Leptospira* ในตัวอย่างกลุ่มที่ 6

ได้นำตัวอย่างเลือดของคนกลุ่มที่ 6 ซึ่งเก็บเป็น heparinized blood samples ใน hematocrit tubes มาปั่นใน hematocrit centrifuge จากนั้นเก็บพลาสมาและ buffy coat จาก

hematocrit tubes 3-4 หลอดของแต่ละคนมารวมกัน (60 μ l) นำไปผสมน้ำกลั่น 50 μ l ซึ่งมี 10% SDS อยู่ 25 μ l และ 2% Triton x-100 อยู่ 25 μ l จากนั้นนำไปต้ม 20 นาที ก่อนนำไปตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี sandwich ELISA

ตารางที่ 1.13 แสดงค่า optical densities ของพลาสมา + buffy coat ของคนปกติ 100 คน เมื่อทดสอบ sandwich ELISA พบว่าที่ 492 nm จะมีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.052-0.071 ค่า mean และ SD อยู่ที่ 0.061 และ 0.004 ตามลำดับ

เมื่อใช้ค่า mean + 3 SD (OD 0.073) เป็น cut-off limit ระหว่างผลบวกและผลลบ *Leptospira* antigenemia พบว่าตัวอย่างพลาสมา + buffy coat ของผู้ป่วยกลุ่มที่ 6 ทั้งสามราย ให้ผลบวก antigenemia คือมี OD 1.083, 1.063 และ 0.168 ตามลำดับ (ตารางที่ 1.14)

แสดงว่าการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้พลาสมาและ buffy coat เป็นตัวอย่างสิ่งส่งตรวจที่มีความไวและความเฉพาะ 100 %

ตารางที่ 1.9 ผลของการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะของผู้ป่วยกลุ่มควบคุมจำนวน 26 ราย

Diagnosis	NO. of patients	Results of <i>Leptospira</i> antigen detection in urine	
		positive	negative
CCA	10	0	10
Malaria	3	0	3
Melioidosis*	8	3	5
Scrub typhus	1	0	1
<i>O. viverrini</i> infection	4	0	4
Total	26	3	23

* Clinically diagnosed

ตารางที่ 1.10. Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on serum samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)	Results of antigen detection in serum
		1 st	2 nd			
1	3	–	+	+	1:100 copenhageni and saigon	–
2	3	–	+	+	1:400 bratislava	–
3	3	–	+	+	1:100 sejroe	–
4	6	–	+	+	1:100 bangkok, copenhageni and saigon	–
5	3	–	+	+	1:200 sejroe	–
6	3	+	0	+	1:100 bratislava	–
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati	–
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon	–
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	–
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	–
11	4	+	0	+	1:200 saigon; 1:400 pyrogenes	–
12	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and sejroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava	–
13	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhageni; 1:200 sejroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon	–
14	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhageni; 1:800 bangkok and	–
15	2	+	0	+	1:100 bangkok, sejroe and rachmati;	–
16	5	+	0	+	1:200 saigon	–
17	3	+	0	+	1:100 wolffi	–
18	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava	–
19	1	+	0	+	–	+
20	4	+	0	+	–	–
21	3	+	0	+	–	–
22	4	+	0	–	0	–
23	4	+	0	–	0	–
24	3	+	0	–	0	–
25	2	+	0	–	0	–
26	2	+	0	–	0	–
27	3	+	0	–	0	–
28	2	+	0	–	0	–
29	2	+	0	–	0	–
30	3	+	0	–	0	–
31	3	+	0	0	0	–
32	2	+	0	0	0	–
33	3	+	0	0	0	–
34	4	+	0	0	0	–
35	4	+	0	0	0	–
36	3	+	0	0	0	–
37	3	+	0	0	0	–
38	4	–	0	0	0	+
39	2	–	0	0	0	–
40	2	–	0	0	0	–
41	3	–	0	0	0	–
3.34*						
Positive / total		32/41	5/5	22/31	18/21	2/41
% Positivity		78.0	100	70.9	85.7	4.9
Cumulative positivity (%)		32/41(78.0)	37/41(90.2)	22/31(70.9)	18/21 (85.7)	2/41 (4.9)

+, positive result; –, negative result; 0, sample not available; *, days of fever before hospital arrival

ตารางที่ 1.11. Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on plasma samples of the clinically diagnosed leptospirosis patients (fifth batch)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)	Results of antigen detection in plasma
		1 st	2 nd			
1	3	–	+	+	1:100 copenhagen and saigon	–
2	3	–	+	+	1:400 bratislava	–
3	3	–	+	+	1:100 sejroe	–
4	6	–	+	+	1:100 bangkok, copenhagen and saigon	–
5	3	–	+	+	1:200 sejroe	–
6	3	+	0	+	1:100 bratislava	–
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati	–
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon	–
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	–
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	–
11	4	+	0	+	1:200 saigon; 1:400 pyrogenes	–
12	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and sejroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava	–
13	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhagen; 1:200 sejroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon	–
14	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhagen; 1:800 bangkok and bratislava	–
15	2	+	0	+	1:100 bangkok, sejroe and rachmati;	–
16	5	+	0	+	1:200 saigon	–
17	3	+	0	+	1:100 wolffi	–
18	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava	–
19	1	+	0	+	–	–
20	4	+	0	+	–	–
21	3	+	0	+	–	–
22	4	+	0	–	0	–
23	4	+	0	–	0	–
24	3	+	0	–	0	–
25	2	+	0	–	0	–
26	2	+	0	–	0	–
27	3	+	0	–	0	–
28	2	+	0	–	0	+
29	4	+	0	0	0	+
30	3	+	0	0	0	+
31	3	+	0	0	0	+
32	4	–	0	0	0	–
33	2	–	0	0	0	+
34	3	–	0	0	0	+
3.47*						
Positive / total		26/34	5/5	7/28	18/21	6/34
% Positivity		76.5	100	25.0	85.7	17.6
Cumulative positivity (%)		26/34 (76.5)	31/34 (91.2)	7/28 (25.0)	18/21 (85.7)	6/34 (17.6)

+, positive result; –, negative result; 0, sample not available; *, days of fever before hospital arrival

ตารางที่ 1.12. Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on urine specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)	Results of urine antigen detection performed on urine samples collected at day	
		1 st	2 nd			1	2
1	3	–	+	+	1:100 copenhageni and saigon	-	0
2	3	–	+	+	1:400 bratislava	-	-
3	3	–	+	+	1:100 sejroe	-	-
4	6	–	+	+	1:100 bangkok, copenhageni and saigon	-	-
5	3	–	+	+	1:200 sejroe	-	0
6	3	+	0	+	1:100 bratislava	0	-
7	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava and icterohaemorrhagiae; 1:400 rachmati	-	-
8	7	+	0	+	1:100 bratislava; 1:200 saigon	-	-
9	8	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	-	-
10	4	+	0	+	1:100 bangkok and sejroe; 1:200 bratislava	-	0
11	4	+	0	+	1:100 pyrogenes and sejroe; 1:200 autumnalis (Akiyami A) and bratislava	-	0
12	3	+	0	+	1:100 bangkok and copenhageni; 1:200 sejroe; 1:400 rachmati; 1:800 saigon	-	-
13	3	+	0	+	1:100 saigon; 1:200 autumnalis (Akiyami A); 1:400 copenhageni; 1:800 bangkok and	-	0
14	2	+	0	+	1:100 bangkok, sejroe and rachmati; 1:200 bratislava	0	-
15	5	+	0	+	1:200 saigon	-	-
16	3	+	0	+	1:100 wolffi	-	-
17	3	+	0	+	1:100 wolffi; 1:800 bratislava	0	-
18	1	+	0	+	–	-	-
19	4	+	0	+	–	-	-
20	4	+	0	–	0	-	-
21	4	+	0	–	0	-	0
22	3	+	0	–	0	0	-
23	2	+	0	–	0	-	-

Continued next page

ตารางที่ 1.12. Results of IgM Dipstick, IFA, MAT and double antibody sandwich-ELISA performed on urine specimens of the clinically diagnosed leptospirosis patients (continued)

Patient no.	Day(s) of fever before hospital arrival	IgM		IFA	MAT titer(s) to serovar(s)	Results of urine antigen detection performed on urine samples collected at day	
		1 st	2 nd			1	2
24	2	+	0	—	0	-	-
25	3	+	0	—	0	0	-
26	2	+	0	—	0	-	-
27	3	+	0	—	0	-	-
28	2	—	—	0	0	-	0
29	6	0	0	0	1:200 sejroe	-	0
30	3	0	0	0	1:200 sejroe	-	0
31	15	0	0	0	1:3,200 bratislava	-	0
32	5	0	0	0	1:1,600 bratislava	-	0
33	4	0	0	0	1:200 saigon	-	0
34	4	0	0	0	1:200 bangkok, saigon; 1:1,600 sejroe	-	0
35	4	0	0	0	—	-	0
36	1	0	0	0	—	-	0
37	4	0	0	0	—	-	0
38	4	0	0	0	—	-	0
39	3	0	0	0	—	-	0
40	6	0	0	0	—	-	0
41	1	0	0	0	—	-	0
42	2	0	0	0	—	-	0
43	9	0	0	0	—	-	0
44	4	0	0	0	—	-	0
45	3	0	0	0	—	-	0
3.88*							
Positive / total		25/31	5/5	21/30	24/35	0/40	0/21
% Positivity		80.6	100	70	68.6	0	0
Cumulative positivity (%)		25/31 (80.6)	30/31 (96.8)	21/30 (70)	24/35 (68.6)	0	0

+, positive result; —, negative result; 0, sample not available; * , days of fever before hospital arrival

ตารางที่ 1.13 แสดง optical densities ของ sandwich ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira* ใน buffy coat ของคนปกติ 100 ราย

No.	OD	No.	OD	No.	OD
1	0.059	36	0.066	71	0.058
2	0.063	37	0.071	72	0.064
3	0.063	38	0.060	73	0.058
4	0.061	39	0.062	74	0.054
5	0.060	40	0.065	75	0.058
6	0.061	41	0.060	76	0.055
7	0.061	42	0.062	77	0.058
8	0.062	43	0.060	78	0.055
9	0.063	44	0.062	79	0.052
10	0.065	45	0.065	80	0.060
11	0.058	46	0.062	81	0.054
12	0.059	47	0.065	82	0.055
13	0.062	48	0.062	83	0.059
14	0.070	49	0.056	84	0.061
15	0.062	50	0.057	85	0.056
16	0.062	51	0.059	86	0.058
17	0.075	52	0.056	87	0.054
18	0.072	53	0.058	88	0.058
19	0.071	54	0.059	89	0.056
20	0.060	55	0.066	90	0.058
21	0.070	56	0.061	91	0.060
22	0.071	57	0.056	92	0.060
23	0.062	58	0.061	93	0.055
24	0.062	59	0.058	94	0.056
25	0.066	60	0.067	95	0.059
26	0.071	61	0.061	96	0.054
27	0.065	62	0.066	97	0.056
28	0.059	63	0.061	98	0.066
29	0.063	64	0.066	99	0.068
30	0.063	65	0.058	100	0.063
31	0.062	66	0.054		
32	0.062	67	0.061		
33	0.068	68	0.059		
34	0.065	69	0.064		
35	0.069	70	0.058		

Mean	0.061
SD	0.004
%CV	6.557
Cut-off OD	0.073

ตารางที่ 1.14 ผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างจากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส 3 ราย ซึ่งแพทย์วินิจฉัยตามอาการ และ IgM Dipstick ให้ผลบวกในตอนแรก และทราบผล IFA และ MAT ว่าให้ผลบวกภายหลังจากการตรวจหาแอนติเจน

Patient No.	Some clinical features	IgM Dipstick	IFA*	MAT*	Sandwich ELISA OD at 492 nm
1	Fever 38.0°C	+	+	1:100	1.083
2	Fever 38.5°C	+	+	1:100	1.063
3	Fever 37.5°C	+	+	1:400	0.168

* ทราบผลภายหลังจากการตรวจหาแอนติเจนด้วย sandwich ELISA

การวินิจฉัยเลปโตสไปโรซิสในตัวอย่างจากวัว

1. Dark-field microscopy (DFM) และ Fontana's Silver stain

1.1 ตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บมาใหม่ๆ จากวัวได้นำมาปั่นที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ดูด supernatant ที่เจือจางเกินไปเพื่อ suspend sediment ในปัสสาวะส่วนที่เหลือ จากนั้นนำไปหยดบน microscopic slide แล้วตรวจหา *Leptospira* ด้วยกล้อง dark-field microscope ในกรณีมีเชื้อ *Leptospira* จะเห็น spirochete แท่งบางๆ และเคลื่อนไหวได้อย่างรวดเร็ว

1.2 การย้อม urine sediment ด้วย Fontana's Silver strain (Potha and Panutumpon, 1970)

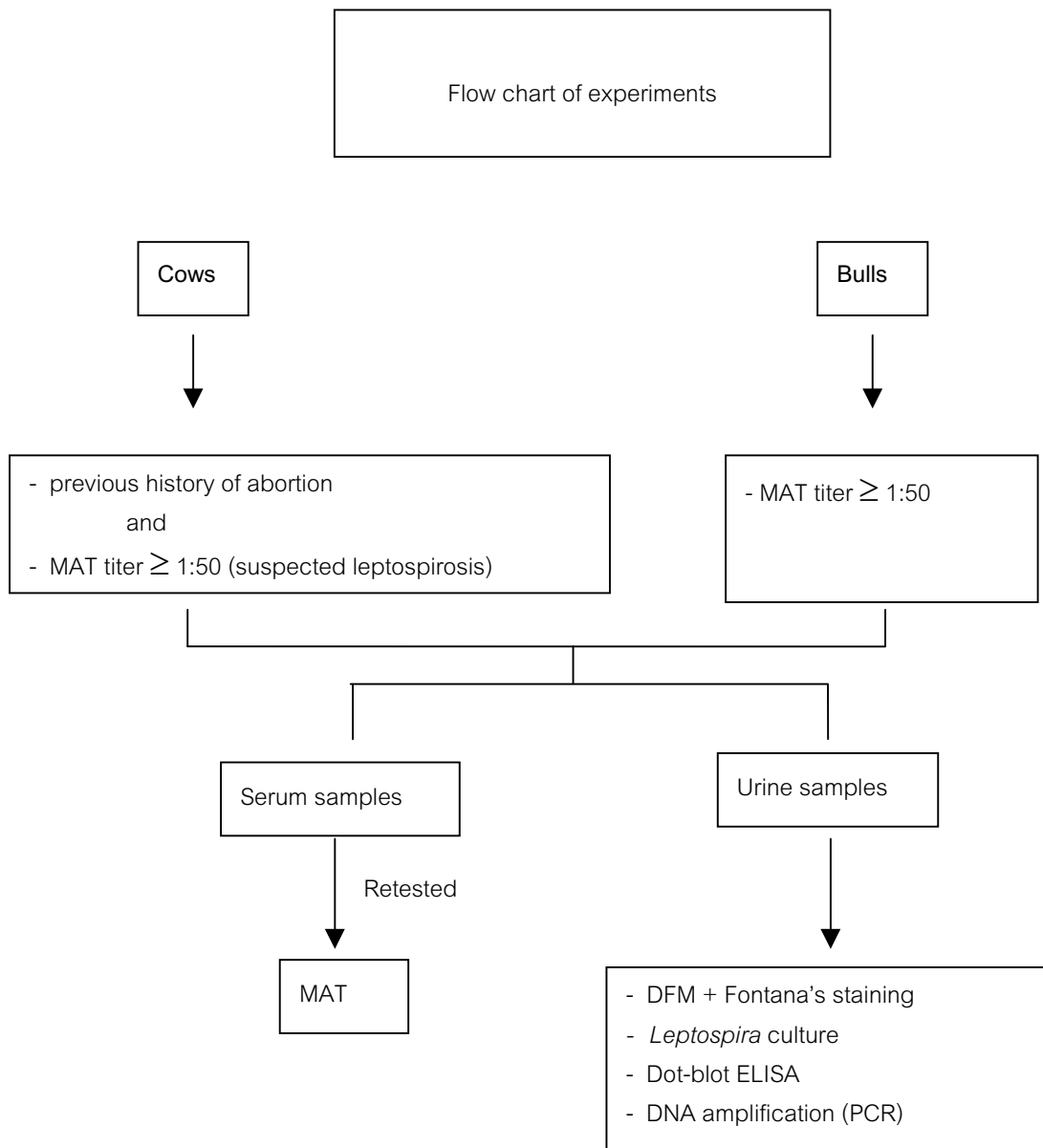
หลักการ : *Leptospira* spp. เป็น spirochete ซึ่งเป็น argyrophilic ดังนั้นจึงชอบ take up Silver stain

วิธีการย้อม : นำ urine sediment จากข้อ 1.1 มา smear บน microscopic slide ปล่อยให้แห้ง จากนั้นหยด Ruge's fluid ลงไปบน slide ให้ท่วมรอย smear นั้น เก็บ slide ในกล่องขึ้นเป็นเวลา 30 นาที ล้าง slide ด้วย absolute ethanol และทำให้ alcohol ระเหยไปด้วยความร้อน หยด tannic acid solution ลงบน slide จากนั้น heat-evaporate tannic acid แล้วล้าง slide ด้วยน้ำกลั่นก่อนนำไปจุ่มใน Fontana's Silver stain และทำให้ Fontana's Silver stain ระเหยแห้งด้วยความร้อนเช่นกัน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที rinse ช่างสั้นๆ ด้วยน้ำกลั่น แล้วจุ่ม slide ใน 95% ethanol และ absolute ethanol ตามลำดับ จากนั้น clear slide ด้วย xylene ก่อนนำไป mount ด้วย synthetic mounting medium ทำการตรวจหา *Leptospira* ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย $40 \times$ เมื่อพบ spirochetes ซึ่งสงสัยว่าอาจเป็น *Leptospira* จึงตรวจดูด้วยกำลังขยายขนาด $100 \times$ ต่อไป เชื้อ *Leptospira* จะติดสีม่วงเข้มเกือบดำและมีลักษณะเฉพาะ (Figure 1.5) คือ blunt ends เป็นส่วน hooks และเป็น delicate shape (short spiral wave-length)

2. การเพาะเลี้ยง *Leptospira* จากปัสสาวะวัว

EMJH medium ซึ่งใส่ปัสสาวะวัวหนึ่งหยดเอาไว้วันนั้น เมื่อนำไปถึงห้องปฏิบัติการได้นำไป incubate ที่ 30°C แล้วตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ทุกๆ 5-7 วัน ถ้ามีเชื้อ *Leptospira* ก็มักจะพบว่าบริเวณด้านล่างจากผิว medium ประมาณ 1 ซม. จะมีวงแหวนที่เรียกว่า Dinger's ring ในการตรวจจะต้องใช้ medium บริเวณ Dinger's ring หยดลงบน glass slide แล้วตรวจดูด้วย dark-field microscope ซึ่งจะเห็น spirochete ที่เคลื่อนไหวอย่างรวดเร็ว เมื่อไม่พบเชื้อต้อง incubate culture ต่อไปอีกอย่างน้อย 18 สัปดาห์ โดยตรวจดูทุก ๆ 5-7 วันเช่นเดิม ถ้ายังให้ผลลบภายหลัง incubate มาแล้ว 18 สัปดาห์ จึงจะถือว่าให้ผล culture negative ในกรณีที่ positive ได้ทำการ subculture เชื้อลงใน liquid EMJH เพื่อ maintain เป็น pure culture ต่อไป

Diagram ที่ 1: แสดง flow-chart ของการวิจัย leptospirosis ในวัว



DFM, dark-field microscopy for direct visualization of *Leptospira*

MAT, microscopic agglutination test

DNA, deoxyribonucleic acid

PCR, polymerase chain reaction

3. Microscopic agglutination test (MAT)

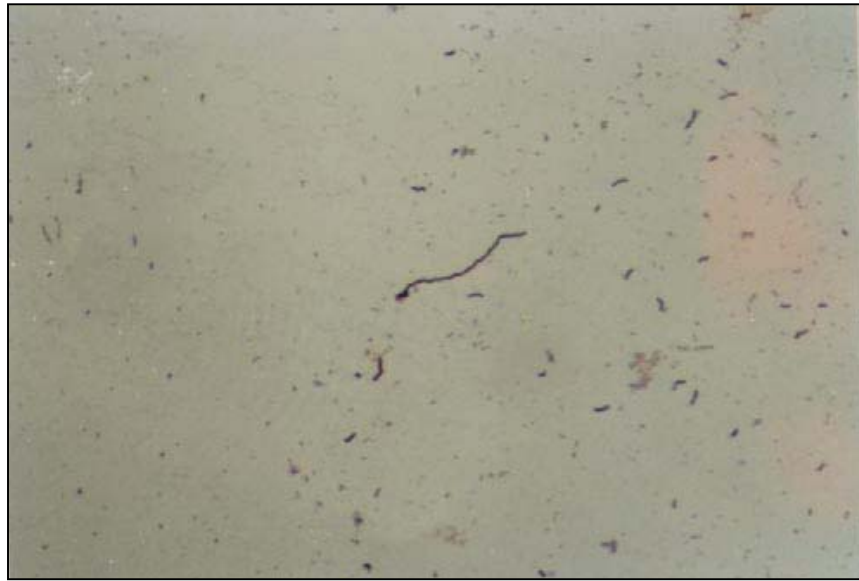
ซีรัมของวัวทุกตัวในกลุ่ม test และ control ได้นำมาหา MAT titer โดยวิธีของ Faine (1982) ใหม่อีกครั้งหนึ่งโดยนำซีรัมแต่ละตัวอย่างมาทำให้เจือจาง 1: 10 สำหรับ screening test และ 1: 50 สำหรับ confirmatory test โดย dilute ใน PBS, pH 7.4 ที่ปลอดเชื้อและให้มีปริมาตร 50 μ l จากนั้นเติม 7-day old live *Leptospira* culture แต่ละ serovar จาก typing panel ลงไปผสมกับ diluted serum sample ปิดฝา plate ด้วย plastic wrap เพื่อป้องกันการระเหยแห้งแล้ว incubate ที่ 30°C เป็นเวลา 90 นาที อ่านผลโดยการ transfer ของผสมจากแต่ละหลุมปริมาตร 1 หยดลงบน glass slide แล้วตรวจปฏิกิริยาเกาะกลุ่มด้วยกล้อง dark-field ปฏิกิริยาบวกลบหมายถึงเชื้อ *Leptospira* ที่เติมลงไปอย่างน้อย 50% ถูกจับเป็นกลุ่ม

4. วิธีทางสถิติ

ได้ใช้วิธีของ Galen (1980) ในการคำนวณหา diagnostic sensitivity, diagnostic specificity และ accuracy ของ Lepto-Dot ในการวินิจฉัยการติดเชื้อ *Leptospira* ของวัว โดยเปรียบเทียบกับ MAT, dark-field microscopy (+ Fontana's staining) และ culture method

นอกจากนี้ยังคำนวณหาค่า *kappa* coefficient โดยวิธีของ Cohen (1990) และ *kappa* probability โดยวิธีของ Fleiss (1973) เพื่อบอก reliability ของผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ pathogenic *Leptospira* ในปัสสาวะด้วย Lepto-Dot เปรียบเทียบกับวิธี dark-field microscopy และ culture อีกด้วย การแบ่งระดับความน่าเชื่อถือจากค่าของ *kappa* อยู่ระหว่าง 0-1 (Landis and Koch, 1977) โดยถือว่า *kappa* value 1 หมายถึง การทดสอบทั้งสองวิธีมี perfect agreement ค่า *kappa* 0.81-0.99 เป็น excellent agreement ค่า *kappa* 0.61-0.80 เป็น very good agreement ค่า *kappa* 0.41-0.60 เป็น good agreement ค่า *kappa* 0.21-0.40 เป็น fair agreement และค่า *kappa* น้อยกว่า 0.20 เป็น poor agreement ระหว่างการทดสอบทั้งสองวิธี และ agreement ไม่ได้เกิดโดยบังเอิญ (by chance) (ตารางที่ 1.15)

A



B



รูปที่ 1.5 *Leptospira* spp. ที่ตรวจพบในปัสสาวะวัว หลังจากย้อมด้วย Fontana's Silver stain

A 10 × ocular, 40 × objective

B 10 × ocular, 100 × objective

ผลการวิจัย (Results)

1. ผล MAT ของซีรัมวัวทั้ง 45 ตัวและ controls 20 ตัว ซึ่งเป็นข้อมูลเดิมจากสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

วัวทั้ง 45 ตัวซึ่งเลือกมาใช้ในการวิจัยส่วนนี้ให้ผลบวกจากการตรวจด้วย MAT โดยสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นวัวจากจังหวัดชลบุรี 15 ตัว จากขอนแก่น 30 ตัว นอกจากนี้ยังทราบผลของ serum reactive serovars ด้วย (ตารางที่ 1.16)

วัวอีก 20 ตัวที่ใช้เป็น negative controls ในการศึกษาวิจัยส่วนนี้ให้ผล MAT negative ต่อ *Leptospira* ใน typing panel 26 serovars คือ ballico, bataviae, canicola, celledoni, djasiman, grippotyphosa, hebdomadis, hyos (tarassovi) copenhageni, icterohemorrhagiae, javanica, saigon, pomona, pyrogenes, ranarum, sarmin, hardjo, sejroe, wolfi และ patoc

2. ผลการตรวจด้วย MAT (ตรวจซ้ำโดยใช้ซีรัมที่เจาะภายหลังตรวจครั้งแรกประมาณ 2-3 เดือน), dark-field microscopy (DFM), culture และ Dot-ELISA

ตารางที่ 1.17 แสดงผลการตรวจ leptospirosis วัว 45 ตัวซึ่งเคยให้ผลบวก MAT จากรายงานของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ด้วยวิธี MAT (ตรวจซ้ำโดยใช้ซีรัมซึ่งเจาะภายหลังผล MAT ครั้งแรกเป็นบวก 2-3 เดือน) วิธี DFM การเพาะเชื้อจากปัสสาวะ และการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะด้วย Lepto-Dot (dot-ELISA)

เปรียบเทียบผลของ Lepto-Dot กับ DFM (ตารางที่ 1.18)

จากปัสสาวะวัว 45 ตัวพบว่า 21 samples (46.67%) ให้ผลบวก คือ มีแอนติเจนในปัสสาวะเมื่อใช้ Lepto-Dot ได้แก่ samples ของวัวตัวที่ 3, 7, 8, 9, 11, 15, 19, 20, 21, 22, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43 และ 44 ส่วนปัสสาวะของ controls 20 ตัว ให้ผลลบจากการตรวจหาแอนติเจนด้วยวิธี Lepto-Dot ในส่วนของตัวอย่าง 21 ตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจแอนติเจนเป็นบวก พบว่า 12 ตัวอย่าง (26.7%) ให้ผล DFM เป็นบวกด้วย (true positive) คือ ตัวอย่างที่ 9, 15, 19, 20, 22, 32, 33, 34, 39, 40, 43 และ 44 มีอยู่ 9 ตัวอย่างที่ผลการตรวจหาแอนติเจนเป็นบวกและ DFM เป็นลบ คือ 3, 7, 8, 11, 21, 31, 33, 38 และ 41 (false positive) ในตัวอย่างที่ผลการตรวจหาแอนติเจนเป็นลบ 24 ตัวอย่าง ก็ไม่พบเชื้อ *Leptospira* เมื่อตรวจด้วยวิธี DFM เช่นกัน (true negative)

Diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy และ positive และ negative predictive values ของการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะวัวโดยใช้ชุดตรวจ Lepto-Dot เปรียบ

เทียบกับวิธี DFM ได้ผล 100 %, 72.72%, 80.0%, 57.14% และ 100% ตามลำดับ และมีค่า *kappa* coefficient เท่ากับ 0.5872 ซึ่งเป็น good agreement ของการทดสอบด้วยวิธีการทั้งสองวิธี แต่ Lepto-Dot มีความไว (sensitivity) มากกว่า DFM

เปรียบเทียบผลของ Lepto-Dot กับวิธี culture

จากการเพาะเชื้อในปัสสาวะ พบว่ามีตัวอย่างปัสสาวะเพียง 6 ตัวอย่างเท่านั้นที่พบการเติบโตของเชื้อ *Leptospira* คือ ตัวอย่างที่ 15, 19, 20, 22, 32 และ 40 อย่างไรก็ตามทั้ง 6 ตัวอย่างที่สามารถเพาะเชื้อได้นี้มีผลการตรวจของ Lepto-Dot เป็นผลบวกเช่นกัน (True positive) 15 ตัวอย่างให้ผล Lepto-Dot เป็นบวกแต่เพาะเชื้อไม่ขึ้น (false positive) 24 ตัวอย่างให้ผลลบทั้งสองวิธี (True negative) ดังนั้น diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, accuracy, positive predictive value, negative predictive value, *kappa* coefficient, *kappa* probability และ *p* value จึงเป็น 100.0%, 61.54%, 66.67%, 28.57%, 100%, 0.2991, 2.8128 และ < 0.0025 ตามลำดับ (ตารางที่ 1.19)

ตารางที่ 1.15: แสดงค่า *kappa coefficient* และ *interpretation*

Value of <i>kappa</i>	Strength of agreement between the two test beyond chance
< 0.20	Poor
0.21-0.40	Fair
0.41-0.60	Good
0.61-0.80	Very good
0.81-0.99	Excellent
1.00	Perfect

การคำนวณค่า *kappa coefficient* คำนวณจากสมการดังต่อไปนี้:

$$kappa \text{ coefficient } (k) = \frac{2(ad - bc)}{p1q2 + p2q1}$$

เมื่อ a = true positive (TP), b = false negative (FN)
 c = false positive (FP) และ d = true negative (TN)

$$p1 = TP + FN$$

$$q1 = FP + TN$$

$$p2 = TP + FP$$

$$q2 = FN + TN$$

ตารางที่ 1.16: แสดงผล MAT และ *Leptospira* serovars ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ leptospirosis ในวัว 45 ตัว ในกลุ่ม Test specimens (ข้อมูลจากสถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

Location province	MAT results			Serum reactive serovar (s)											
	Total	Negative	Positive (%)	Balli	Bal	Bra	Gri	Har	Heb	Hyo	Pat	Pom	Ran	Sej	Wol
Chonburi	15	4	11	2	2	0	1	4	0	3	0	1	2	0	1
			(73.33)	(18.18)	(18.18)	(0.0)	(9.09)	(36.36)	(0.0)	(27.27)	(0.00)	(8.3)	(18.18)	(0.00)	(9.09)
Khonkaen	30	11	19	0	3	1	0	7	1	1	2	0	6	8	3
			(63.33)	(0.00)	(15.79)	(5.26)	(0.00)	(36.84)	(5.26)	(5.26)	(10.53)	(0.00)	(31.58)	(42.10)	(15.79)
Total	45	15	30	2	5	1	1	12	1	4	2	1	8	8	4
			(66.67)	(6.67)	(16.67)	(3.33)	(3.33)	(40.00)	(3.33)	(13.33)	(6.67)	(3.33)	(26.67)	(26.67)	(13.33)

Note: *, percent positive

Balli, ballico; Bal, ballum; Bra, bratislava; Gri, grippotyphosa; Har; hardjo (prajitno); Heb, hebdomadis
Hyo, hyos; Pat, patoc; Pom, pomona; Ran, ranarum; Sej , seiroe; Wol , wolffi

ตารางที่ 1.17 แสดงผล MAT เมื่อตรวจโดยสถาบันสุขภาพสัตว์และผล MAT ซึ่งตรวจใหม่ (โดยใช้วิธีที่เก็บประมาณ 2-3 เดือน หลังจากการทราบผลการตรวจด้วย MAT ครั้งแรกโดยสถาบันสุขภาพสัตว์) การตรวจด้วยวิธี dark-field microscopy (DFM) และ Fantana's staining การ culture และการตรวจด้วย dot-ELISA เพื่อหาแอนติเจนในปัสสาวะ

Cattle No.	MAT Result Tested by NIAH using 12 serovars	MAT Result Tested in the present study using 26 serovars	DFM	Culture	Dot-ELISA
1	hardjo $\geq$ 1:400, wolffi 1:20	hardjo 1:50, wolffi 1:50	-	-	-
2	bratislava 1:50	batistlava 1:10	-	-	-
3	pyrogenes 1:50	ranarum 1:100	-	-	+
4	hebdomadis 1:50, hardjo 1:50	hebdomadis 1:50, hardjo 1:50	-	-	-
5	sejroe 1:400	sejroe 1:50, ranarum 1:100	-	-	-
6	sejroe 1:50	Negative	-	-	-
7	sejroe 1:400	sejroe 1:50, ballum 1:100	-	-	+
8	sejroe 1:400	sejroe 1:50, ballum 1:100	-	-	+
9	sejroe 1:300	ranarum 1:100	+	-	+
10	hardjo 1:100	hardjo 1:50	-	-	-
11	sejroe 1:100	hardjo 1:50, wolffi 1:50, sejroe 1:50, ranarum 1:50	-	-	+
12	sejroe 1:400	Negative	-	-	-
13	sejroe 1:50	ranarum 1:50	-	-	-
14	sejroe 1:50	Negative	-	-	-
15	ballum 1:100	ballum 1:50	+	+	+
16	sejroe 1:100	Negative	-	-	-

ตารางที่ 1.17 (ต่อ)

Cattle No.	MAT Result Tested by NIAH using 12 serovars	MAT Result Tested in the present study using 26 serovars	DFM	Culture	Dot-ELISA
17	hardjo 1:400, wolffi 1:200, sejroe 1:400	hardjo 1:200, wolffi 1:100, sejroe 1:200	-	-	-
18	sejroe 1:100	ranarum 1:50	-	-	-
19	sejroe 1:100	Negative	+	+	+
20	sejroe 1:50	sejroe 1:50	+	+	+
21	hardjo 1:100, sejroe 1:50	hardjo 1:100, sejroe 1:50, ranarum 1:100	-	-	+
22	hardjo 1:300, sejroe 1:200	hardjo 1:100, sejroe 1:100	+	+	+
23	wolffi 1:50	Negative	-	-	-
24	rachmati 1:50	Negative	-	-	-
25	hyos 1:50	hyos 1:10, patoc 1:50	-	-	-
26	hardjo 1:50, wolffi 1:50	hardjo 1:10, patoc 1:50	-	-	-
27	hardjo 1:100	Negative	-	-	-
28	hardjo 1:50, hedomadis 1:50	Negative	-	-	-
29	hardjo 1:50	Negative	-	-	-
30	hardjo 1:50	Negative	-	-	-
31	ballico 1:100	ballico 1:50, ranarum 1:50	-	-	+
32	hyos 1:300	hyos 1:100	+	+	+
33	hardjo 1:100	hardjo 1:50	+	-	+

ตารางที่ 1.17 (ต่อ)

Cattle No.	MAT Result Tested by NIAH using 12 serovars	MAT Result Tested in the present study using 26 serovars	DFM	Culture	Dot-ELISA
34	bataviae 1:100	bataviae 1:100	+	-	+
35	hyos 1:200	hyos 1:50, pomona 1:50	-	-	+
36	grippotyphosa 1:100	grippotyphosa 1:50	-	-	-
37	hyos 1:300	Negative	-	-	-
38	ballico 1:100	ballico 1:50, ranarum 1:50	-	-	+
39	hyos 1:200	hyos 1:50	+	-	+
40	hardjo 1:100, wolffi 1:100	hardjo 1:50, wolffi 1:50	+	+	+
41	hyos 1:50	Negative	-	-	+
42	hyos 1:50	Negative	-	-	-
43	hardjo 1:50	hardjo 1:10	+	-	+
44	hardjo 1:50	hardjo 1:10	+	-	+
45	hardjo 1:50	Negative	-	-	-

Note: NIAH, National Institute of Animal Health

Samples no.1-30; specimens from Chonburi province

Samples no. 31-45; specimens from Khon Kaen province

ตารางที่ 1.18: เปรียบเทียบผลของการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะด้วยวิธี Dot-ELISA และ DFM

Dot-ELISA results	DFM		Total
	Positive	Negative	
Positive	12	9	21
Negative	0	24	24
Total	12	33	45

Diagnostic sensitivity	100.0%
Diagnostic specificity	72.72%
Accuracy	80.0%
Positive predictive value	57.14%
Negative predictive value	100.0%
<i>Kappa</i> coefficient	0.5872
Standard error of <i>kappa</i>	0.0184
<i>Kappa</i> probability	4.3245
<i>p</i> -value	<0.0001

ตารางที่ 1.19: เปรียบเทียบผล Dot-ELISA และ วิธีเพาะเชื้อ

Dot-ELISA results	Culture		Total
	Positive	Negative	
Positive	6	15	21
Negative	0	24	24
Total	6	39	45

Diagnostic sensitivity	100.0%
Diagnostic specificity	61.54%
Accuracy	66.67%
Positive predictive value	28.57%
Negative predictive value	100.0%
<i>Kappa</i> coefficient	0.2991
Standard error of <i>kappa</i>	0.0113
<i>Kappa</i> probability	2.8128
<i>p</i> -value	<0.0025

3. ผลการตรวจหา *Leptospira* ในตัวอย่างจากวัว โดยวิธี PCR

3.1 Analytical sensitivity ของ PCR

จำนวนน้อยที่สุดของ *Leptospira* ที่ PCR สามารถ amplify ให้มองเห็น amplicon ใน 0.8% agarose gel-electrophoresis ได้คือ 10^4 cells/ml หรือ 100 cells ใน 10 μ l (ปริมาตรที่ใช้ใน PCR) (โปรดดูรูปที่ 1.6)

ปริมาณ DNA ของเชื้อ *Leptospira* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วย PCR คือ 500 fg (ในปริมาตร 10 μ l ที่ใช้ใน PCR) (โปรดดูรูปที่ 1.7)

3.2 Analytical specificity ของ PCR

รูปที่ 1.8 แสดงความเฉพาะของ PCR โดยเมื่อทำการตรวจสอบ DNA ของเชื้อ *Leptospira* จำนวน 26 serovars (25 pathogenic และ 1 nonpathogenic serovars) ก็สามารถตรวจพบ PCR amplicon ที่ 331 bp จากทุก serovar (โปรดดูรูปที่ 1.8) ในขณะที่การตรวจเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ จำนวน 29 สายพันธุ์ (แกรมลบ 28 สายพันธุ์ และแกรมบวกหนึ่งสายพันธุ์) (ตารางที่ 1.20) ไม่พบ PCR amplicon ซึ่งแสดงว่า PCR มีความเฉพาะ 100 % (โปรดดูรูปที่ 1.9)

3.3 ผลการตรวจหา *Leptospira* ในตัวอย่างปัสสาวะวัวด้วยวิธี PCR (diagnostic sensitivity)

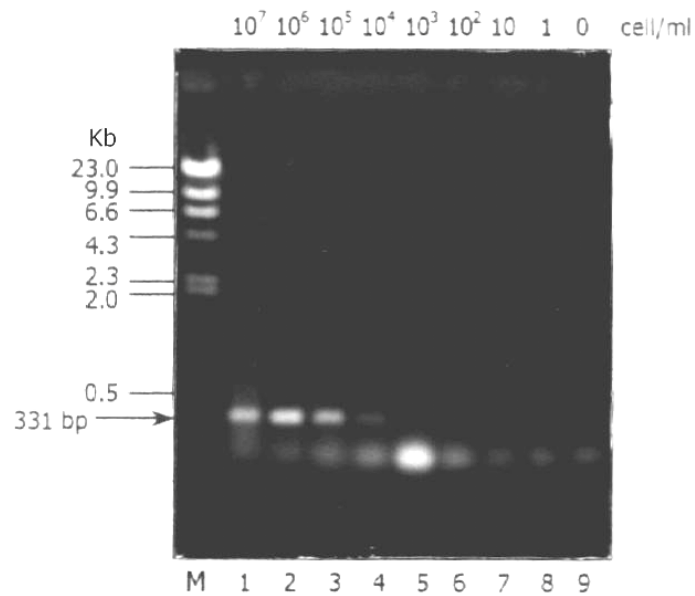
ผลการตรวจตัวอย่างปัสสาวะวัวจำนวน 45 ตัวอย่างจากวัวที่มีประวัติติดเชื้อ *Leptospira* พบว่า 22 จาก 45 ตัวอย่างมี amplicon ขนาด 331 bp คือตัวอย่างที่ 3, 7, 8, 9, 11, 15, 19, 20, 21, 22, 25, 30, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41, 43 และ 44 และไม่พบ DNA amplicon ในตัวอย่างปัสสาวะของวัวปกติทั่ว 20 ตัว (โปรดดูตารางที่ 1.21)

3.4 ผลการตรวจเชื้อ *Leptospira* ในตัวอย่างน้ำเชื้อสุจิของวัวจาก semen bank ของกรมปศุสัตว์ (diagnostic sensitivity)

จากตัวอย่างน้ำเชื้อสุจิ 10 ตัวอย่างพบว่า 3 ตัวอย่าง (30%) มี DNA amplicon ที่ 331 bp โดย PCR (โปรดดูรูปที่ 1.10)

ตารางที่ 1.20 แบบที่เรียต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับตรวจความเฉพาะ (analytical specificity)
ของ PCR primers

Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	
Gram-negative		
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Shigella</i> spp.	Vibrionaceae
S. Agona	<i>S. flexneri</i>	<i>V. cholerae</i> ,
S. Albany	<i>S. sonnei</i>	Ogawa, El Tor
S. Anatum	<i>Escherichiae</i>	<i>V. cholerae</i> ,
S. Blockley	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Inaba, classical
S. Cholerae-suis	Nonfermentive Gram-negative bacilli	
S. Enteritidis	Other enterobacteriaceae	
S. Lexington	<i>Citrobacter diversus</i>	
S. Ohio	<i>C. freundii</i>	
S. Panama	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
S. Paratyphi	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
S. Rissen		
S. Schwazonium		
S. Stanley		
S. Typhi		
S. Thyphimurium		
S. Worthington		
S. Weltevraden		



รูปที่ 1.6 Analytical sensitivity of PCR for detection of *Leptospira* DNA from cells

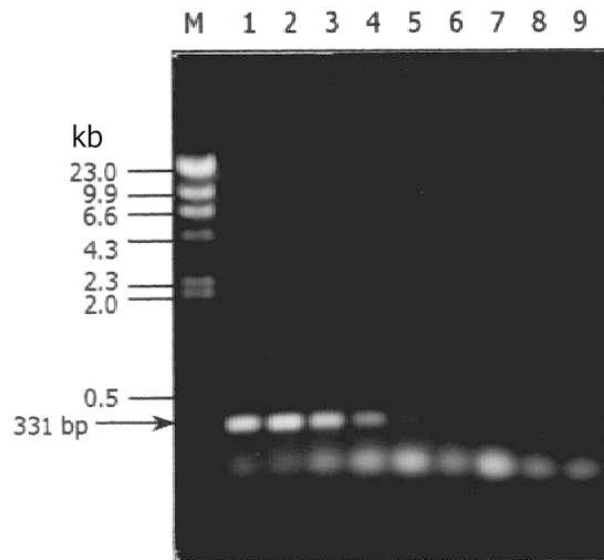
Lane M, Molecular size marker

Lanes 1-8, 10⁷ cells/ml, 10⁶ cells/ml, 10⁵ cells/ml, 10⁴ cells/ml, 10³ cells/ml, 10² cells/ml, 10 cells/ml, 1 cell/ml ตามลำดับ (ใช้ template 10 µl ของแต่ละ dilution ใน PCR)

Lane 9, Negative control (*E. coli*)

พบว่าจำนวน 10⁴ cells/ml หรือ 100 cells ใน 10 µl คือจำนวนเซลล์ *Leptospira* น้อยที่สุดที่จะสามารถ detect ได้โดย PCR

Expected amplicon = 331 bp



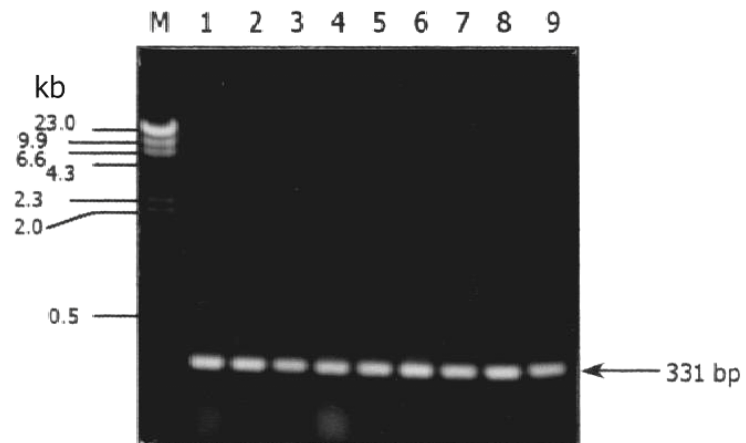
รูปที่ 1.7 Analytical sensitivity of PCR for detection of *Leptospira* genomic DNA

Lane M, Molecular size marker

Lanes 1-8, DNA amounts of 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg และ 5 fg ตามลำดับ

Lane 9, Negative control

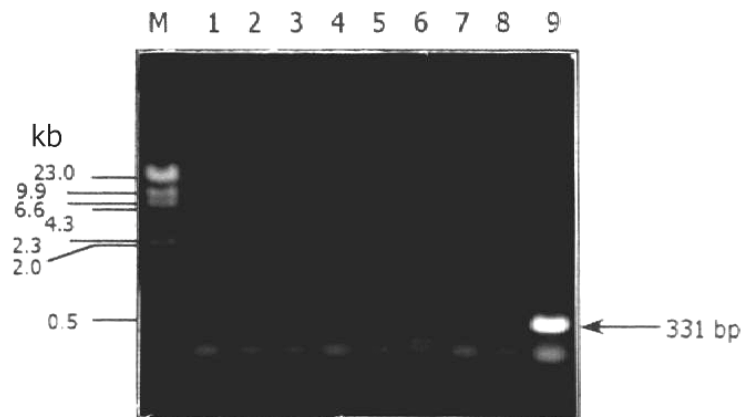
Expected amplicon = 331 bp



รูปที่ 1.8 Representative results of DNA amplicon for detection of DNA of *Leptospira* spp. (various serovars)

Lane M, Molecular size marker

Lanes 1-9, *Leptospira* serovars autumnalis, ballico, ballum, bangkoki, bataviae, bratislava, canicola, celledoni และ djasiman ตามลำดับ



รูปที่ 1.9 Representative results of DNA amplicon by PCR when DNA of bacteria other than *Leptospira* were used as DNA templates

Lane M, Molecular size marker

Lanes 1-9, Genomic DNA of *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Shigella flexneri*, *S. sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *E. coli* and *Leptospira* serovar bataviae (positive control) ตามลำดับ

PCR มี analytical specificity 100% เพราะไม่ amplify DNA ของ แบคทีเรียอื่นๆ ที่ไม่ใช่ *Leptospira*

ตารางที่ 1.21 Comparative results of *Leptospira* antigen detection in urine samples of cattle by MAb-based dot-ELISA and DNA amplification by PCR

Dot-ELISA	PCR		Total
	Positive	Negative	
Positive	21	0	21
Negative	1	23	24
Total	22	23	45

The diagnostic sensitivity of antigen detection by dot-ELISA = 95.45 %

The diagnostic specificity of antigen detection by dot-ELISA = 100 %

The diagnostic efficacy = 97.22 %

The positive predictive value = 100 %

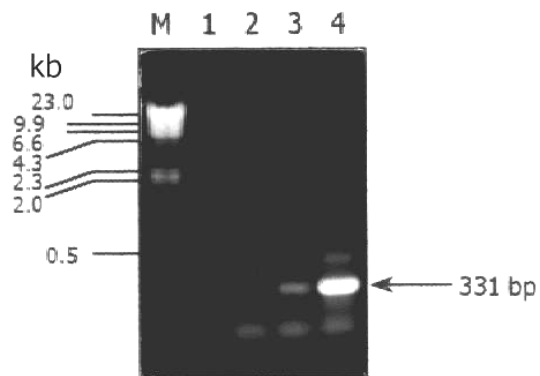
The negative predictive value = 95.83 %

Kappa coefficient = 0.9555

Standard error of *Kappa* = 0.0222

Z = 6.4159

p-value = < 0.0001



รูปที่ 1.10 **Representative results of positive and negative PCR for the detection of *Leptospira* DNA in semen samples of cattle**

Lane M, DNA marker

Lane 1, negative control (*E. coli*)

Lane 2, negative semen sample

Lane 3, positive semen sample

Lane 4, positive control (*Leptospira* serovar bataviae)

References

- Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S. Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1980; 11: 452-7.
- Arimitsu Y, Kmet E, Ananyina Y, Baranton G, Ferguson IR, Smythe L, Terpstra WJ. Evaluation of one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Bull WHO* 1994; 72: 395-9.
- Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospire in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1894-8.
- Banchuin N, Appassakij H, Sarasombath S, Manatsathit S, Rungpitarangsi B, Komolpit P, Sukosol T. Detection of *Salmonella typhi* protein antigen in serum and urine: a value for diagnosis of typhoid fever in an endemic area. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1987; 5: 155-9.
- Chaicumpa W, Srimanote P, Sakolvaree Y, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Eampokalap B, Moolasart P, Nair GB, Echeverria P. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3595-600.
- Chaicumpa W, Thin-inta W, Khusmith S, Tapchaisri P, Echeverria P, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M. Detection with monoclonal antibody of *Salmonella typhi* antigen 9 in specimens from patients. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1824-30.
- Chaicumpa W, Ruangkunaporn Y, Burr D, Chongsa-nguan M, Echeverria P. Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella typhi* antigen in urine. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2513-5.
- Cox CD, Alexander AD, Murphy LC. Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *J Infect Dis* 1957; 101: 201-18.
- Douglin CP, Jordan C, Rock R, Hurley A, Levett PN. Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 78-80.

- Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 720-4.
- Faine S. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1982.
- Farr RW. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 1-8.
- Galton MM, Powers DK, Hall AM, Cornell RG. A rapid microscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *Am J Vet Res* 1958; 19: 505-12.
- Gussenhoven GC, van der Hoorn MAWG, Goris MGA, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, van Ingen CW, Smits HL. Lepto-Dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira* specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 92-7.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. *J Bacteriol* 1967; 94: 27-31.
- Kee SH, Kim IS, Choi MS, Chang WH. Detection of leptospiral DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1035-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Levett PN, Whittington CU. Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 11-4.
- Merien F, Amouriaux PP, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2219-24.
- Masri SA, Nguyen PT, Gale SP, Howard CJ, Jung SC. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J Vet Res* 1997; 61:15-20.
- Milner AR, Jackson KB, Woodruff K, Smart IJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for determining specific immunoglobulin M in infections caused by *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 539-42.

- Pappas MG, Ballou WR, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot-ELISA: comparison with the microscopic agglutination test. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34: 346-54.
- Quang NN, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Cao VV, Doan TT, Sakolvaree Y, Srimanote P, Chaicumpa W. Diagnosis of enteric fever caused by *Salmonella* spp. in Vietnam by a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1997; 15: 205-12.
- Silva MV, Nakamura PM, Carmargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, Brandao AP. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 650-5.
- Smits HL, Eapen CK, Sugathan S, Kuriakose M, Gasem MH, Yersin C, Sasaki D, Pujianto B, Vestering M, Abdoel TH, Gussenhoven GC. Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 166-9.
- Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones WLJ, Fris M. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1975; 2: 218-21.
- Terpstra WJ, Schoone GJ, ter Schegget J. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with ³²P- and biotin-labelled probes. *J Med Microbiol* 1986; 22: 23-8.
- Thiermann AB. Leptospirosis: current development and trends. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 722-5.
- Thiermann AB. Isolation of leptospires in diagnosis of leptospirosis. *Mod Vet Pract* 1984; 65: 758-9.
- Torten M, Shenberg E, van der Horden J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis. *J Infect Dis* 1966; 166: 537-43.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
- Turner LH. Leptospirosis II. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1968; 62: 880-99.

- Van Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, ter Schegget J, Terpstra WJ. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2258-62.
- Watt G, Alquiza LM, Padre LP, Tuazon ML, Laughlin LW. The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infect Dis* 1988; 157: 840-2.
- Winslow WE, Merry DJ, Pirc MC, Devine P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1938-42.
- Zaki SR, Shieh WJ. Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet* 1996; 347: 535-6.

โครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอ็นเทอโรฮีโมราจิกเอสเชอริเชีย โคไล

(Development of diagnostic method for enterohemorrhagic

Escherichia coli infections)

รายละเอียดของงานวิจัยโครงการย่อยที่ 2

การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอนเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล

การวิจัยในส่วนของโครงการย่อยที่สองนี้นอกจากงานที่เสนอไว้แล้ว คณะผู้วิจัยยังได้วิจัยเพิ่มเติมเรื่อง genotypes และ phenotypes ของ Shiga toxin producing *E. coli* ใน reservoir hosts คือ วัว ควาย อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

I. การพัฒนาวีธีวินิจฉัยโรคติดเชื้อเอนเทอโรฮีโมราจิกเอชเชอริเชียโคไล หรือ อีโคไลที่ผลิต ชิกาท็อกซิน

1. การเตรียม homogenates หรือ lysate (Ly) จากแบคทีเรียต่าง ๆ (ตารางที่ 2.1)

นำแบคทีเรียจาก stock cultures มา streak ลงบน trypticase soy agar (TSA) plate แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ตัด colonies (2-3 colonies) จาก overnight plate ใส่ลงใน 50 ml trypticase soy broth (TSB) ใน flask ขนาด 150 มล. นำ flask ไป incubate ที่ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำ culture ไปปั่นที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำ bacterial pellet ไป suspend ใน deionized distilled water ให้ได้ optical density เป็น 2.0 ที่ 540 nm นำไป sonicate ที่ 20 kHz เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง แบ่ง เป็น aliquots เล็กๆ แล้วเก็บไว้ที่ -20°C

2. การเตรียม lipopolysaccharide (LPS) จาก *E. coli* serogroup O157

ผู้วิจัยได้รับ *E. coli* O157 ซึ่งเป็น clinical isolate มาจากประเทศญี่ปุ่น ในการเตรียม LPS ได้นำแบคทีเรียจาก stock culture มา plate ลงบน TSA เช่นเดียวกับการเตรียม whole cell lysate แล้ว pick growing colonies จาก plate ไป inoculate ลงใน TSB, incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำแบคทีเรียใน TSB ไป inoculate ลงใน Roux bottles ที่มี agar slants เตรียมจาก TSA 250 มล. ขวดละ 3 มล. เอียงขวดไปมาเพื่อให้ inoculum ครอบคลุมทั่วพื้นผิวของ agar slant แล้ว incubate ขวดทั้งหมดที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรวบรวม bacteria ที่เจริญบนพื้นผิวของ agar slants โดยใช้ลูกแก้ว (glass beads) และ sterile normal saline solution (NSS) กลิ้งไปมาให้แบคทีเรียหลุดออกจากผิวของ agar slants แล้วดูดออกมาปั่นล้าง bacteria ด้วย NSS ด้วยความเร็ว $10,000 \times g$ ที่ 4°C, 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที นำ bacterial pellet จากการปั่นล้างครั้งสุดท้าย ไป suspend ใน NSS โดยคำนวณให้ได้ bacterial weight 10-20 mg/ml. ผสม 90% phenol ปริมาตรเท่ากันลงใน bacterial suspension นำของผสมไปอุ่นที่ 65-68°C ในขณะเดียวกันให้กวนอย่างแรงและสม่ำเสมอเป็นเวลา 20-30 นาที ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บไว้ให้เย็นที่ 4°C ก่อนนำไปปั่นที่ $5,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้แยกเป็นชั้น ๆ ใช้ serological pipettes ดูดแยกชั้นน้ำ (aqueous phase) ซึ่งเป็นชั้นบน เก็บรวมไว้ (ต้องระมัดระวังไม่ให้ดูดชั้นกลางซึ่งเป็นชั้น nucleic acid หรือชั้นล่างซึ่งเป็น protein

ปนมา) นำชั้น aqueous phase ที่เก็บมาได้มาวัดปริมาตรแล้วผสมกับ absolute ethanol ปริมาณเท่ากันที่แช่เย็นไว้ที่ 4°C ใช้ใยแก้วซึ่งซอมนกันหลายๆ ชั้น กรองตะกอนขาว ๆ ที่เกิดขึ้น ออกเก็บส่วนที่เป็นน้ำมาผสมกับ absolute ethanol อีก 4 ปริมาตร เก็บ preparation ไว้ที่ 4°C ค้างคืนแล้วนำไปปั่นที่ $5,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายน้ำ ปริมาตรน้อยๆ dialyse ในน้ำเกลือกำจัดแอลกอฮอล์ออกให้หมดจะได้ crude LPS หรือเรียกว่า เป็น first extracted LPS แล้วนำไปสกัดด้วยฟีนอลซ้ำอีกครั้งจนได้ second extracted LPS นำ preparation ไปปั่นที่ $100,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ pellet ที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรน้อย ๆ ให้เป็น homogeneous solution นำไปหา dry weight แล้วแบ่งเก็บเป็น aliquots เล็กๆ (pure LPS) รูปที่ 2.1 แสดง SDS-PAGE-separated *E. coli*: O157 Ly และ LPS ที่ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue (รูปที่ 2.1, Block I) และ Silver stain (รูปที่ 2.1, Block II)

3. การจัดหาและการเตรียม Toxins ต่าง ๆ

3.1 Cholera toxin (CT) ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company, USA

3.2 Heat-labile enterotoxin (LT) จากเชื้อ enterotoxigenic *E. coli* เตรียมจาก recombinant clone ที่มี *hlt* gene ซึ่งได้รับความกรุณาจาก Professor Dr. Hisao Kurazono, Head, Department of Medical Technology, Institute of Health Sciences, University of Okayama, Japan ผู้ซึ่งเป็น collaborator โดยขั้นตอนในการเตรียม LT ได้ปฏิบัติตามวิธีของ Clements and Finkelstein (1978) และ Uesaka *et al.* (1994) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้

นำ recombinant bacteria มา grow ใน LB broth ซึ่งมี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml ที่ 37°C ใน shaking incubator เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ culture มาปั่นที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อ collect bacterial cells นำ bacterial pellet ที่ได้มา suspend ใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งมี NaCl ผสมอยู่ 0.9% จากนั้นทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกโดย sonication ที่ 20 kHz 2 นาที 5 ครั้ง หลังจากกำจัด cell debris ออกไปโดยการปั่นดังกล่าวข้างต้นอีกครั้งหนึ่งแล้วจึงนำ supernatant ซึ่งเป็น lysate จากเซลล์มา precipitate ด้วย 65% ammonium sulphate คือใส่ผง ammonium sulphate 398 กรัม/supernatant 1 ลิตร ตะกอนที่ได้จะเป็น crude LT นำไปละลายใน TEAN buffer แล้ว dialyse ใน buffer เดียวกันนี้ที่ 4°C ค้างคืน แล้ววัดค่า protein content (Bradford, 1976) ในขั้นตอนสุดท้ายนำ crude LT ไปผ่าน immobilized galactose column โดยซื้อ resin ชนิดนี้มาจากบริษัท Pierce Co. เมือง Rockford, USA โดย pack ใน glass column ขนาด 1.5×10.0 ซม. หลังจาก equilibrate column ด้วย TEAN buffer นำ crude LT มาผ่านลงไปซึ่ง LT จะจับกับ galactose ใน column ส่วนที่ไม่จับกับ galactose จะถูกล้างออกไปให้หมดด้วย TEAN buffer แล้วจึง elute bound LT ออกจาก column โดยใช้ 0.5 M galactose ใน TEAN buffer เก็บ eluates เป็น fractions เล็กๆ fraction ละ 1 มล. นำไปอ่าน optical density (OD) ที่ 280 nm หลังจากนั้นจึง pool รวม

fractions ที่มี optical density เข้าด้วยกันจะเป็น pool ของ pure LT นำไป concentrate โดยปั่นใน Centriprep-30 แล้ววัดค่า protein content (Bradford, 1976) รูปที่ 2.2 แสดง SDS-PAGE separated pure LT ที่ย้อมด้วยสี Coomassie brilliant blue จะเห็นว่าประกอบด้วย A และ B subunits ณ ตำแหน่ง 32.2 kDa (A subunits) และ 11.8 kDa (B subunits) แบ่งเก็บ pure LT เป็น aliquots เล็ก ๆ ไว้ที่ -20°C ซึ่งต่อมาใช้เป็น heterologous toxin เพื่อตรวจสอบ specificities ของ monoclonal antibodies ต่อ O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2

3.3. Purification of Stx-1 และ Stx-2

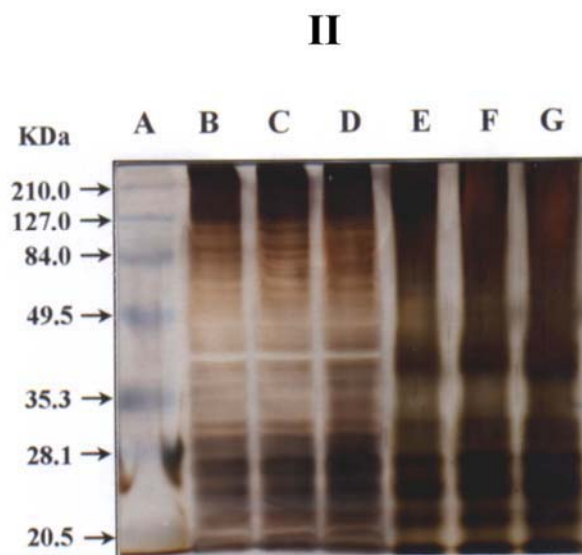
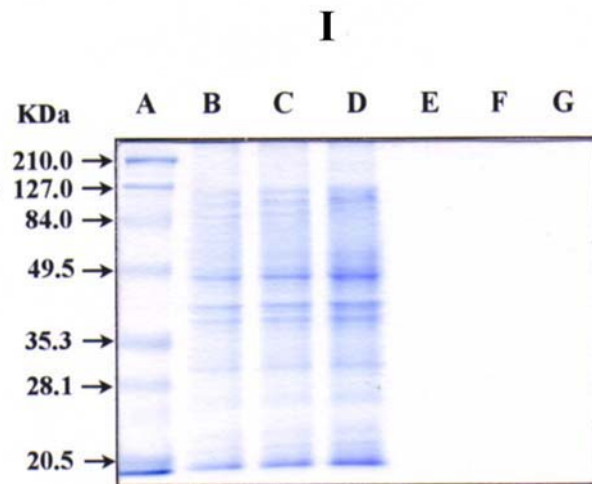
Source ของ Stx-1 คือ recombinant *E. coli* M1061 ซึ่ง carry 2.1 kb *Bam*H1-*Bgl*II fragment ของ *stx-1* ที่ ligate อยู่กับ vector pUC118 โดยได้รับมาจาก Professor Hisao Kurazono (Kurazono *et al.*, 1987), Professor and Head, Department of Medical Technology, Institute of Health Sciences, University of Okayama, Japan ส่วน source ของ Stx-2 คือ recombinant *E. coli* M1061 ซึ่ง carry 4.6 kb *Eco*RI fragment ของ *stx-2* ซึ่ง ligate อยู่กับ pCH253 vector (Yutsudo *et al.*, 1987a) การ purify Stx-1 ใช้วิธีของ Kurazono *et al.* (1987) และการ purify Stx-2 ใช้วิธีของ Yutsudo *et al.* (1987b) โดยดัดแปลงเล็กน้อย รายละเอียดของการเตรียมมีดังนี้:-

นำแบคทีเรียที่ carry *stx-1* ไป grow ใน Luria-Bertani (LB) broth ซึ่งผสม Ampicillin อยู่ 100 $\mu\text{g/ml}$ โดย incubate 37°C shaking incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียซึ่ง carry *stx-2* gene นำไป grow ใน Mueller-Hinton broth ซึ่งมี Trimethoprim ผสมอยู่ 10 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำ cultures ไปปั่นเพื่อ pack bacterial cells ที่ $5,000 \times g$, 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ pellet ไป resuspend ใน phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 ที่ผสม Polymyxin B ไว้ 6,000 units/ml นำ bacterial cells ไปทำให้แตกโดย sonication ที่ 20 kHz 2 นาที 5 ครั้ง หลังจากนั้นเอา cell debris ออกแล้ว นำ supernatant ไป precipitate ด้วย 80% ammonium sulphate (516 g/l) ตะกอน precipitate ที่ได้นำไปละลายใน 50 mM Tris-HCl, pH 8.6 แล้ว dialyse ใน buffer เดียวกันนี้ที่ 4°C ค้างคืน preparation นี้เรียกว่า crude toxin ซึ่งจะนำไป purify ต่อด้วย DEAE-fast flow chromatography (column size 2.0×45.0 cm) ซึ่ง equilibrate ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 8.6 ไว้แล้ว หลังจาก apply crude toxin แล้วล้าง column ด้วย buffer เดิมแล้ว elute protein ออกมาโดยใช้ 0-0.5 M NaCl ใน Tris-HCl buffer, pH 8.6 เก็บ fraction ละ 10 ml แล้วตรวจ OD ของทุก fraction ที่ 280 nm จากนั้นตรวจว่า fraction ใดมี toxin โดยนำไปทดสอบด้วยวิธี double diffusion โดยการดูปฏิกิริยาของ precipitation ของ fraction กับ rabbit polyclonal antibodies ต่อ Stx-1 หรือ Stx-2 (Yutsudo *et al.*, 1987b) พบว่า fractions ที่มี toxin (ให้ precipitin bands ต่อ anti-toxin) ถูก elute ออกมาในช่วงระหว่าง 0.12 - 0.24 M (NaCl) (รูปที่ 2.3) นำ fractions ที่มี toxin มา pool รวมกัน นำแต่ละ pool ไป concentrate ด้วย Amicon PM10 membrane ultrafiltration และ Centriprep-30

ตารางที่ 2.1 List of heterologous antigens used for testing cross-reactivity of MAbs to EHEC O157 LPS, Stx-1 and Stx-2

No.	Strain/ Antigen	No.	Strain/ Antigen
1	<i>Shigella flexneri</i> 1a	46	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
2	<i>S. flexneri</i> 1b	47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	<i>S. flexneri</i> 2a	48	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	<i>S. flexneri</i> 2b	49	<i>Escherichia coli</i> (K12)
5	<i>S. flexneri</i> 3a	50	<i>E. coli</i> O86
6	<i>S. flexneri</i> 3b	51	<i>E. coli</i> O125
7	<i>S. flexneri</i> 4a	52	<i>E. coli</i> O126
8	<i>S. flexneri</i> 4b	53	<i>E. coli</i> 49/32
9	<i>S. flexneri</i> 6	54	EIEC 54/32
10	<i>S. flexneri</i> x	55	EHEC (VT1)
11	<i>S. flexneri</i> y	56	EHEC (VT2)
12	<i>S. dysenteriae</i> 1	57	EHEC (VT2vh)
13	<i>S. dysenteriae</i> 2	58	EHEC (VT2vp)
14	LPS of <i>S. dysenteriae</i> 1	59	EHEC (MC1061)
15	<i>S. boydii</i> 1	60	EHEC (VT2, K243)
16	<i>S. boydii</i> 2	61	EHEC (SLT I, CG-94-2017-1)
17	<i>S. boydii</i> 4	62	EHEC (SLT I, SPH-1624-1)
18	<i>S. boydii</i> 12	63	EHEC (SLT I, II, CP-32-1)
19	<i>S. sonnei</i> phase I	64	EHEC O111ac:H40 (V-474-2)
20	<i>S. sonnei</i> phase II	65	EHEC O111ac:H40 (V-826-2)
21	LPS of <i>S. sonnei</i> phase I	66	ETEC (SPH-2389-1)
22	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	67	ETEC (SPH-2436-1)
23	<i>S. Paratyphi</i> C	68	ETEC (CJ-612-6)
24	<i>Salmonella</i> group C	69	<i>E. coli</i> (LT, ST, CJ-1270-1)
25	<i>Salmonella</i> group E	70	<i>E. coli</i> (ST, CAM-10-1)
26	<i>S. Typhi</i>	71	<i>E. coli</i> (LT, CJ-1417-1)
27	<i>S. Typhimurium</i>	72	<i>E. coli</i> (LT, CP-10-1)
28	<i>S. Panama</i>	73	EAggEC (W 177-1-1)
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	74	EPEC (W 393-1-1)
30	<i>Enterobacter aerogenes</i>	75	EPEC (W 225-1-2)
31	<i>E. cloacae</i>	76	EPEC (467-1-1)
32	<i>Citrobacter diversus</i>	77	EPEC (215-1-1)
33	<i>C. freundii</i>	78	EPEC (412-1-1)
34	<i>Serratia marcescens</i>	79	DAEC (WC 407-1-4)
35	<i>Proteus rettgerii</i>	80	DMS 1 (<i>S. sonnei</i> phase I)
36	<i>P. vulgaris</i>	81	DMS 2 (<i>S. flexneri</i> 2a)
37	<i>Morganella morganii</i>	82	DMS 3 (untyped)
38	<i>Vibrio fluvialis</i>	83	DMS 4 (<i>S. sonnei</i> phase I)
39	<i>V. alginolyticus</i>	84	DMS 5 (<i>S. flexneri</i> 6)
40	<i>V. cholerae</i> Inaba	85	DMS 6 (<i>S. flexneri</i> 6)
41	<i>V. cholerae</i> Ogawa	86	DMS 8 (untyped)
42	<i>V. cholerae</i> non-O1	87	DMS 10 (<i>S. flexneri</i> 2a)
43	<i>V. cholerae</i> 215/35	88	DMS 11 (<i>S. boydii</i> 5)
44	<i>V. cholerae</i> 287/35	89	Cholera toxin (CT)
45	<i>V. cholerae</i> 536/35	90	Heat-labile enterotoxin (LT)

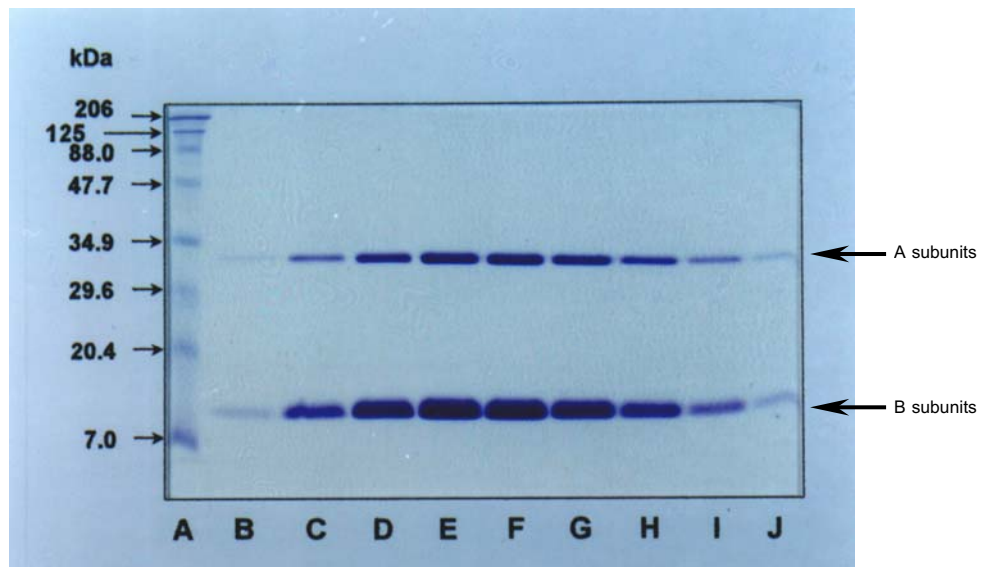
CT, cholera toxin; DAEC, diffusely adherent *E. coli*; DMS, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand; EAggEC, enteroaggregative *E. coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; EIEC, enteroinvasive *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; LT, heat-labile enterotoxin of ETEC; ST, heat-stable enterotoxin of ETEC; SLT, Shiga-like toxin or VT,



รูปที่ 2.1 แสดง patterns ของ SDS-PAGE-separated homogenate (lanes B, C และ D) และ LPS (lanes E, F และ G) ของ *E. coli* O157

Block I ย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue

Block II ย้อมด้วย Silver stain



รูปที่ 2.2 แสดง SDS-PAGE-separated pure LT ของ enterotoxigenic *E. coli* ที่ elute ออกมาจาก immobilized galactose-resin column

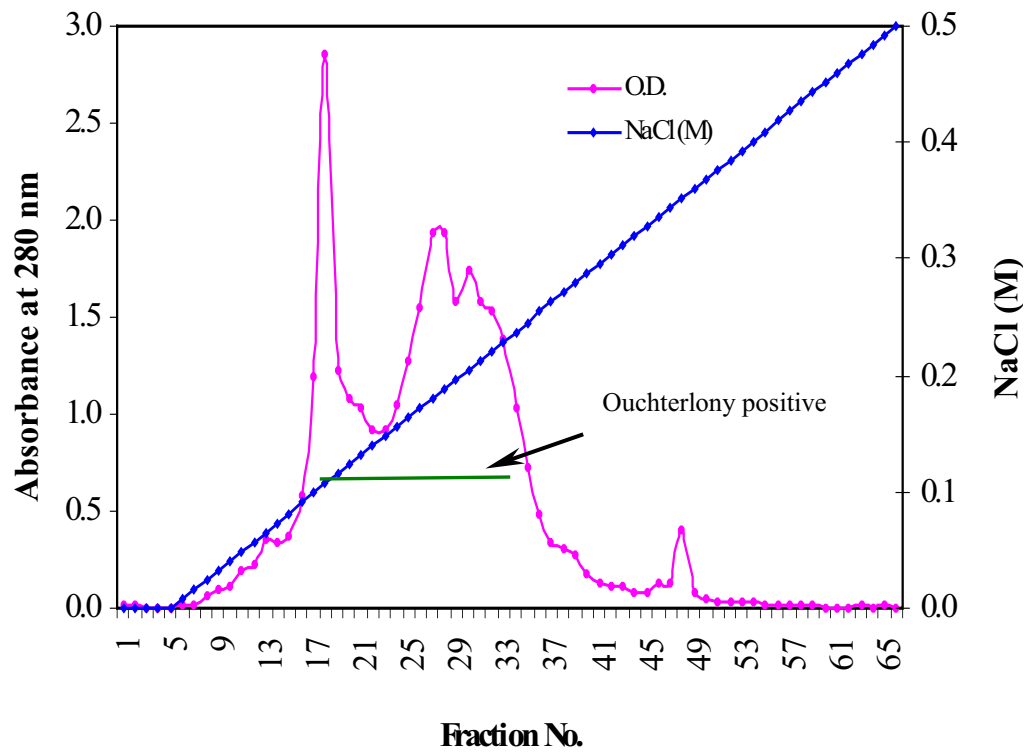
Lanes B-J: SDS-PAGE-separated patterns of fractions eluted from the galactose-resin column

A subunits at 32.2 kDa

B subunits at 11.8 kDa

Lane A, broad range molecular weight markers

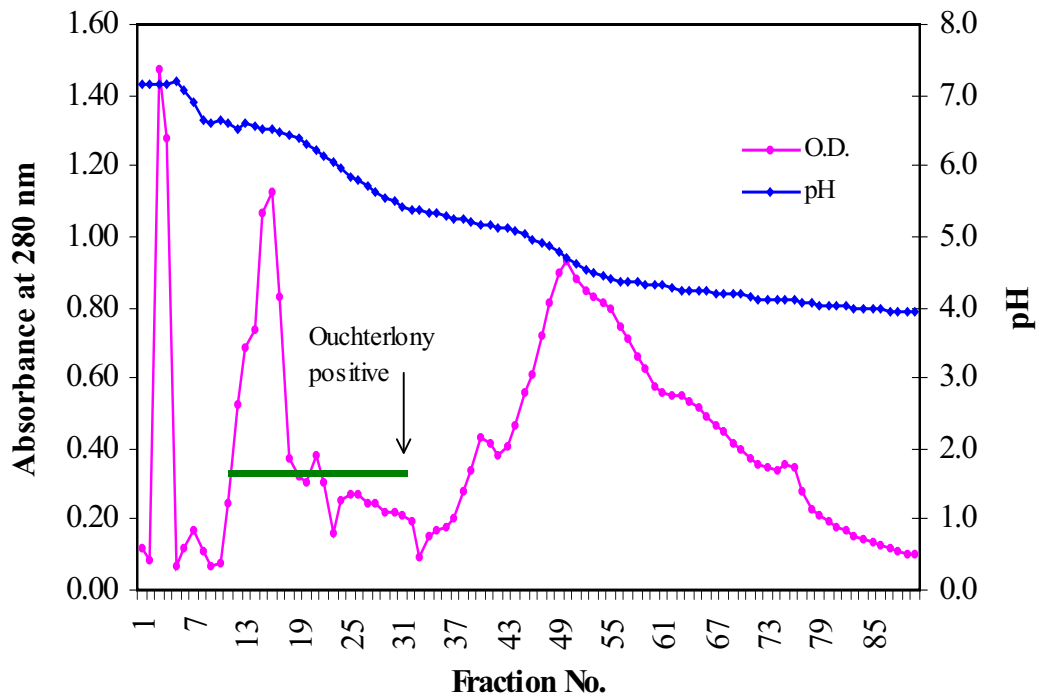
Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.3 Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก DEAE fast flow column

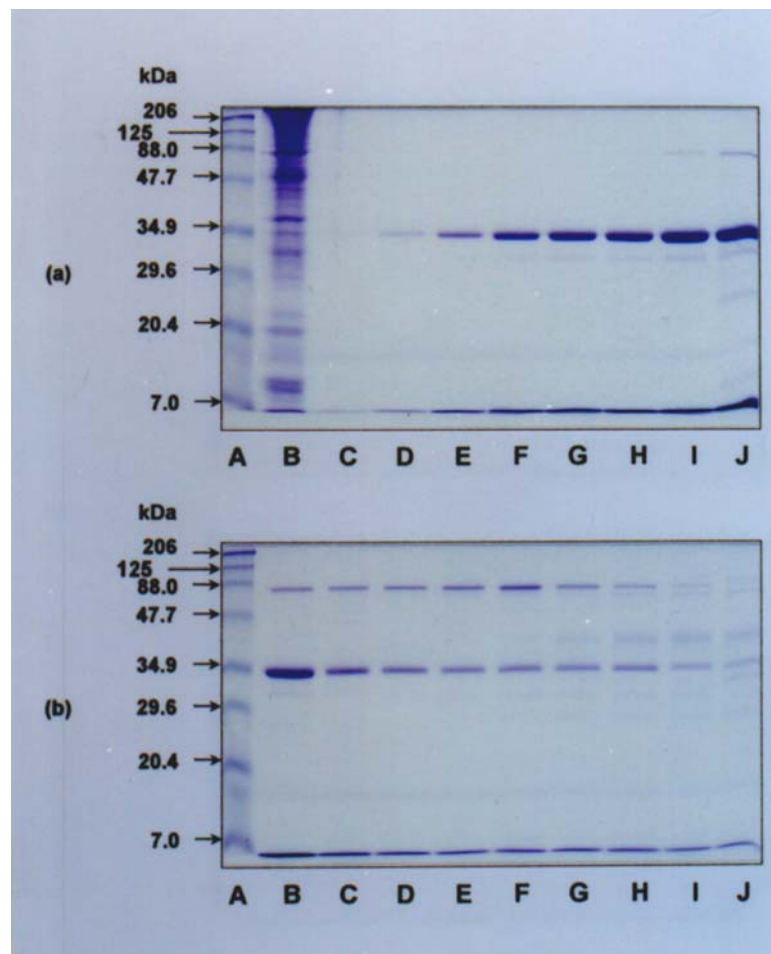
Bar สีเขียว (ลูกศรชี้) แสดง fractions ที่มี Stx-1 จากการตรวจสอบด้วย double diffusion test ต่อ rabbit anti-Stx-1 จะเห็นว่า Stx-1 ถูก elute ออกมาในช่วง 0.12-0.24 M NaCl

(Amicon, Beverly, MA, USA) เมื่อ concentrate แล้ว preparation ที่ได้ (3 ml) เรียกว่า Stx-IEC นำไป dialyse ใน 25 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.4 และนำไป apply ใน polybuffer exchanger PBE 94 column (1.0 × 45.0 cm) (บริษัท Pharmacia Fine Chemical, Sweden) ซึ่ง equilibrate ไว้ด้วย imidazole buffer แล้ว elute protein ออกมาด้วย gradient pH 7.0 ถึง 4.0 โดยใช้ polybuffer 74, pH 4.0 (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) นำแต่ละ fraction (fraction ของ Stx-CF) ไปตรวจหา toxin โดยวิธีดังกล่าวข้างต้น พบว่าพบ Stx positive fractions ถูก elute ออกมาในช่วง pH 5.5 ถึง 6.6 (รูปที่ 2.4) นำ toxin positive fractions ไปตรวจสอบโดยการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant blue เพื่อ identify toxin bands (A subunits ของ Stx-1 และ Stx-2 จะอยู่ตรงตำแหน่ง 33.5 และ 33.7 kDa ตามลำดับ ส่วน B subunits ของ Stx-1 และ Stx-2 จะอยู่ตรงตำแหน่ง 6.6 และ 6.5 kDa ตามลำดับ) (Takeda *et al.*, 1993) พบว่าบาง fractions มีมากกว่า 2 bands (รูปที่ 2.5) ดู fractions ที่มี toxin โดยการตรวจด้วย double diffusion และในการแยกด้วย SDS-PAGE และการย้อมสีปรากฏ bands ตรงตำแหน่ง A subunits และ B subunits ถูกต้องและให้ SDS-PAGE pattern แบบเดียวกัน มารวมเข้าด้วยกัน แล้ว dialyse ใน buffer ที่เหมาะสมโดยใช้ 50 mM PBS, pH 6.0 ที่มี 0.2 M NaCl สำหรับ Stx-1 และใช้ 50 mM PBS, pH 8.0 สำหรับ Stx-2 หลังจาก dialyse แล้วนำไป concentrate โดยใช้ Centriprep-30 เมื่อนำแต่ละ pool ไปแยกด้วย SDS-PAGE แล้วย้อมสีอีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 2.6 แสดง SDS-PAGE patterns ของ Stx-CF pools) จะเห็นได้ว่า pools ของ fractions 10 และ 11 (lane B) และ pool ของ fractions 12-14 (lane C) ให้ bands 2 bands ตรงกับตำแหน่ง Stx-1A และ Stx-1B ดังนั้น 2 pools นี้จึงเป็น pure Stx-1 ส่วน pools อื่น (pools ของ fractions 15 และ 17, fraction 16, pools ของ fractions 18-19, 20-21 และ 22-24 [lanes D, E, F, G และ H]) มี bands มากกว่า 2 bands (partially purified Stx-1) นำ pools ของ fractions 15 และ 17, fraction 16, pools ของ fractions 18 และ 19, 20 และ 21, และ 22-24 ไป concentrate และหาปริมาณโปรตีนเรียก preparation ส่วนนี้ว่า “Stx-CF” ซึ่งต้องนำไป purify ต่อด้วยวิธี gel filtration โดยใช้ fast protein liquid chromatography (FPLC) (Pharmacia Fine Chemical, Sweden) ทั้งนี้โดยใช้ Superose-6HR 10/30 prepacked column เป็นขั้นตอนสุดท้าย รูปที่ 2.7 แสดง chromatogram ของ Stx-1-CF pools ต่าง ๆ จาก chromatofocusing column จะเห็นว่า Stx-CF pool ใดที่เป็น partially purified toxin ก็จะทำให้ chromatogram มากกว่า 1 peak ส่วน Stx-CF pool ที่มี pure toxin อยู่แล้ว เช่น pool 12-14 ก็จะมี peak เดียวใน chromatogram ในการ purify Stx ในขั้นตอนสุดท้ายด้วย Superose-6HR FPLC นั้น นำ Stx-CF ที่มี protein range 3-5 mg ปริมาตร 150 µl และกรองแล้วมา inject ผ่าน sample loop ของ column หลังจากนั้น elute ด้วย equilibrate buffer (50 mM PBS, pH 6.0 containing 0.2 M NaCl สำหรับ Stx-1; Tris-HCl, pH 8.0 สำหรับ Stx-2) โดยใช้ flow rate 0.4 มล/นาที/หลอด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยปล่อยให้ eluent ที่ผ่านออกมาจาก column ให้ detect OD ได้ด้วย UV-1, 280 nm 0.2 AUFS แล้วเก็บด้วย fraction collector (Frac 100, Pharmacia Fine Chemical, Sweden) วัด OD ของแต่ละ



รูปที่ 2.4 Chromatogram ของ Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column (fraction volume 5 ml)

เส้นทึบ (ลูกศรชี้) แสดง fractions ที่มี toxin จากการตรวจด้วย gel double diffusion test ต่อ rabbit anti-Stx-1 ซึ่งถูก elute ออกมาในช่วง pH 5.5 ถึง 6.6



รูปที่ 2.5 SDS-PAGE patterns ของ fractions ที่มี Stx-1 ที่ elute ออกมาจาก chromatofocusing column

Lanes A of (a) and (b) are molecular weight markers

(a) Lane B, SDS-PAGE-separated crude Stx-1

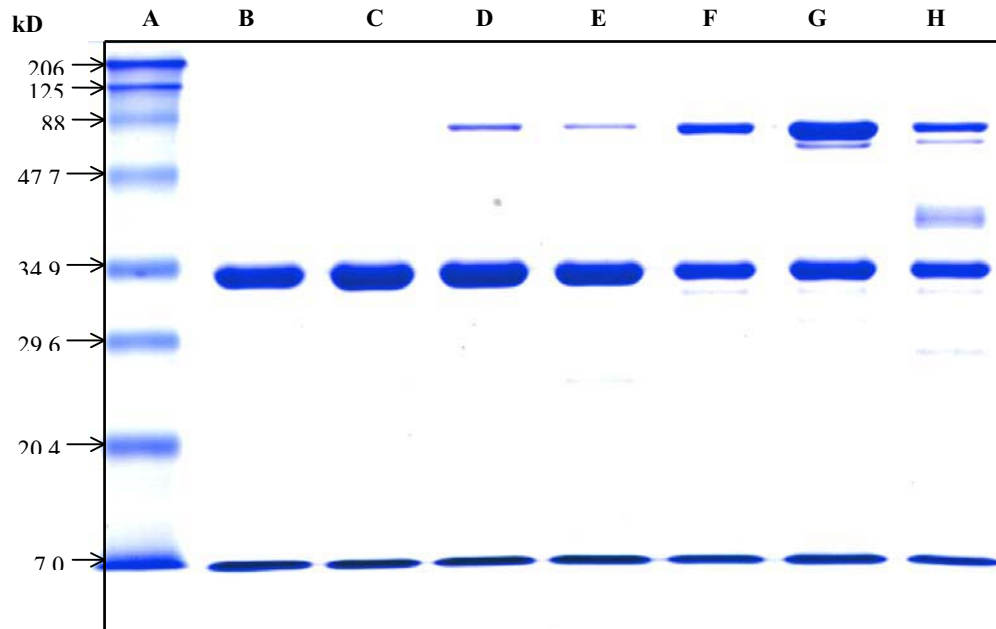
Lanes C-J, patterns ของ fractions 8-15

(b) Lanes B-J, patterns ของ fractions 16-24

A subunits at 33.7 kDa

B subunits at 6.6 kDa

Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.6 แสดง SDS-PAGE patterns ของ concentrated pools ต่าง ๆ จากรูปที่ 2.4 และ 2.5 คือ

Lane B, pool ของ fractions 10 และ 11 (pure Stx-1)

Lane C, pool ของ fractions 10 – 14 (pure Stx-1)

Lane D, pool ของ fractions 15 และ 17 (partially purified Stx-1)

Lane E, fraction 16 (partially purified Stx-1)

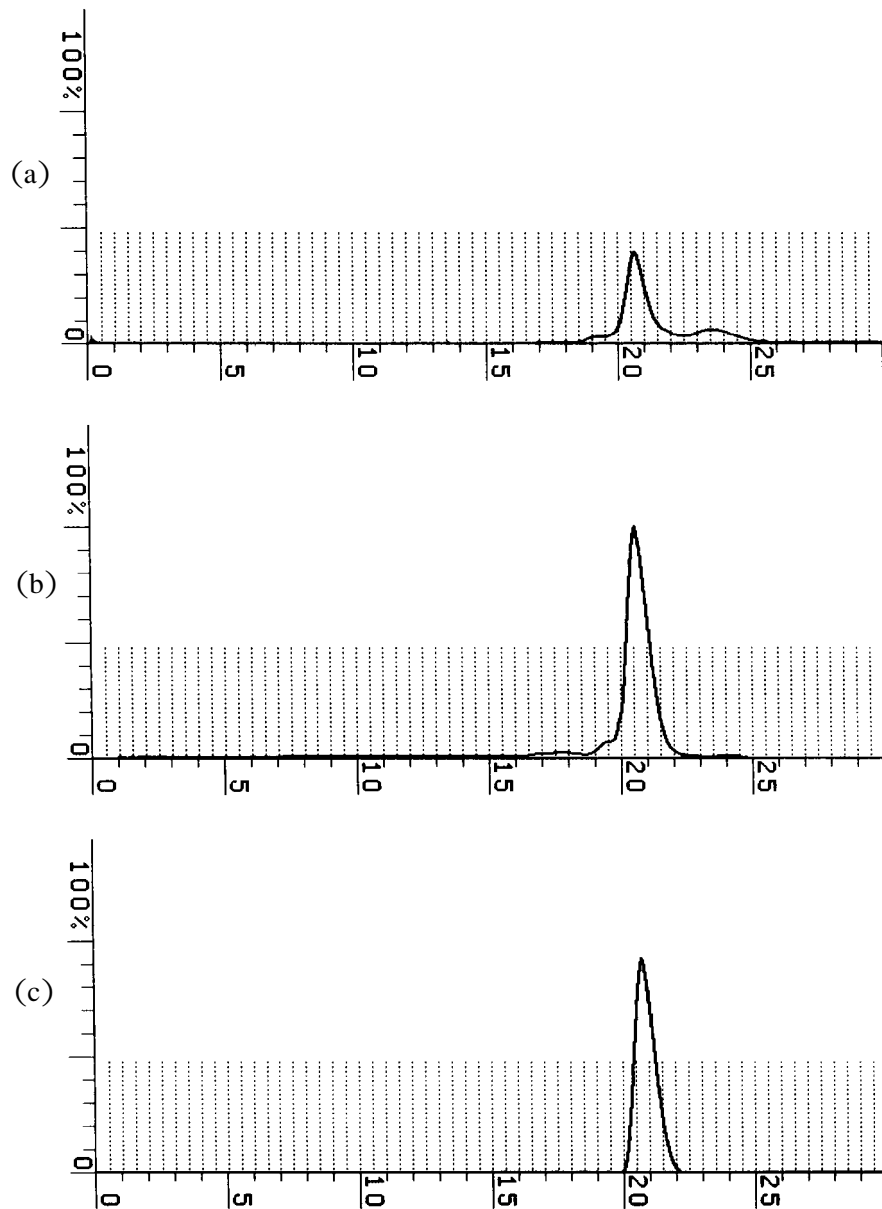
Lane F, pool ของ fractions 18-19 (partially purified Stx-1)

Lane G, pool ของ fractions 20-21 (partially purified Stx-1)

Lane H, pool ของ fractions 22-24 (partially purified Stx-1)

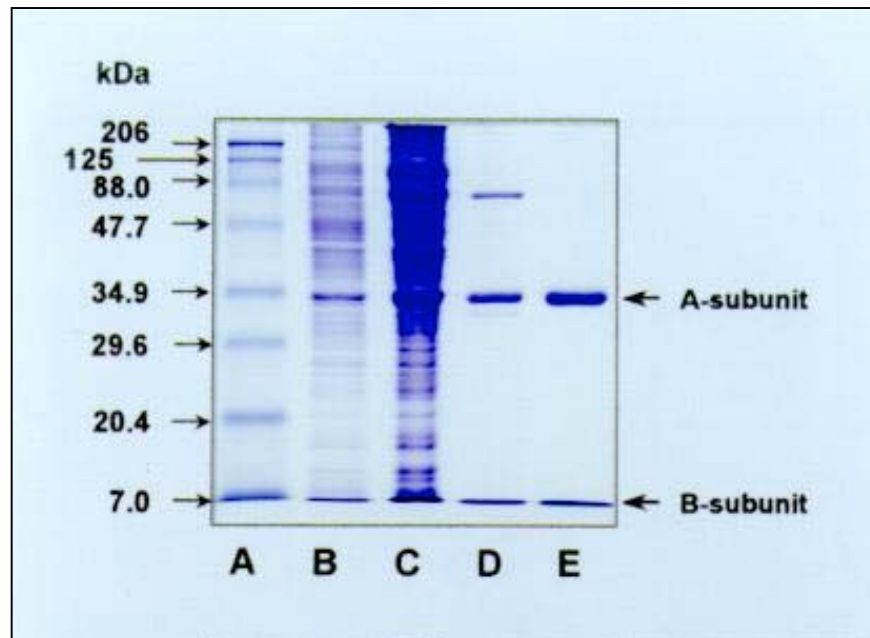
Lane A, molecular weight standard markers

Numbers at the left are molecular weights in kDa



รูปที่ 2.7 แสดง FPLC chromatograms ของ Stx-1-CF fractions ต่าง ๆ

- (a) pool ของ fractions 22-24 (lane H รูปที่ 2.6) ซึ่งเป็น partially purified Stx-1 มีหลาย peaks ใน chromatogram
- (b) fraction 16 (lane E รูปที่ 2.6) = partially purified Stx-1 มีหลาย peaks ใน chromatogram
- (c) pool ของ fractions 12-14 (lane C รูปที่ 2.6 = pure Stx-1) มี peak เดียวใน chromatogram



รูปที่ 2.8 แสดง SDS-PAGE (non-reducing condition) patterns ของ Stx-1 preparations ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการ purify

Lane A, molecular weight standard markers

Lane B, crude Stx-1 หลังจาก ammonium sulphate precipitation

Lane C, Stx-1 preparation จาก DEAE-Sepharose column

Lane D, partially purified Stx-1 จาก chromatofocusing column

Lane E, pure Stx-1 จาก chromatofocusing column ซึ่งเหมือนกับ pure Stx-1 จาก FPLC column

fraction แล้วพิมพ์ chromatogram ออกมา หลังจากนั้นนำแต่ละ fraction ที่ show appropriate peak ใน chromatogram ไปทดสอบกับ rabbit polyclonal antibodies ต่อ Stx แต่ละชนิด และเพื่อเป็นการยืนยันว่า preparation สุดท้ายนี้เป็น pure Stx จึงได้นำแต่ละ preparation ไป run ใน SDS-PAGE ใน non-reducing condition แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant blue รูปที่ 2.8 แสดงให้เห็นถึง SDS-PAGE-separated patterns ของ Stx-1 ในขั้นตอนต่าง ๆ ของการ purify

3.4 การเตรียม Stx-2 toxoid

เนื่องจาก Stx-2 มีความเป็นพิษต่อหนู mice มาก ถ้าจะใช้ immunize หนู mice โดยตรงจะทำให้หนู mice ตายเพราะ toxic/lethal dose มีปริมาณต่ำมากเมื่อเทียบกับ immunogenic dose ดังนั้น ในการ immunize หนู BALB/c เพื่อเตรียม immune splenocytes สำหรับการผลิต hybridomas จึงมีความจำเป็นต้อง detoxify Stx-2 เพื่อให้เป็น toxoid เพื่อลดความเป็นพิษแต่ยังคงความเป็น immunigen เสียก่อน การเตรียม immunogenic Stx-2 toxoid ทำได้โดยการนำ Stx-2-IEC มาเจือจางเป็น 0.5 mg/ml ใน 10 mM PBS, pH 7.4 และ dialyse against 0.4% formalin ใน PBS ที่ 37°C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้น dialyse กำจัดเอา trace ของ formalin ออกให้หมดโดย dialyse ใน PBS ที่ 4°C ค้างคืนโดยเปลี่ยน buffer หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นตรวจว่า Stx-2 toxoid ยังมี toxicity ต่อ Vero cells อยู่หรือไม่ โดยเติม toxoid ลงใน Vero cell culture และจะใช้ toxoid ในการ immunize BALB/c ต่อเมื่อ preparation นั้นไม่เป็นพิษต่อ Vero cells

4. การ immunize หนู BALB/c เพื่อให้ได้ immune splenocytes

ได้ immunize หนู BALB/c เพศเมีย อายุ 5-7 สัปดาห์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), US Component กรุงเทพฯ 3 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดยก่อน immunize ได้เจาะเลือดหนูแต่ละตัวเพื่อเก็บไว้เป็น normal control serum (NS) หนูกลุ่มแรก immunize ด้วย O157 Ly ส่วนกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 immunize ด้วย holo Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid ตามลำดับ แอนติเจนใน dose แรก ผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal; I/P) หลังจากนั้นฉีด booster doses อีก 2 ครั้ง ทุกๆ สองสัปดาห์แต่ผสม immunogens เดิมใน incomplete Freund's adjuvant ปริมาณ immunogens ใน dose แรกคือ O157 Ly 50 µg, Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid ปริมาณ 2 µg ส่วนใน booster doses เพิ่ม O157 Ly เป็น 70 และ 100 µg ตามลำดับ ส่วน Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid เพิ่มเป็นอย่างละ 5 µg หลังจากฉีด dose ที่ 3 แล้วสองสัปดาห์ เจาะเลือดหนูทุกตัวเพื่อนำมาตรวจ indirect ELISA titers ต่อ homologous antigens และตรวจ antibody patterns ต่อ SDS-PAGE-separated homologous antigens ด้วย Western blotting (WB) เมื่อพบว่าซีรัมของ immunized mice มี ELISA titers สูงและให้ WB

patterns ต่อ homologous antigens เหมาะสม จึงนำ spleens ของหนูตัวที่มี titers สูงสุดไปใช้เป็น immune splenocytes สำหรับเตรียม hybridomas ต่อไป

5. Cell hybridization (fusion) เพื่อเตรียม hybridomas และ monoclonal antibodies (MAb)

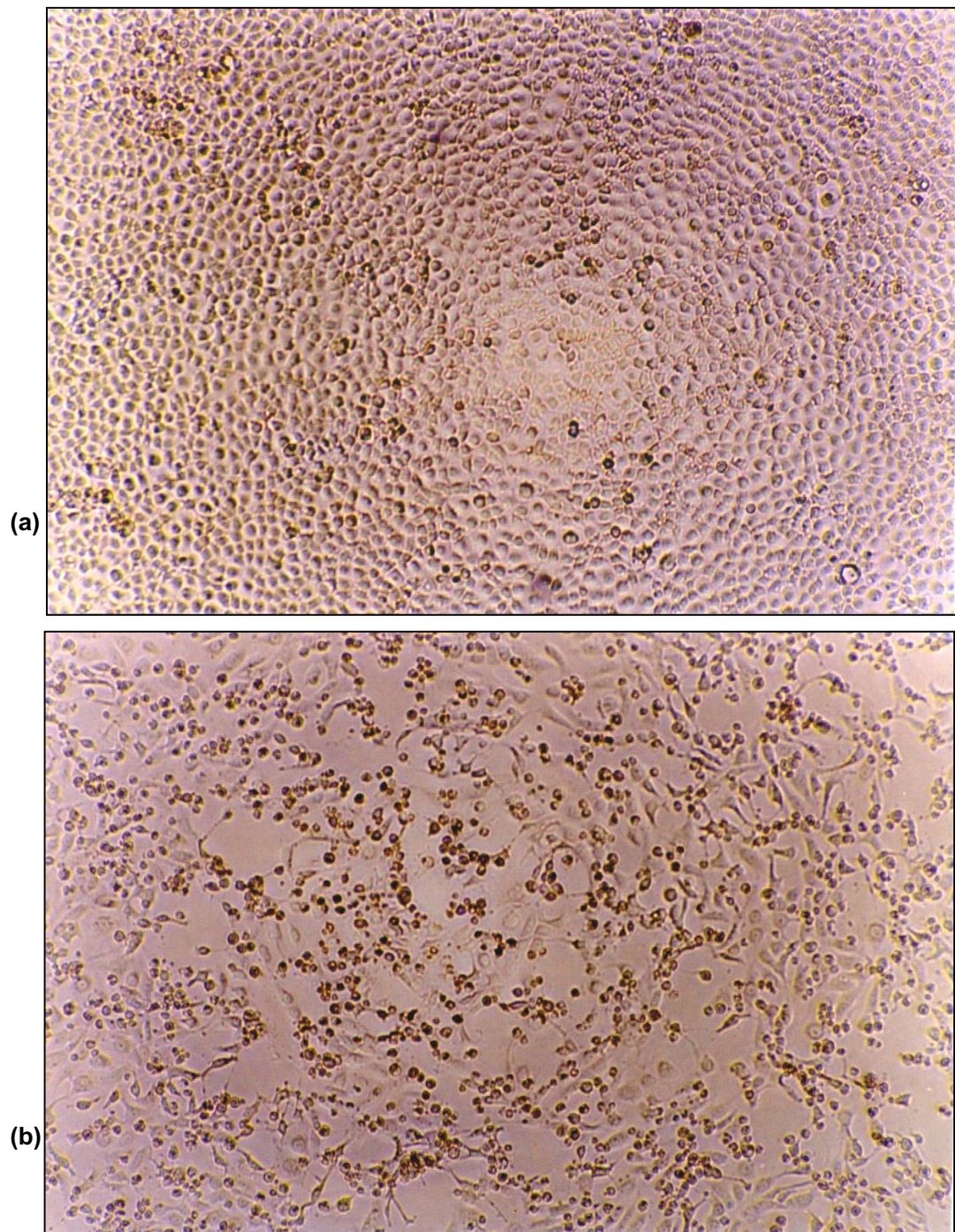
Immunized mice ในแต่ละกลุ่มซึ่งมี serum indirect ELISA titer สูงสุด และให้ WB patterns ต่อ homologous antigens เหมาะสม (คือ ซีรัมหนูที่ immunized ด้วย O157 Ly มี reactive bands ต่อโปรตีนต่าง ๆ เห็นเป็น bands เดียวที่ molecular weights ต่าง ๆ กัน และมี antibodies ต่อ O157 LPS ซึ่งเห็นเป็น ladder หรือ diffused bands ส่วนหนูที่ immunized ด้วย Stx-1-IEC และ Stx-2 toxoid มี antibody reactive bands ตรงตำแหน่ง A และ B subunits ของ Stx-1 และ Stx-2) จะถูกเลือกมาเป็น immune splenocyte donors เพื่อ fuse กับ myeloma cells สำหรับผลิต hybridomas

ก่อนการทำ cell fusion 4 วันได้นัดกระตุ้นหนูที่เลือกให้เป็น splenocyte donors ด้วย immunogens เดิมเข้าเส้นเลือดโดยละลาย immunogens ปริมาณครึ่งหนึ่งของ last booster dose ใน NSS ปริมาตร 0.2 ml หลังจาก intravenous booster 4 วันและเป็นวันที่ทำ cells fusion เจาะเลือดหนูแต่ละตัวแยกซีรัมไว้เป็น positive (immune) serum (PS หรือ IS) ฆ่าหนูด้วยวิธี cervical dislocation แล้ว disinfect ภายนอกตัวหนูโดยจุ่มลงใน 70% ethyl alcohol ทั้งตัว หลังจากนั้นตัด้ามออกมาล้างและบดเอา spleen cells ใส่ลงใน RPMI-1640 medium โดยใช้ sterile technique ทุกขั้นตอน บั่นล้างเซลล์ใน RPMI medium แล้วนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ใน hemacytometer และใช้ trypan blue exclusion method พบว่า เซลล์มีชีวิตอยู่มากกว่า 98% ของ nucleated cells ทั้งหมด จึงนำไป fuse กับ P3x-63-Ag8.653 myeloma cells ซึ่ง harvest มาจาก culture flasks ในขณะที่เซลล์กำลังอยู่ในระยะ late exponential phase (cells มี viability มากกว่า 98% เช่นกัน) ในอัตราส่วน myeloma cells:spleen cells = 1:10 โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) 4,000 เป็น fusogen หลังจากนั้น cells ให้เป็น common pellet แล้ว resuspend cells ใน RPMI-1640 medium แล้วล้าง 2-3 ครั้ง ท้ายสุดนำ cell pellet ไป resuspend ใน selective medium คือ HAT medium ผสม 15% bovine serum โดยปรับให้มี 10^6 cells/ml จากนั้นแบ่ง 200 μ l aliquots ลงใน 96-wells tissue culture plates แล้ว incubate plates ไว้ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ตรวจดู cultures ภายใต้ inverted microscope ทุกวัน เมื่อปรากฏเป็นกลุ่มเซลล์ hybrids ที่ refractile กว่า background ซึ่งประกอบด้วย cell debris จึงเปลี่ยน medium ใหม่ในระยะเวลาที่เหมาะสม หลังจาก hybrids แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากแล้ว นำ undiluted culture supernatants ไปตรวจหาแอนติบอดีต่อ homologous antigens โดยวิธี indirect ELISA เมื่อพบว่า เซลล์จาก culture wells หลุมใดให้ผลบวกโดยมี indirect ELISA optical density สูงกว่า 0.1 นำเซลล์จากหลุมนั้นไป clone โดยวิธี limiting dilution โดยมี normal splenocytes เป็น feeder cells เพื่อให้ได้โคลนเดี่ยว (monoclones = hybridomas)

6. Vero cytotoxic assay

ในการทำ Vero cytotoxic assay ได้ใช้ African Green Monkey kidney (Vero) cells และวิธีของ Gentry และ Dalrymple (1980) โดยได้รับ Vero cells มาจากแพทย์หญิงคุณหญิง อนันต์ นิศาลักษณ์ ภาควิชาไวรัสวิทยา AFIRMS กรุงเทพฯ ได้นำ Vero cells มาเลี้ยงใน MEM tissue culture medium เพื่อ maintain ไว้ขณะทำ experiments ในขณะที่ยัง有一部分 cryopreserved ไว้ใน liquid N₂ Tank

เมื่อจะทำการทดสอบดูว่า preparation หรือ sample ใดมี Shiga toxin ได้นำ cells มา plate ลงใน tissue culture wells หลุมละ 100 µl (10^5 cells) แล้ว incubate plate ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator ข้ามคืน นำ sterile toxin preparation หรือตัวอย่างที่จะตรวจหา Shiga toxin (undiluted preparation หรือ individual dilutions) มาเติมลงใน well ที่มี Vero cells หลุมละ 100 µl โดยใน plate เดียวกันมี positive control (Stx-1 หรือ Stx-2 แล้วแต่กรณี) และ negative control ที่เหมาะสม (เช่น spent culture medium of P3x-63-Ag8.653, sample diluent เป็นต้น) อยู่ด้วย หลังจาก incubate ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator 48 ชั่วโมง แล้วนำ plate มาตรวจดู cytopathic effect (CPE) โดยใช้ inverted microscope (โปรดดูรูป 2.11) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บ plate ไว้ได้นาน โดยล้างเอา detached cells และ medium ในหลุมออกให้หมดด้วย phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) แล้วย้อมเซลล์ที่ยังติดอยู่กับกัน wells ใน plate ด้วย 0.13% crystal violet ใน 5% ethanol-2% formalin-PBS เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงล้าง excess stain ออกด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำประปาก็ได้ ปลอ่ยให้ plate แห้ง แล้วจึงนำมาตรวจดู cytotoxicity ซึ่งบริเวณที่ไม่มีสีคือบริเวณที่เกิด cytotoxicity และเซลล์ตายจึงหลุดออกจากการเกาะที่ plate ทั้งนี้โดยเปรียบเทียบกับ negative control ซึ่งสี crystal violet จะติดที่กัน well อย่างสม่ำเสมอ (ไม่มี toxicity) ส่วน positive control (มี toxin) จะต้องไม่มี unstained area มาก หรือน้อยขึ้นกับปริมาณ toxin ถ้ามีมากและเซลล์ตายหมดก็จะเห็นว่าที่กัน wells ที่มี positive control แทบไม่มีสีติดอยู่เลย



រូបភាព 2.9

The cytopathic effect (CPE) of Vero cells caused by Shiga toxin

- (a) Monolayer of Vero cells in normal culture condition
- (b) CPE of Vero cells in the presence of Shiga toxin (Vero cytotoxicity)

7. Serological methods ต่าง ๆที่ใช้ตรวจหาความเฉพาะของ monoclonal antibodies, cross-reactivity checking และ antigenic specificities

7.1 Indirect ELISA

Indirect ELISA นี้นอกจากจะใช้เป็นวิธีตรวจหาระดับ antibody titer ในซีรัมของ immunized mice, screen หา positive hybrids (นำ spent culture medium มาตรวจ) และ ตรวจระดับ antibody titer ใน spent culture medium ของ selected hybridomas แล้ว ยังใช้สำหรับตรวจ cross-reactivities ของ MAbs ต่างๆต่อ heterologous antigens (analytical specificity) ด้วย ขั้นตอนการทำ indirect ELISA สำหรับงานวิจัยในส่วนนี้เหมือนกับ indirect ELISA โครงการย่อยที่ 1 ทุกประการยกเว้นแอนติเจนที่ใช้ coat plates ซึ่งแตกต่างออกไปตามความเหมาะสมของจุดประสงค์แต่ละครั้งในการทำการทดสอบ

7.2 Dot-ELISA

ได้ใช้ Dot-ELISA สำหรับตรวจ analytical specificity ของ MAb ต่างๆต่อ homologous และ heterologous antigens นอกจากนี้ยังใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนเป้าหมายในตัวอย่างส่งตรวจ (specimens) จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงในภายหลัง อย่างไรก็ตามวิธี dot-ELISA ต่างจาก dot-blot-ELISA ที่ใช้ตรวจหา *Leptospira* antigen ในปัสสาวะ ที่แสดงไว้ในโครงการย่อยที่ 1 เล็กน้อย กล่าวคือแทนที่จะใช้ slot-blot device หยดตัวอย่างลงบน nitrocellulose ในโครงการย่อยที่ 2 นี้ใช้ automatic pipette และ tips หยดตัวอย่าง 1-3 µl แบบ manual แทน หลังจากตัวอย่างบน nitrocellulose แห้งดีแล้ว ขั้นตอนต่อไปของ dot-ELISA ทำเช่นเดียวกับในโครงการย่อยที่ 1 และใช้ reagents เดียวกันทุกประการ

7.3 SDS-PAGE และ Western blot analysis

ในการแยก antigen ด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ในโครงการย่อยที่ 2 นี้ ใช้ 4% stacking gel และ 12% separating gel สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ MAb ต่อ LPS ของ *E. coli* O157 และใช้ 16% separating gel สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับ Shiga toxins

Western blot analysis ทำโดยการ transblot SDS-PAGE-separated antigens ลงบน NC จากนั้น blocked unoccupied sites บน NC ด้วย 3% BSA, 0.5% gelatin ใน PBS แล้วล้าง NC ก่อนนำไป react กับ antibody preparation หลังจากนั้น revealed antigen-antibody reactive bands โดยการทำปฏิกิริยากับ second antibody-enzyme conjugate และ substrate

8. Specimens จากมนุษย์ (human specimens)

ได้เก็บตัวอย่างอุจจาระ 3 ชุด ด้วยกันคือ

ตัวอย่างชุดที่ 1 เป็น rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วงจำนวน 499 ราย ที่ไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม ได้เก็บ rectal swabs ใส่ Cary-Blair transport medium ส่งไปเพาะเชื้อที่ Clinical Microbiology Laboratory Unit ของโรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี หลังจากนั้นจึงนำ swab นั้นไป enrich ด้วย buffered peptone water (BPW) 4 มล. ข้ามคืน แล้วแบ่งเป็น 2 aliquots แยก aliquots แรกไปต้มเพื่อใช้ทำ MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหา O157 LPS, Shiga-toxins 1 และ 2 ต่อไป สำหรับ aliquots ที่สองนำไปเก็บที่ -20°C เพื่อใช้ทำ PCR, Western blot analysis และ/หรือ Vero cytotoxic assay ในกรณีที่ MAb-based dot-ELISA ให้ผลไม่ตรงกับผลการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างชุดที่ 2 เป็น rectal swabs จากผู้ป่วยอุจจาระร่วง 42 ราย ชาวเวียดนาม ที่ไปรับการรักษาที่โรงพยาบาลชื่อ “108” Hospital ที่ฮานอย ได้เก็บ rectal swabs จากผู้ป่วยแต่ละคนใส่ใน buffered glycerol saline (BGS) ซึ่งเป็นเพียง preservation medium (ไม่ใช่ enrichment medium) ปริมาตร 4 มล. แล้วส่งไปเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล “108” จากนั้นนำ BGS หลอดเดียวกันไปต้ม 20 นาที แล้วส่งไปตรวจหา O157 LPS, Shiga toxin 1 และ 2 ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

ตัวอย่างชุดที่ 3 เป็น stool samples ของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น 5 คน ที่มีอาการอุจจาระร่วงแบบ hemorrhagic colitis ซึ่ง stool samples เหล่านี้เก็บไว้ใน freezer ที่ Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan ซึ่ง samples เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากแพทย์หญิง อะมิกิ คาอิ การเพาะแยกเชื้อและการตรวจหา Shiga toxins โดย PCR ได้ทำที่ประเทศญี่ปุ่นแต่เก็บผลการตรวจสอบไว้ก่อน ส่วนการตรวจหาแอนติเจนใน stool aliquots ทำโดยนักวิทยาศาสตร์ ที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน

ผลการตรวจโดยวิธีเพาะเชื้อและการตรวจหาแอนติเจนโดย MAb-based dot-ELISA นำมาเปิดพร้อมกันและตัวอย่างใดให้ผลไม่ตรงกัน ต้องนำตัวอย่างไปตรวจหาแอนติเจน คือ ตรวจหา O157 LPS โดย SDS-PAGE และ Western blot analysis และตรวจหา Shiga toxins โดย Vero cytotoxic assay

ผลการวิจัย (Results)

1 การผลิตเซลล์ไฮบริโดมา และโมโนโคลนาลแอนติบอดี

1.1 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to *E. coli* O157 LPS

ได้ใช้หนู BALB/c อายุ 6-7 สัปดาห์ เมื่อเริ่มต้นการ immunize (whole cell homogenate ของ *E. coli* O157) จำนวน 5 ตัว โดยใช้ dose, route และ schedule เหมือนๆ กันภายหลังการให้ booster dose ครั้งสุดท้าย ได้ตรวจพบว่าหนูตัวที่ 4 มี serum antibody titer ต่อ homologous antigen สูงที่สุดคือ 1:51,200 จึงใช้ spleen cells จากหนูตัวนี้ hybridize กับ myeloma cells พบว่าสามารถ aliquot fused cells ใส่ลงใน 96-wells tissue culture plates จำนวน 1,488 wells (well ละ 200 μ l) ด้วยกัน หลังจาก incubate plates ที่ 37°C ใน 5% CO₂ incubator และเปลี่ยน medium อย่างเหมาะสม พบว่ามี growing hybrids อยู่จำนวน 194 wells (13%) และเมื่อนำ spent culture medium จาก wells ที่มี growing hybrids ไปทดสอบหาแอนติบอดีต่อ O157 Ly (homologous antigen) พบว่า spent culture medium จากเซลล์ (polyhybrids) จำนวน 18 หลุม มีแอนติบอดี จึงนำเซลล์จาก 18 หลุมนี้ไปแยกเป็นเซลล์เดี่ยว (monocloning) และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีใน spent culture medium ของ monoclones (hybridomas) พบว่า hybridomas จาก 4 wells มีแอนติบอดีเฉพาะต่อ O157 Ly/LPS เท่านั้นโดยไม่มี cross-reaction ต่อ heterologous antigens อื่นๆ ที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 ผู้วิจัยได้เลือก hybridoma ชื่อ clone 13C9 มาเลี้ยงสำหรับการผลิต monoclonal antibodies (MAb) ให้มากพอเพื่อใช้เป็น detection reagent ต่อไป

Characteristics ของ MAb จาก clone 13C9 (MAb13C9) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 จะเห็นว่า MAb13C9 เป็น immunoglobulin ชนิด γ 3 และ light chain เป็น kappa (K) ที่มีความจำเพาะต่อ O157 LPS และเมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนถึง stationary phase แล้ว spent culture medium มี indirect ELISA titer 1:2,048 (20,480 EU/ml) และ MAb13C9 ให้ Western blot pattern ต่อ O157 LPS เป็น smears/ladders ดังแสดงใน Block I รูปที่ 2.10

1.2 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to A and B subunits of Shiga toxin-1 (Stx-1)

ได้ immunized หนู BALB/c จำนวน 5 ตัว เช่นเดียวกัน ภายหลังให้ booster dose สุดท้ายแล้ว 7 วัน พบว่า serum antibodies ต่อ homologous antigen ของ immunized mice ทุกตัว (Stx-1-IEC) มี titer มากกว่า 1:10,240 เมื่อทดสอบด้วย indirect ELISA นอกจากนี้ยังได้นำซีรัมของหนูแต่ละตัวไปวิเคราะห์ด้วย Western blot analysis ว่ามีแอนติบอดีต่อ Stx-1A และ Stx-1B หรือไม่โดยใช้ SDS-PAGE-separated Stx-1-IEC หรือ Stx-1-CF ผู้วิจัยได้ใช้หนูตัวที่ 2 ซึ่งมี serum antibody titer ต่อ homologous antigen สูงที่สุด และมี reactive bands ต่อ

Stx-1 เป็น spleen cell donor โดยนำ splenocytes จากหนูตัวนี้ไป fuse กับ myeloma cells P3x-63-Ag8.653 ในการผลิต hybridomas เมื่อ hybridized แล้ว พบว่ามีเซลล์จาก 532 tissue culture wells จากทั้งหมด 1,080 wells ที่มี growing hybrids (49.3%) จาก 532 wells นี้ spent culture medium จาก 20 wells มีแอนติบอดีต่อ homologous antigen คือ Stx-1-IEC หรือ Stx-1-CF และมี bands ต่อ Stx-1A และ/หรือ Stx-1B ใน Western blot analysis ดังนั้นจึงนำเซลล์จาก 20 wells นี้ไปทำ monocloning โดยวิธี limiting dilution method ซึ่งได้ hybridomas 51 clones ด้วยกัน (Table 2.2) โดย 31 clones สร้าง MAb ต่อ Stx-1A และ 12 clones สร้าง MAb ต่อ Stx-1B immunoglobulins ที่ผลิตโดย clones ทั้งหมดเป็น γ ($\gamma 1$, $\gamma 2a$ หรือ $\gamma 2b$) และ K isotypes และไม่ cross-react กับ heterologous antigens ใน Table 2.1 เมื่อตรวจสอบโดยวิธี indirect ELISA และ dot-ELISA คณะผู้วิจัยได้เลือก hybridomas ชื่อ clones 11G3 และ 3D4 ไว้เพื่อผลิต MAb ต่อ Stx-1A และ Stx-1B ตามลำดับ (โปรดดูรูปใน Block II ของรูปที่ 2.10) ทั้งสอง clones เมื่อเลี้ยงใน tissue culture จนถึง stationary phase จะปล่อย MAb ออกมาใน spent culture fluids วัดเป็น indirect ELISA titers ได้ 1:1,280 และ 1:320 (12,800 EU/ml และ 3,200 EU/ml) ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2)

1.3 Hybridomas secreting monoclonal antibodies to Shiga toxin-2 (Stx-2)

ในการทดลองนี้ใช้ BALB/c จำนวน 10 ตัว นำมา immunize โดยใช้ Stx-2 toxoid เป็น immunogen ภายหลัง booster dose ครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ หนู mice ทุกตัวมี serum antibody titer สูงกว่า 1:10,000 และมี antibodies ที่ reactive ต่อ Stx-2A และ Stx-2B เมื่อตรวจด้วย Western blot analysis ต่อ SDS-PAGE-separated Stx-2-IEC จึงเลือกหนูตัวที่ 1 ซึ่งมี serum antibody titer 1:12,800 ต่อ homologous antigen เป็น spleen cell donor ซึ่งสามารถ aliquoted fused cells ลงใน tissue culture wells ได้ 1,088 พบว่ามี 229 wells (21%) ที่มี growing polyhybrids อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียง cells จาก tissue culture well เพียงหลุมเดียวที่สร้างแอนติบอดีต่อ Stx-2B จึงนำ cells จาก well นี้ไป monocloning และพบว่าได้ 8 hybridomas ซึ่งผลิต MAb ต่อ Stx-2B และ immunoglobulins เป็น $\gamma 2aK$ ได้เลือก clone ชื่อ 13D2 ไว้สำหรับผลิต MAb ต่อ Stx-2B สำหรับใช้เป็น antigen detection reagent ต่อไป เมื่อ clone 13D2 เจริญเติบโตเต็มที่ พบว่า spent culture medium มี indirect ELISA titer 1:2,560 (25,600 EU/ml)

เนื่องจากใน first cell fusion ไม่สามารถผลิต hybridomas ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Stx-2A ดังนั้นเพื่อให้มี hybridomas ซึ่งหลั่ง MAb ต่อ Stx-2A จึงได้ใช้ immunized mouse อีก 1 ตัว ซึ่งมี serum antibody titer 1:25,600 ต่อ homologous antigen ในการทำ cell hybridization อีกครั้งหนึ่ง จาก tissue culture wells จำนวน 1,612 wells พบว่าทุก wells มี growing hybrids (100%) และ 460 wells (28.5%) ให้แอนติบอดีต่อ Stx-2-CF ผู้วิจัยได้นำเซลล์จาก 13 wells ไปทำ monocloning และได้ hybridomas 23 clones ซึ่งผลิต MAb ต่อ Stx-

2A subunits และ immunoglobulins เป็น γ ($\gamma 1$ หรือ $\gamma 2a$) ได้เลือก clone 26F9 ซึ่ง secrete MAb ชนิด $\gamma 1$ ใน spent culture medium ขณะเซลล์เจริญเต็มที่และมี indirect ELISA titer 1:160 (1,600 EU/ml) ไว้ใช้ในการวิจัยต่อไป ตารางที่ 2.3 แสดงรายละเอียดของ hybridomas ต่อ Stx-2

คุณสมบัติต่างๆ ของ clone 13C9 (MAb ต่อ O157 LPS), 11G3 (MAb ต่อ Stx-1A), 3D4 (MAb ต่อ Stx-1B), 26F9 (MAb ต่อ Stx-2A) และ 13D2 (MAb ต่อ Stx-2B) ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 2.4 สำหรับ Western blot patterns ใน Blocks I, II และ III ของรูปที่ 2.10 ตามลำดับ แสดงให้เห็น antigenic specificities ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

รูปที่ 2.11 แสดงตัวอย่าง hybridoma clone ใน tissue culture

ตารางที่ 2.2 List of hybridomas generated against Stx-1 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx1*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. Stx1 dose neutralized by MAb***	IgG subclass
1	1E11B5	A-subunit	1: 160	1,600	nd	nd
2	1E11B6	A-subunit	1: 320	3,200	nd	nd
3	1E11C2	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
4	1E11C4	A-subunit	1:320	3,200	<10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
5	1E11C10	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
6	3C9B5	B-subunit	1:160	1,600	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
7	3C9B10	B-subunit	1:320	3,200	nd	nd
✓ 8	3C9D4	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
9	6C8F7	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
10	6C8G7	B-subunit	1:160	1,600	≥1000CD ₅₀	IgG ₁ , κ
11	6G5A4	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
12	6G5A5	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
13	6G5A6	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
14	6G5B9	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
15	6G5C4	A-subunit	1:160	1,600	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
16	8B4E4	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
17	8B4E7	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
18	8B4E9	A-subunit	1:1280	12,800	nd	nd
19	8B4F6	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
20	8B4G3	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
21	8B4H2	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
22	8B4H4	A-subunit	1:1,280	12,800	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
23	9G6E4	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
✓ 24	11E3G3	A-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
25	11E3G11	A-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
26	11E3H2	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
27	12D7B3	B-subunit	1:640	6,400	nd	nd
28	12D7B4	B-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ

(ต่อหน้าถัดไป)

ตารางที่ 2.2 List of hybridomas generated against Stx-1 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies (cont.)

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx1*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx1 neutralized by MAb***	IgG subclass
29	12D7B5	B-subunit	1:640	6,400	nd	nd
30	12D7B10	B-subunit	1:1,280	12,800	100CD ₅₀	IgG ₁ , κ
31	12D7C10	B-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
32	12D9E11	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
33	12D9F3	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
34	12D9F6	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
35	12D9F7	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
36	12D9G3	A-subunit	1:160	1,600	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
37	12D9G5	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
38	13C10C11	A-subunit	1:640	6,400	10CD ₅₀	IgG _{2a} , κ
39	14B8C2	B-subunit	1:320	3,200	≥1000CD ₅₀	IgG _{2b} κ
40	14B8D4	B-subunit	1:1,280	12,800	≥1000CD ₅₀	IgG _{2b} κ
41	16D5B7	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
42	16D5B9	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
43	16D5B11	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
44	16D5C1	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
45	16D5C5	A-subunit	1:80	800	nd	nd
46	16D5C11	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd
47	16D5C12	A-subunit	1:1,280	12,800	10CD ₅₀	IgG ₁ , κ
48	16D5D1	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
49	16D5D2	A-subunit	1:320	3,200	nd	nd
50	16D5D7	A-subunit	1:640	6,400	nd	nd
51	16D5D12	A-subunit	1:1,280	12,800	nd	nd

* = The subunits of Stx1 were specified by the locations of the reaction bands on NCM

** = One indirect ELISA unit was the smallest amount of the antibody in 100 µl of the MAb preparation that still gave the positive ELISA reaction (OD ≥ 0.05)

*** = The highest amount of Stx1-IEC that can be neutralized by 1ml of undiluted MAb. The data are expressed as the number of CD₅₀ of Stx1-IEC

nd = not done

✓ = Monoclonal chosen for further characterization of their MAb

ตารางที่ 2.3 Hybridomas generated against Stx-2 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx2*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx2 neutralized by MAb***	IgG subclass
⇒ 1	1D10D7	A-subunit	1:20	200	nd	IgG _{2a} κ
⇒ 2	1D10H6	A-subunit	1:10	100	nd	IgG _{2a} κ
3	3D11B8	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
4	3D11D2	A-subunit	1:80	800	nd	nd
5	3D11E3	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
6	3D11F3	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	nd
⇒ 7	3D11G7	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	nd
8	3D11H8	A-subunit	1:320	3,200	nd	IgG ₁ κ
9	3E9C11	A-subunit	1:320	3,200	100CD ₅₀	IgG _{2a} κ
10	7D8C10	A-subunit	1:10	100	nd	nd
⇒ 11	7D8D2	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	nd
12	7D8H8	A-subunit	1:20	200	<10CD ₅₀	IgG ₁ κ
13	8B7C4	A-subunit	1:80	800	nd	nd
14	8B7E7	A-subunit	1:160	1,600	<10CD ₅₀	IgG ₁ κ
15	8B7F4	A-subunit	1:40	400	nd	nd
16	8B7H6	A-subunit	nd	nd	nd	nd
17	26E9B3	A-subunit	1:80	800	nd	nd
18	26E9C1	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
19	26E9C5	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	nd
20	26E9C6	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
21	26E9D9	A-subunit	1:80	800	nd	nd

(ต่อหน้าถัดไป)

ตารางที่ 2.3 Hybridomas generated against Stx-2 and the characteristics of their secreted monoclonal antibodies (cont.)

No.	Hybridoma	Specific to subunit of Stx2*	Indirect ELISA titer	ELISA units (EU/ml)**	Max. dose of Stx2 neutralized by MAb***	IgG subclass
22	26E9D11	A-subunit	1:160	1,600	nd	nd
✓ 23	26E9F9	A-subunit	1:160	1,600	100CD ₅₀	IgG ₁ κ
24	13D4C2	B-subunit	1:640	6,400	nd	IgG _{2a} κ
25	13D4C4	B-subunit	1:640	6,400	1000CD ₅₀	IgG _{2a} κ
26	13D4C8	B-subunit	1:640	6,400	nd	IgG _{2a} κ
27	13D4C9	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
28	13D4C10	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
✓ 29	13D4D2	B-subunit	1:2560	25,600	1000CD ₅₀	IgG _{2a} κ
30	13D4D3	B-subunit	1:1280	12,800	nd	IgG _{2a} κ
31	13D4D5	B-subunit	1:2560	25,600	100CD ₅₀	IgG _{2a} κ

* = The subunits of Stx2 were specified by the locations of the reactive bands on NCM

** = One indirect ELISA unit was the smallest amount of the antibody in 100 µl of the MAb that still gave the positive ELISA reaction (OD ≥ 0.05)

*** = The highest amount of Stx1-IEC that can be neutralized by 1 ml of undiluted MAb. The data are expressed as the number of CD₅₀ of Stx2-IEC

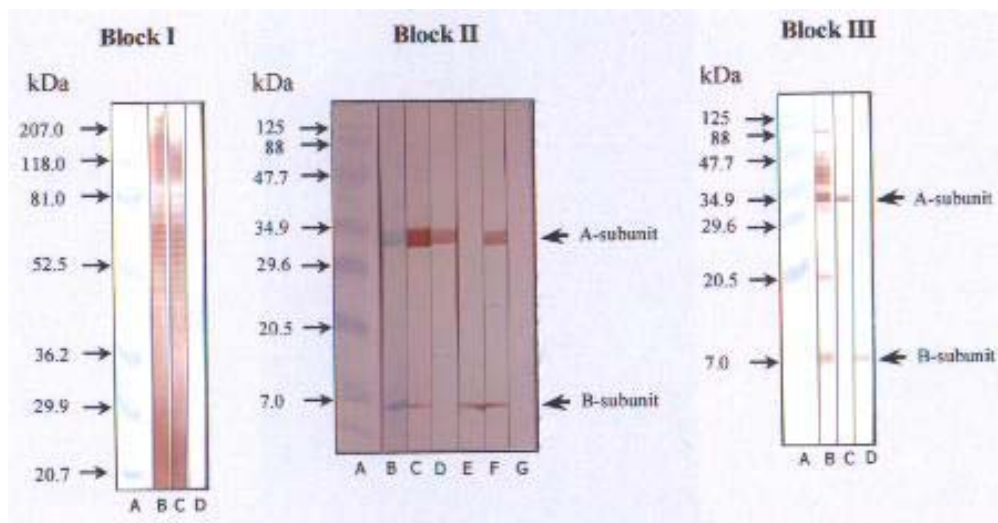
nd = not done

⇒ = Clones which their MAb had cross-reactivity to some heterologous antigens.

✓ = Monoclones which their MAb were chosen for further characterization

ตารางที่ 2.4 Specific hybridomas, their secreted Ig isotypes, antigenic specificities of their MAb, and the indirect ELISA titers of their culture fluids at stationary phase of *in vitro* growth

Hybridoma clone	Ig Isotypes		Antigenic specificity of MAb revealed by WB	Reciprocal indirect ELISA titer against homologous antigen
	H chain	L chain		
13C9	$\gamma 3$	κ	O157 LPS	2,048
11G3	$\gamma 1$	κ	Stx-1A	1,280
3D4	$\gamma 1$	κ	Stx-1B	320
26F9	$\gamma 1$	κ	Stx-2A	160
13D2	$\gamma 2a$	κ	Stx-2B	2,560



រូបភាព 2.10 Western blot (WB) patterns of monoclonal antibodies secreted by the selected hybridomas, i.e., clone 13C9 (Block I), clones 11G3 and 3D4 (Block II) and clones 26F9 and 13D2 (Block III) against SDS-PAGE-separated homologous antigens

Numbers at left of all blocks are molecular weight in kilodaltons

Lanes A of all blocks are standard molecular weight markers

Lanes B, C and D of block I are WB patterns of mouse immune serum, MAb 13C9 and culture fluid of P3x-63-Ag8.653 myeloma cells, respectively against the SDS-PAGE-separated O157 LPS

Lane B of block II is SDS-PAGE-separated purified Stx-1 stained with Amido black. Lanes C-G are WB patterns of mouse immune serum, MAb 11G3, MAb 3D4, combination of MAb 11G3 and MAb 3D4 and culture fluid of P3x-63-Ag8.653 myeloma cells, respectively against the SDS-PAGE-separated pure Stx-1

Lanes B, C and D of block III are WB patterns of mouse immune serum, MAb 26F9 and MAb 13D2, respectively against the SDS-PAGE-separated Stx-2-IEC



รูปที่ 2.11 Representative hybridoma in tissue culture

1.4 ผลการตรวจหาแอนติเจนและการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย

1.4.1 การเตรียม antigen detection reagents เพื่อตรวจหาแอนติเจนต่างๆ ใน stools และ rectal swab cultures ดังนี้

Detection antigen สำหรับตรวจหา O157 LPS ได้แก่ monoclonal antibodies (MAb) จาก clone 13C9 (specific ต่อ *E. coli* O157 LPS)

Detection reagent สำหรับตรวจหา Shiga-toxin 1 ได้แก่ combination of MAb จาก clones 11G3 (specific ต่อ Stx-1A) และ 3D4 (specific ต่อ Stx-1B)

Detection reagent สำหรับตรวจหา Shiga-toxin 2 ได้แก่ combination of MAb จาก clones 26F9 (specific ต่อ Stx-2A) และ 13D2 (specific ต่อ Stx-2B)

โดยเตรียมให้แต่ละ preparation มีเนื้อ antibodies ต่อ specific epitope 80 indirect ELISA units (80 EU) ต่อ 1 มล.

1.4.2 ผลการตรวจหาแอนติเจนของ enterohemorrhagic *E. coli* ในตัวอย่าง

อุจจาระและ rectal swab cultures จากผู้ป่วย

จากการใช้วิธี dot-ELISA โดยใช้ MAb เฉพาะจากข้อ 1.4.1 เป็น detection reagents ได้ผลดังนี้

1. มีตัวอย่างอุจจาระ/rectal swab cultures จำนวน 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 546 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAb-based dot-ELISA คือ

Stool samples จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นทั้ง 5 ตัวอย่าง

Rectal swab cultures จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ตัวอย่าง จาก 499 ตัวอย่าง

ตัวอย่างอุจจาระ/rectal swabs จำนวน 537 จาก 546 ตัวอย่างมีผลการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ enterohemorrhagic *E. coli* โดย MAb-based dot-ELISA เป็นลบได้แก่ 495 ตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวไทยและ 42 ตัวอย่างจากผู้ป่วยชาวเวียดนาม

2. Stool samples 5 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นที่ให้ผลบวก โดย dot-ELISA มีรายละเอียดคือ

2 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁻, Stx-2⁺

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁺, Stx-2⁻

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁺, Stx-2⁺

1 ตัวอย่างให้ผล O157 LPS⁻, Stx-1⁺, Stx-2⁺

3. Rectal swab samples จากผู้ป่วยชาวไทย 4 ตัวอย่างที่ให้ผล dot-ELISA เป็นบวก มีรายละเอียด ดังนี้

1 รายให้ผล O157 LPS⁺, Stx-1⁻, Stx-2⁻

3 รายให้ผล O157 LPS⁻, Stx-1⁻, Stx-2⁺

1.4.3 ผลการเพาะ-แยก และ identify เชื้อโดยวิธีมาตรฐานและการ confirm ด้วย PCR เพื่อตรวจหาชนิดของ O157 LPS และ *stx-1* และ *stx-2*

การเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างอุจจาระและการทำ PCR เพื่อหา O157 LPS gene, *stx-1* และ *stx-2* ในตัวอย่างจากอุจจาระของผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น ทำที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของ Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo, Japan โดย Dr. Akemi Kai เป็นผู้ทำและเก็บผลการทดสอบไว้จนเมื่อได้ผลการทดสอบด้วย dot-ELISA แล้วจึงนำมา reveal พบว่าได้ผลตรงกันทุกประการ คือ

เป็น *E. coli* O157 4 isolates

2 isolates เป็น Stx-1⁻, Stx-2⁺

1 isolates เป็น Stx-1⁺, Stx-2⁻

1 isolates เป็น Stx-1⁺, Stx-2⁺

และเป็น *E. coli* serogroup อื่น 1 isolate คือ non-O157 *E. coli* Stx-1⁺, Stx-2⁺

การเพาะ-แยกและ identify เชื้อจาก rectal swab cultures ของผู้ป่วยชาวไทยทำที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 499 ราย ส่วนการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากตัวอย่างผู้ป่วยชาวเวียดนาม 42 ราย ทำที่ “108” Hospital, Hanoi

ผลสรุปของการเพาะ-แยกและ identify เชื้อและการตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างโดย MAb-based dot-ELISA ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลการเพาะ-แยกและ identified เชื้อ และ MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนในตัวอย่างอุจจาระ/rectal swab cultures จำนวน 628 ตัวอย่าง

เชื้อที่ตรวจพบ (จำนวนตัวอย่าง)	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ผลของ MAb-based dot-ELISA เมื่อใช้ MAb ที่มีความเฉพาะต่อ		
		O157 LPS	Stx-1	Stx-2
ตัวอย่างที่ผล dot-ELISA เป็นบวก				
<i>E. coli</i> O157 (2)	ชาวญี่ปุ่น	+	-	+
<i>E. coli</i> O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	+	+	-
<i>E. coli</i> O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	+	+	+
<i>E. coli</i> non-O157 (1)	ชาวญี่ปุ่น	-	+	+
Untypeable <i>E. coli</i> (1)	ชาวไทย	+	-	-
Untypeable <i>E. coli</i> (3)	ชาวไทย	-	-	+
ตัวอย่างที่ให้ผล dot-ELISA เป็นลบ				
<i>Aeromonas hydrophila</i> (2)	ชาวไทย	-	-	-
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (8)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (9)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. (67)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp. (5)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. and <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (2)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Shigella</i> spp.	40 Vietnamese, 58 Thai	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (7)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (42)	ชาวไทย	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> Ogawa (1)	ชาวไทย	-	-	-
No pathogens were isolated (378)	2 Vietnamese, 376 Thai	-	-	-

+, dot-ELISA positive

-, dot-ELISA negative

1.5 Multiplex PCR เพื่อตรวจหาเอ็นของ O157 LPS และ *stx-1* และ *stx-2*

เนื่องจากในการเพาะ-แยกและ identify เชื้อจากอุจจาระ/rectal swabs จากผู้ป่วยซึ่งทำ ที่โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรีโดยปกติรายงานเพียงว่าใน rectal swab cultures ของผู้ป่วยอุจจาระร่วง ตรวจพบ *E. coli* โดยไม่พบ pathogens อื่น แต่ไม่ได้ทำ serogrouping หรือ serotyping ของเชื้อ *E. coli* ที่พบ รวมทั้งไม่เก็บเชื้อ *E. coli* ไว้ด้วย (หน่วยบริการทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาของโรงพยาบาลส่วนใหญ่ไม่เก็บ *E. coli* ไว้เพราะพบมากทุกวัน จะรายงานเพียง enteropathogenic *E. coli* เท่านั้น) จึงไม่มี *E. coli* isolates ของผู้ป่วยชาวไทย 4 ราย (ซึ่งผลการตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี dot-ELISA เป็นบวก) สำหรับมาตรวจหา O157 LPS หรือ Stx-1 และ Stx-2 หรือทำ PCR จากเชื้อโดยตรงได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้นำ rectal swab samples ของผู้ป่วยที่ให้ผล dot-ELISA เป็นบวกทั้ง 4 รายมาใช้เป็น DNA template ทั้งโดยตรง หรือทั้งการสกัด DNA ด้วยวิธีมาตรฐานและการใช้ Chelex แล้วนำมาทำ multiplex PCR เพื่อหา DNA ของ O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 โดยได้รับ Primer mixture มาจาก Professor Dr. Shinji Yamasaki, Research Institute International Medical Center of Japan แต่เนื่องจาก multiplex PCR primers จดสิทธิบัตรไว้จึงไม่สามารถเปิดเผย content และ sequences ของ primers ได้ อย่างไรก็ตาม PCR amplicons ของ O157 LPS, *stx-1* และ *stx-2* DNA ซึ่ง amplify โดย multiplex primers มีขนาด 457 bp, 349 bp และ 112 bp ตามลำดับ

PCR reaction mixture ประกอบด้วย

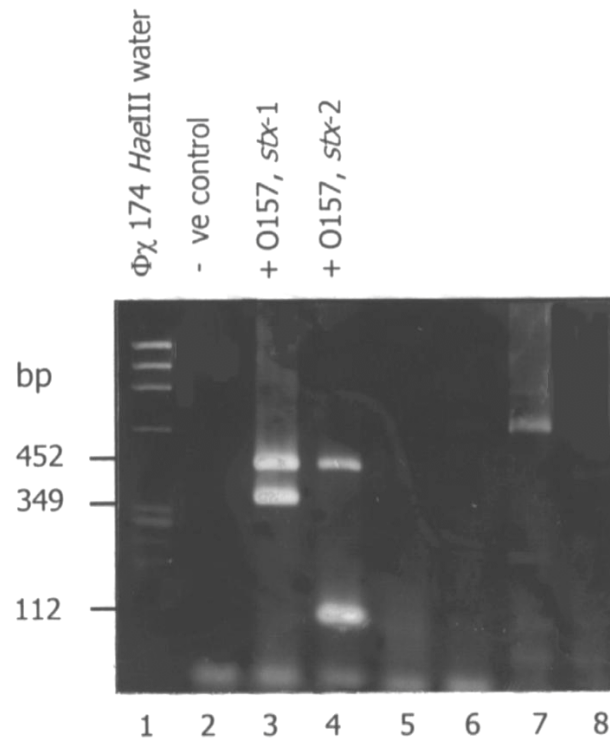
- 17.35 µl sterile ultra-pure distilled water
- 2.5 µl dNTP mixture (2.5 mM each, Takara Co., Japan)
- 3 µl ของ 10 × PCR buffer
- 3 µl each of primer (10 pM/µl)
- 0.15 µl *Taq* DNA polymerase (5U/ml, Perkin Elmer, USA)
- 1 µl DNA template

PCR condition ได้แก่

- Initial warming ที่ 94° C, 5 นาที
- 35 cycles of denaturation ที่ 94° C, 1.5 นาที
- Annealing ที่ 55° C, 1.5 นาที
- Extension ที่ 72° C, 1.5 นาที
- Final extension ที่ 72° C, 7 นาที

โดยใช้ Thermal Cycler Gene Amp® PCR System model 9700, PE Applied Biosystem, Perkin-Elmer, USA

นำ PCR products ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE buffer, pH 8.0 ที่ 80 Volts เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อ dye front เคลื่อนที่ไปจนได้ระยะทางถึงประมาณ 60% ของ gel length นำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 µg/ml) เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วดู amplicons ด้วย UV Transilluminator (Fotodyn Incorporation, Wisconsin, USA) โดยใช้ clinical isolates คือ *E. coli* O157 ที่มี *stx*-1 และ *stx*-2 เป็น positive controls พบว่า ไม่สามารถ amplify DNA ของ O157 LPS และ *stx*-1 และ *stx*-2 จาก rectal swab samples ของผู้ป่วยชาวไทย 4 คนที่ ผลการตรวจด้วย MAb-based dot-ELISA ให้ผล positive โดย MAb ต่อ O157 LPS (1 sample) และ 3 samples ที่ positive โดย MAb Stx-2 ได้ ในขณะที่ positive controls ให้ผลตรงกันทุกประการ (โปรดดูรูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ผล multiplex PCR เพื่อ amplify genes of O157 LPS, *stx*-1 และ *stx*-2 ใน stool samples ซึ่งให้ผลบวกโดย MAb-Based dot-ELISA

1, marker ($\phi\chi$ 174 *Hae*III)

2, negative control

3, positive control O157, *stx*-1

4, positive control O157, *stx*-2

5-8, stool samples which were dot-ELISA-positive (ไม่สามารถ amplify ได้ เข้าใจว่า stool samples มี *Taq* polymerase inhibitors) จึงเปลี่ยนไปทำ Western blotting และ Vero cytotoxicity test แทน และพบว่าตัวอย่างมี O157 LPS (รูปที่ 2.13) หรือ Stx จริง (ไม่ได้แสดงผล)

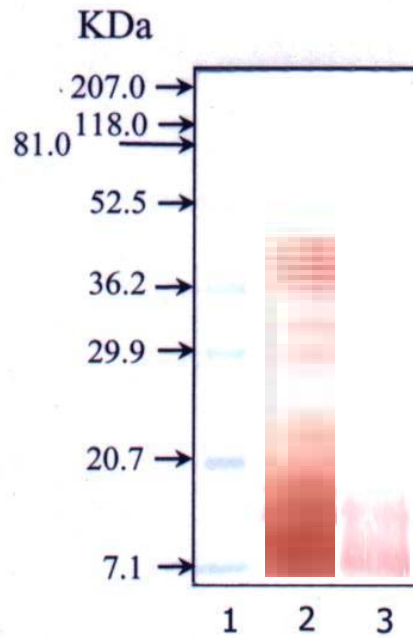
เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าการ amplify DNA จาก stool samples ไม่ใคร่ได้ผลดีนัก ทั้งนี้เพราะ stool samples มักมี *Taq* DNA polymerase inhibitors รบกวน การที่ positive controls ให้ผลถูกต้องเป็นเพราะ positive controls เป็น pure isolates ไม่ใช่ stool sample และเพื่อยืนยันว่า stool samples มี DNA polymerase inhibitors จริงเราได้ใส่ positive controls ลงใน stool samples แล้วนำไปทำ PCR เช่นเดิม ผลปรากฏว่าไม่สามารถ amplify DNA ของ positive controls ใน stool samples ได้ แสดงว่า stool samples มี PCR inhibitors จริง

1.6 Western blot analysis และ Verocytotoxicity test เพื่อตรวจหา O157 LPS และ Stx-2 ใน MAb-based dot-ELISA positive rectal swab samples

ได้นำ rectal swab cultures ของผู้ป่วยทั้ง 4 รายที่ให้ผลบวกต่อ MAb-based dot-ELISA ไป dialysed ในน้ำกลั่นแล้ว lyophilized เพื่อ concentrate จากนั้นนำไป run ใน SDS-PAGE แล้วทำ Western blot analysis โดยใช้ MAbO157 LPS สำหรับตัวอย่างที่ MAb-dot-ELISA ให้ผลบวก O157 LPS และใช้ MAbStx-2 ใน Western blot analysis ของ samples ที่ dot-ELISA ให้ผลบวก Stx-2

ผลของ Western blot analysis (WB) พบว่า ใน rectal swab sample ที่ให้ผลบวก MAbO157 LPS มี O157 LPS อยู่จริงโดย WB ให้ผลเป็น smear pattern กับ MAbO157 LPS จาก clone 13C9 (โปรตีนรูปที่ 2.13) ในขณะที่ rectal swab samples ที่ให้ผลบวก MAbStx-2 dot-ELISA มองไม่เห็น bands ของ Stx-2 ไม่ว่าจะเป็นตรงตำแหน่ง Stx-2A (≈ 33 kDa) หรือ Stx-2B (≈ 7.0 kDa) ก็ตาม

ดังนั้น rectal swab samples ทั้งสาม samples จึงถูกนำไปทดสอบ Vero cytotoxicity test โดยนำไปกรองผ่าน millipore membrane เพื่อทำให้ปลอดเชื้อแล้วนำไปเติมลงใน Vero cell culture ผลปรากฏว่าทั้งสาม samples ก่อให้เกิด cytopathic effect ต่อ Vero cell จริง โดยมีการหลุดของเซลล์เช่นเดียวกับผลที่แสดงไว้ในรูป 2.11(b) ซึ่งแสดงว่าทั้งสามตัวอย่างมี Shiga-toxin อยู่จริง อย่างไรก็ตามทั้งสามตัวอย่างมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำ neutralization test โดย MAbStx-2A + MAbStx-2B หรือใช้ polyclonal antibodies ต่อ Stx-2 ได้



รูปที่ 2.13 Western blot pattern ของ rectal swab culture ของผู้ป่วยซึ่งผลการตรวจด้วย MAb-based dot-ELISA เป็นบวกเมื่อใช้ MAbO157 LPS จาก clone 13C9 เป็น detection reagent

Lane 1, molecular weight markers

Lane 2, WB of the dot-ELISA positive control (*E. coli* O157 LPS)

Lane 3, WB of O157 LPS positive sample

II. การศึกษาเชื้อ Shiga- toxin producing *E. coli* (STEC) จากตัวอย่างอุจจาระวัว - ควาย ในประเทศไทย และการศึกษา genotypes และ phenotypes ต่าง ๆ

Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) หรือ Verocytotoxin producing *E. coli* หรือ enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ซึ่งเป็นสาเหตุของ hemorrhagic colitis (HC) และ/หรือ hemolytic uremic syndrome ในคนนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่ามี วัว-ควาย เป็น reservoir host คนจะติดเชื้อโดยการบริโภคผลิตภัณฑ์จาก วัว-ควาย ที่มี *E. coli* เหล่านี้ปนเปื้อนอยู่ เช่น ดื่มนม รับประทานเนื้อบด เช่น แฮมเบอร์เกอร์ที่ไม่สุก รับประทานผักดิบที่ใช้มูลวัว-ควายเป็นปุ๋ย หรือน้ำที่ใช้รดผักสวนครัวที่มีการปนเปื้อนอุจจาระวัว-ควาย โดยไม่ได้ล้างให้สะอาด เป็นต้น การระบาดของโรคติดเชื้อ EHEC มีรายงานบ่อยๆ ในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ญี่ปุ่น แคนาดา เยอรมัน อังกฤษ สกอตแลนด์ ออสเตรเลีย เป็นต้น สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ EHEC หรือ STEC มีน้อยมาก และเนื่องจากงานวิจัยที่เสนอในโครงการของเมธีวิจัยอาวุโส โครงการย่อยที่ 2 ได้สำเร็จก่อนกำหนดเวลา คณะผู้วิจัยจึงได้ขยายการวิจัยออกไปในส่วนของ การสำรวจหาเชื้อ STEC ในอุจจาระของวัว-ควายในประเทศไทย รวมทั้ง ศึกษา genotypes และ phenotypes ของเชื้อเหล่านี้ด้วย

รายละเอียดของงานวิจัยมีดังต่อไปนี้

1. การ isolate เชื้อ STEC จากอุจจาระวัว-ควาย

ได้เก็บ fecal samples จากอุจจาระวัว-ควาย ที่เลี้ยงโดยชาวบ้านบริเวณรอบๆ กรุงเทพมหานคร และจังหวัดอื่นๆ จำนวน 139 ตัวอย่างโดยเก็บประมาณตัวอย่างละ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสะอาดแล้วนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการทันที เมื่อถึงห้องปฏิบัติการได้ incubate ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างประมาณ 1 loop ใส่ลงใน EC broth แล้ว enriched ไว้ใน shaking incubator 37°C ซ้ำมคืน หลังจากนั้นนำ culture มาตรวจหาว่ามี Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) และ *E. coli* O157 หรือไม่โดยวิธี multiplex PCR จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกไปทำ serial dilution ใน PBS นำ dilution 10^{-5} และ 10^{-6} ปริมาณ 100 μ l ไป spread ลงบน MacConkey agar plates แล้ว incubate ที่ 37°C, 24 ชั่วโมง จากนั้น picked colonies จากแต่ละ plate ประมาณ 50-60 colonies ต่อ plate ไป screen หา O157, *stx-1* และ *stx-2* โดย multiplex PCR อีกครั้งหนึ่ง เก็บ colonies ที่ให้ผลบวกไว้สำหรับการศึกษาต่อไป

2. PCR เพื่อการ detect *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2*

ได้ใช้ primers ซึ่งตีพิมพ์ไว้แล้วโดย Pal et al. (1999) ได้แก่คู่ที่ 1 คือ EVT1 5'-CAACATGGATCTCAG-3'; และ EVT2-5' CCCCTCAACTGCTAATA-3'; คู่ที่ 2 คือ EVS-5' ATCAGTCGTCACACTGCTGGT-3', และ EVC2-5' CTGCTGTCACAGTGACAAA-3' เพื่อ

amplify *stx-1* และ *stx-2* ตามลำดับ ส่วน primers สำหรับ *E. coli* O157 เป็น patent sequences ของบริษัทในประเทศญี่ปุ่น จึงไม่สามารถเปิดเผยได้

ขั้นตอนการทำ PCR มีดังนี้

นำ bacterial culture ที่ enrich ไว้แล้วมา dilute ใน TE แล้วต้มในน้ำเดือด 20 นาที และใช้ sample ที่ต้มแล้วนี้เป็น PCR template ส่วน PCR reaction mixture ประกอบด้วย ultra-pure distilled water 9.125 μ l, primers แต่ละตัว 3 μ l (10 μ M), dNTP mixture 2.5 μ l (2.5 mM แต่ละตัว), Tag DNA polymerase 0.375 μ l (2 units/ μ l) และ DNA template 3 μ l ส่วน PCR condition ได้แก่ การ warm ที่ 94°C 5 นาที แล้ว denaturation 35 cycles ที่ 94°C เป็นเวลา 1.5 นาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 1.5 นาที extraction ที่ 72°C, 1.5 นาที และ final cycle extension 7 นาที ที่ 72°C โดยใช้ Thermal Cycler GeneAmp® PCR System Model 9700, PE Applied Biosystem Perkin Elmer, U.S.A. จากนั้นนำ amplicons ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE (Tris-acetate EDTA, pH 8.0) buffer ที่ 100 volts ประมาณ 30 นาที หรือเมื่อ dye front เคลื่อนที่ไปประมาณ 60% ของความยาวของ gel จึงหยุดกระแสไฟฟ้าแล้วนำ gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide (0.5 μ g/ml) เป็นเวลา 15 นาที แล้วดู amplicons ด้วย UV trans-illuminator โดย positive results จะพบว่ามี amplicons ขนาด 450 bp, 349 bp และ 112 bp สำหรับ *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2* ตามลำดับ (รูปที่ 2.14)

นำ enriched culture ซึ่งให้ผล positive PCR ไป plate ลงบน Mac Conkey agar แล้ว incubate ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง picked colonies 50-100 single colonies ไป screened หา gene ของ *E. coli* O157, *stx-1* และ *stx-2* โดย multiplex PCR เช่นเดียวกับที่อธิบายไว้แล้วข้างต้น

พบว่าจากตัวอย่างอุจจาระวัว 139 samples มี 27 samples ที่ให้ผลบวก O157, *stx-1* และ/หรือ *stx-2*

เมื่อนำแต่ละ colonies จาก 27 ตัวอย่างที่ให้ผล multiplex PCR เป็นบวกไปตรวจหา O157, *stx-1* และ *stx-2* อีกครั้งหนึ่งพบว่า 48 colonies (strains) ให้ผลบวกใน 49 isolates นี้ 22 isolates (44.9%) ให้ผลบวกทั้ง *stx-1* และ *stx-2* และ 22 isolates (44.9%) ให้ผลบวกเฉพาะ *stx-2*, 4 isolates ให้ผลบวก *stx-1* (8.2%) เพียงอย่างเดียว และ 1 isolate (2%) ให้ผลบวก *E. coli* O157 amplicon (ตารางที่ 2.6) STEC isolates ที่ได้จะนำไปศึกษา genotypes อื่นๆและ phenotypes ต่างๆ เช่น ตรวจหา O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 ด้วย MAb-based dot-ELISA ตรวจหา hemolysin โดยใช้ blood agar plates ตรวจหา Shiga toxin ด้วย Vero cytotoxic assay ตรวจหา serogroups และ serotypes โดย polyvalent และ monovalent antisera นอกจากนี้ได้ศึกษา plasmid profiles และ rRNA โดย ERIC-PCR ถึงความสัมพันธ์ในระดับ genome ของเชื้อและใช้วิธี PCR เพื่อหา virulence genes อื่นๆ เช่น *eae*, *hlyA*, *etpD* และ *katP* ด้วย

ตารางที่ 2.6 Phenotypic and genotypic characteristics of the 49 *E. coli* isolates

Sample no.	Strain code	Sserogroup	O157 LPS	Hemolysis	Vero-cytotoxicity	Chromosomal genes				Plasmid genes				Resistotype*
						<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>fliC</i>	<i>cpd</i>	<i>hlyA</i>	<i>katP</i>	<i>O157</i>	
1	TC 1-16	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-17	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-21	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 1-22	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
3	TC 3	O15	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	S
5	TC 5-7	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
9	TC 9-28	O157	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	S
12	TC 12	O15	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	R
14	TC 14-3	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
	TC 14-5	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
20	TC 20-7	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	S
27	TC 27-32	O142	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	S
50	TC 50-22	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 50-25	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 50-28	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
52	TC 52-2	ONT	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 52-6	O8	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
53	TC 53-4	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
58	TC 58-2	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 58-3	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 58-6	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
59	TC 59-1	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 59-3	O152	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 59-10	O15	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
62	TC 62-24	O29	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
68	TC 68-8	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 68-76	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
69	TC 69-5	ONT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ND	S
84	TC 84-6	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 84-10	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
89	TC 89-3	Rough	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 89-43	ONT	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S
90	TC 90-1	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-2	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-5	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-42	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
	TC 90-48	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
91	TC 91-39	O27	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S
93	TC 93-28	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
115	TC 115-21	ONT	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	S
119	TC 119-21	ONT	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	ND	S
120	TC 120-3	O8	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 120-12	O8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	ND	S
125	TC 125-9	O8	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	ND	S
127	TC 127-2	ONT	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	ND	S
	TC 127-5	O168	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	ND	S
130	TC 130-22	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 130-24	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	ND	S
	TC 130-25	O8	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	S

ONT = untypable

ND = not done

3. MAb-based dot-ELISA เพื่อตรวจหา O157 LPS, Stx-1 และ Stx-2 (Chaicumpa *et al.*, 1998b)

นำเชื้อซึ่งผ่าน enrichment ที่ 37°C ข้ามคืนปริมาตร 500 µl ไปต้ม 30 นาที ก่อนนำไปทดสอบด้วย dot-ELISA โดยหยด sample ละ 3 µl ลงบน NC strips, blocked แล้ว reacted กับ MAb แต่ละ specificity คือ O157, Stx-1 และ Stx-2 ส่วน control NC strip ซึ่งหยด samples ไว้เช่นเดียวกันให้ reacted กับ spent medium ของ P3x-63-Ag8.653 myeloma cells ล้าง NC strips หลังจาก incubated กับ MAb หรือ medium control 20 นาที นำ NC strips ทั้งคู่ไปจุ่มใน rabbit anti-mouse immunoglobulin-enzyme conjugate เป็นเวลา 20 นาที ล้างแล้วนำไป reacted กับ substrate เพื่อ develop สี

4. ERIC-PCR

ใช้ genomic DNA เป็น template และใช้ ERIC Primers คือ:

IR 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

และ 2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

PCR reaction mixture ประกอบด้วย ultra-pure distilled water 28.5 µl, 10 × PCR buffer 5 µl, primers แต่ละตัว (10 µM) 5 µl, dNTP mixture (2.5 mM แต่ละตัว) 4 µl, *Taq* DNA polymerase (5 units/µl) 0.5 µl และ DNA template 2 µl

PCR condition คือ:

initial warming 94°C, 2 นาที

denaturation 25 cycles ที่ 94°C, 1 นาที

annealing ที่ 65°C, 1 นาที

extension ที่ 72°C, 1 นาที

โดยใช้ Thermal Cycler GeneAmp® PCR System model 9,700, PE Applied Biosystem, Perkin-Elmers, USA

นำ Amplified product ที่ได้ไป electrophoresed ใน 2% agarose ใน TAE (Tris-acetate EDTA, pH 8.0) buffer ที่ 100 volts เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงจะ stain gel ด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วดู amplicons ด้วย UV Trans-illuminater (Fotodyn Incorporation, Wisconsin, USA)

5. การศึกษา Plasmid profiles

เตรียม plasmid DNA ของ STEC โดยจะสกัดจาก culture ที่เลี้ยงข้ามคืนใน broth ปริมาตร 3 ml โดยใช้ alkaline lysis method ตามวิธีของ Kado และ Liu (1981) นำ plasmid

ไป electrophoresed ใน 0.5% agarose gel โดยใช้ TAE buffer แล้วย้อม gel ด้วย ethidium bromide แล้วตรวจดูด้วยกล้อง UV ดังข้างต้น โดยจะ estimate molecular sizes ของ plasmid ด้วยการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่กับ plasmids ที่ทราบขนาดโมเลกุลอยู่แล้ว (extract จาก *E. coli* EDL 933 reference strain)

6. การทำ serogrouping และ serotyping

จะนำ positive STEC isolates ไปตรวจหา serogroups และ serotypes โดยวิธีของ Bettelheim และ Thomson (1987) และ Chandler และ Bettelheim (1974) ตามลำดับ โดยจะใช้ full range O sera (O1 to O169) และ H sera (H1 to H56) ตามลำดับ

7. Cytotoxic assay

โปรดดูวิธีทำในโครงการย่อยที่ 2

8. Hemolytic activity testing

จะ streak แบคทีเรียลงบน tryptic soy agar (Difco) plate ซึ่งมี 5% washed human blood cells ผสมอยู่ หลังจาก incubate plate ประมาณ 18 ชั่วโมง ที่ 37°C จึงตรวจดูว่ามี hemolysis รอบๆ bacterial colonies หรือไม่ (Schmidt *et al.*, 1999)

ผลการวิจัย

ผลการศึกษา virulence genes ต่างๆ และ plasmid profiles ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากวัวทั้ง 49 สายพันธุ์ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.6

การศึกษา plasmid profiles ของเชื้อทั้ง 49 isolates พบว่าสามารถแยกได้เป็น 8 กลุ่มตามตารางที่ 2.7

สามารถสรุปผลการศึกษา phenotypes และ genotypes ได้ดังนี้

1. จาก 49 isolates พบว่ามีเพียง strain TC9-28 (พบ amplicon ของ gene *O157*) เท่านั้นที่ให้ผลบวก MAb-based-dot-ELISA ต่อ monoclonal antibodies เฉพาะต่อ *O157* LPS

2. จำนวน (ยกเว้น TC9-28) 48 isolates ให้ผล Vero cytotoxic assay เป็นบวก แสดงว่าเชื้อมีความสามารถในการผลิต Shiga toxin ได้จริง

3. 37 isolates จาก 49 isolates ผลิต hemolysin และทำให้เกิด α -hemolysis (ไม่ใช่ typical enterohemolytic phenotype) คือ zone จะ clear มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดภายหลังจาก incubate เชื้อแล้วประมาณ 18 ชั่วโมง

4. Virulence gene profiles มีดังนี้: จำนวนสายพันธุ์ที่มี genes *eae*, *tir*, *etpD*, *hlyA* และ *katP* คือ 2, 2, 0, 38, และ 3 strains ตามลำดับ โดย isolates ที่ให้ผลบวก *eae* gene (encode intimin adhesin) คือ TC3 และ TC12 ซึ่งทั้งสอง isolates นี้ให้ผลบวก *tir* gene (encode translocated intimin receptor ซึ่งเป็น type III secretion system) และเป็น serogroup *O15* ทั้งสองสายพันธุ์

5. ทุก isolates ที่มี *hlyA* gene (38 isolates) ผลิต hemolysin ได้โดยจะเห็นลักษณะของ hemolysis เมื่อเลี้ยงบน human blood group O agar ยกเว้น isolate TC3 ซึ่งตรวจพบ *hlyA* gene แต่ไม่ผลิต hemolysin (Hly)

6. เมื่อพิจารณา isolates จากการมี virulence genes ต่างๆ คือ chromosomal genes: *stx-1*, *stx-2*, *eae* และ *tir* และ plasmid genes คือ *hlyA*, *katP* และ *etpD* แล้วพบว่าสามารถแยก isolates ได้เป็น 8 กลุ่ม (ตารางที่ 2.7) โดย predominant profile คือ profile ที่ 1 (*stx*^{1+,2+}, *eae*⁻, *tir*⁻, *etpD*⁻, *hlyA*⁺ และ *katP*⁻) ซึ่งมีถึง 22 isolates

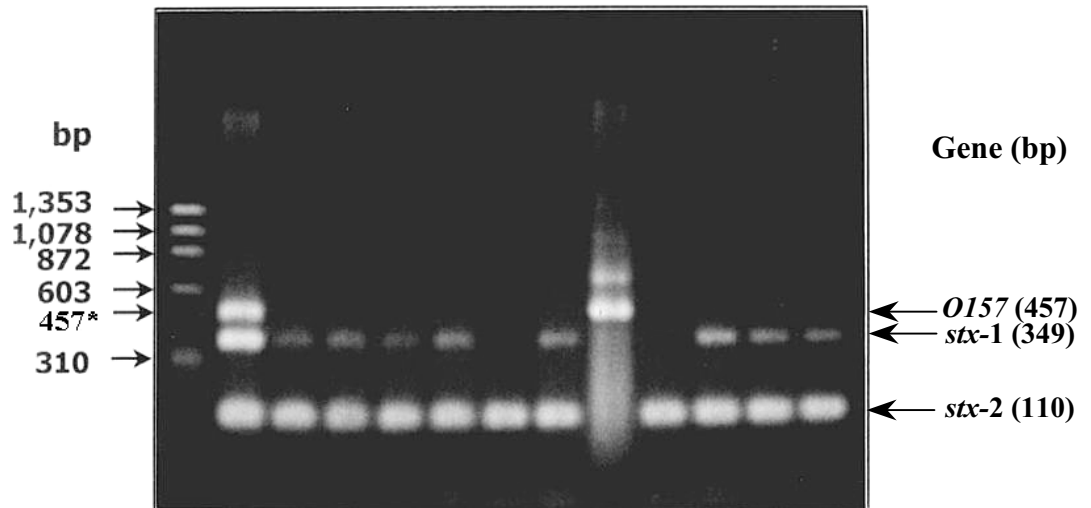
7. ทั้ง 49 isolates มีความไวต่อยาปฏิชีวนะตาม criteria ของ National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ยกเว้น TC12 isolate ซึ่งดื้อยา ampicillin, chloramphenicol และ trimethoprin/ sulfamethoxazole

ตารางที่ 2.7 Eight groups of virulence gene profiles and serogroups of strains of each profile

Group	Number (%)	Serogroup (No.)	Virulence genes						
			<i>stx-1</i>	<i>stx-2</i>	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>etpD</i>	<i>hlyA</i>	<i>katP</i>
1	22 (44.9)	ONT (14)	+	+	-	-	-	+	-
		Rough (3)							
		O8 (3)							
		O27 (1)							
		O29 (1)							
2	2 (4.08)	O15 (2)	-	+	+	+	-	+	-
3	1 (2.04)	O157 (1)	-	-	-	-	-	+	-
4	10 (20.41)	ONT (5)	-	+	-	-	-	+	-
		O8 (2)							
		O15 (1)							
		O142 (1)							
		O152 (1)							
5	3 (6.12)	ONT (1)	+	-	-	-	-	+	-
		O8 (2)							
6	3 (6.12)	ONT (3)	-	+	-	-	-	-	+
7	7 (14.29)	ONT (6)	-	+	-	-	-	-	-
		O168 (1)							
8	1 (2.04)	ONT (1)	+	-	-	-	-	-	-

8. จากทั้งหมด 49 isolates พบว่าสามารถจัดแบ่ง 46 isolates ออกได้เป็น 9 plasmid profiles ส่วนอีก 3 isolates ไม่มี plasmid ใดๆ (ผลจากการสกัด 5 ครั้ง) จำนวน plasmid จากแต่ละ strains ผันแปรจาก 1-8 plasmids และมีขนาดต่างๆ กัน จาก 1-9 kb (ตารางที่ 2.8)

9. จากการศึกษาด้วย ERIC-PCR พบว่าสามารถแยกทั้ง 49 isolates ตาม amplimers ที่ได้จาก ERIC-PCR ออกเป็น 14 profiles (ตารางที่ 2.9) คือให้ bands 3-6 bands และมีขนาดตั้งแต่ <100 ถึง 3,000 bp



รูปที่ 2.14 The *stx*-1, *stx*-2 and *O157* LPS amplicons at 110, 349 and 457, respectively

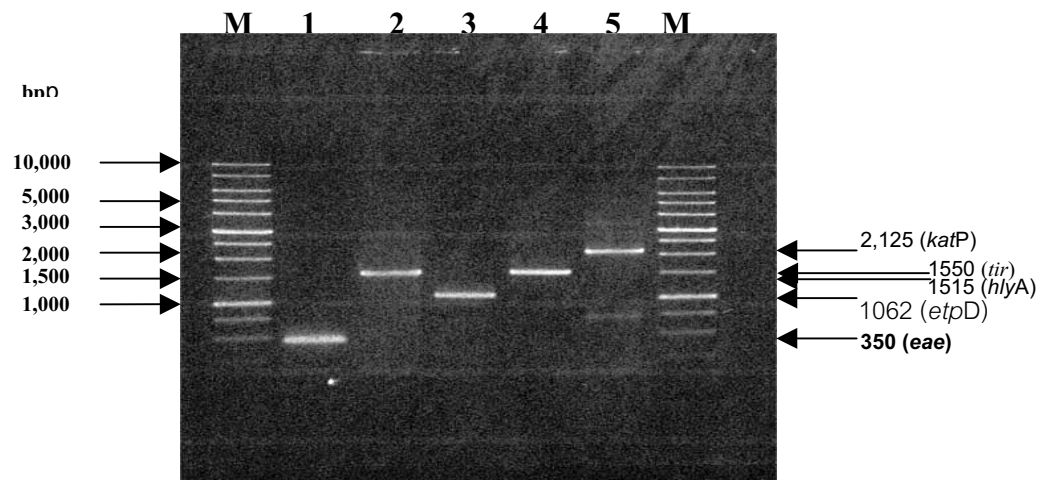
M, DNA markers

Pos, Positive control (*O157* amplicon at 457 bp, and *stx*-1 and *stx*-2 amplicons at 349 and 110 bp, respectively)

Lanes 1-4, 6, 9-11, positive *stx*-1 and *stx*-2 (stx^{1+} , stx^{2+})

Lanes 5 and 8, positive *stx*-2 only (stx^{1-} , stx^{2+})

Lane 7, positive *O157* (stx^{1-2-} , *O157*)



รูปที่ 2.15 **The representative amplicons of STEC virulence genes on 0.8% agarose gel electrophoresis**

M, 1 kb marker; Lane 1, the 350 bp amplicon of *eae* gene; Lane 2, the 1,550 bp amplicon of *tir* gene; Lane 3, the 1,062 bp amplicon of *etpD* gene; Lane 4, the 1,515 bp amplicon of *hlyA* gene; Lane 5, the 2,125 bp amplicon of *katP* gene

Numbers at the left are sizes of DNA in basepairs

ตารางที่ 2.8 The overall results of plasmid profiles

Profile	Number positive (%)	Number of plasmid (s)	Plasmid size (kb)
1	1 (2.04)	5	9,7.5, 7, 1.4, 1
2	5 (10.20)	8	9, 8, 7.5, 7, 5, 4.5, 1.4, 1
3	1 (2.04)	1	5
4	2 (4.08)	2	5 , 2.5
5	3 (6.12)	2	9, 8
6	17 (34.69)	1	9
7	7 (14.29)	2	8, 4.5
8	2 (4.08)	2	8, 5
9	8 (16.33)	4	8, 5.5, 5, 4
No plasmid	3 (6.12)	0	-

ตารางที่ 2.9 Overall results of ERIC-PCR

Profile	Number(%)	Number of band (s)	DNA fragments size (kb)
1	26 (53.07)	3	1.2, 0.25, 0.1
2	2 (4.08)	4	1.2, 1, 0.2, 0.1
3	1 (2.04)	6	2, 1.2, 0.7, 0.35, 0.2, 0.1
4	2 (4.08)	3	1, 0.2, 0.1
5	1 (2.04)	4	1.2, 0.5, 0.2, 0.1
6	1 (2.04)	3	1.2, 0.3, 0.1
7	1 (2.04)	5	2.5, 1, 0.35, 0.2, 0.1
8	1 (2.04)	3	1.2, 0.2, 0.1
9	5 (10.21)	3	0.7, 0.2, 0.1
10	2 (4.08)	6	2.5, 1.5, 1.2, 0.3, 0.2, 0.1
11	4 (8.16)	4	2.5, 1, 0.2, 0.1
12	1 (2.04)	5	2.5, 1.2, 1, 0.2, 0.1
13	1 (2.04)	4	1.2, 0.3, 0.2, 0.1
14	1 (2.04)	4	1.2, 0.25, 0.2, 0.1
Total	49 (100)		

References

- Acheson DWK. Nomenclature of enterotoxins. *Lancet* 1998; 351: 1003.
- Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistage food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 3013-7.
- Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG, Baron R, Kobayashi J. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *JAMA* 1994; 272: 1349-53.
- Bettelheim KA, Brown JE, Lolekha S, Echeverria P. Serotypes of *Escherichia coli* that hybridized with DNA probes for genes encoding Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and serogroup O157 enterohemorrhagic *E. coli* fimbriae isolated from adults with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 293-5.
- Bettelheim KA, Thompson CJA. New method of serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification. *J Clin Microbiol* 1987; 25(5): 781-786.
- Boyce TG, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 364-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Brown JE, Echeverria P, Taylor DN, Seriwatana J, Vanapruks V, Lexomboon U, Neill RN, Newland JW. Determination by DNA hybridization of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 291-294.
- Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 248-50.

- Chaicumpa W, Thin-inta W, Khusmith S, Tapchaisri P, Echeverria P, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M. Detection with monoclonal antibody of *Salmonella typhi* antigen 9 in specimens from patients. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1824-30.
- Chaicumpa W, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Wilairatana P, Srimanote P, Mahakunkijcharoen Y, Looareesuwan S, Sakolvaree Y. Immunogenicity of liposome-associated and refined antigen oral cholera vaccines in Thai volunteers. *Vaccine* 1998a; 16: 678-84.
- Chaicumpa W, Srimanote P, Sakolvaree Y, Kalambaheti T, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Eampokalap B, Moolasart P, Nair GB, Echeverria P. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. *J Clin Microbiol* 1998b; 36: 3595-600.
- Chandler ME, Bettelheim KA. A rapid method of identifying *Escherichia coli* H antigens. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Avt Orig*, 1974; A229: 74-9.
- Chapman PA. Isolation, identification, and typing of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. *PHLS Microbiology Digest* 1994; 11: 13-17.
- Chapman PA, Siddons CA, Zadik PM, Jewes L. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1991; 35: 107-10.
- Chongsa-nguan M, Nair GB, Ramamurthy T, Yamasaki S, Chaisri U, Tongtawe P, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Mahakunkijcharoen Y, Kurazono H, Hayashi H, Takeda Y, Chaicumpa W. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolation from cattle in Bangkok. *Abstracts of The Fourth International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-producing Escherichia coli*, 2000; Abstract # 107, Kyoto, Japan.
- Clement JD, Finkelstein RA. Immunological cross-reactivity between heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect Immun* 1978; 21: 1036-9.
- Cubbon MD, Coia JE, Hanson MF, Thomson-Carter FM. A comparison of immunomagnetic separation, direct culture and polymerase chain reaction for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in human faeces. *J Med Microbiol* 1996; 44: 219-22.

- Datz M, Janetzki-Mittmann C, Franke S, Gunzer F, Schmidt H, Karch H. Analysis of the EHEC O157 DNA region containing lambdoid phage gene p and Shiga-like toxin structural genes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 791-7.
- Fitzpatrick M. Hemolytic uremic syndrome and *E. coli* O157. *BMJ* 1999; 318: 684-5.
- Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2188-91.
- Galfre G, Howe SC, Milstein C, Butcher GW, Howard JC. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 1977; 266: 550-2.
- Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 656-662.
- Gentry MK, Dalrymple JM. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella* toxin. *J Clin Microbiol* 1980; 12: 361-6.
- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 60-98.
- Hedemashi J, *et al.* Molecular typing of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 isolates in Japan by using PFGE. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1675-80.
- Hii JH, Gyles C, Morooka T, Karmali MA, Clarke R, DeGrandis S, Brunton JL. Development of Verotoxin 2 and Verotoxin 2 variant (VT2v)-specific oligonucleotide probes on the basis of the nucleotide sequence of the B cistron of vt2v from *Escherichia coli* E32511 and B2F1. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2704-9.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7839-43.

- Karmali MA, Petric M, Bielaszewska M. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxin) in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 396-9.
- Karmali MA, Petric M, Steele BT. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983; i: 619-20.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Plerning PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985; 151: 775-82.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977; 18: 775-9.
- Kurazono H, Sasakawa C, Yoshikawa M, Tekeda Y. Cloning of a Vero toxin (VT1, Shiga-like toxin 1) gene from a *vt1*-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44: 23-6.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Le Saux N, Spika JS, Friesen B, Johnson L, Melnychuk D, Anderson C, Dion R, Rahman M, Tostowarky W. Ground beef consumption in non-commercial settings is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J Infect Dis* 1993; 167: 500-2.
- Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotype that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987; 156: 175-182.
- Louie M, de Azavedo J, Clarke R, Borczyk A, Lior H, Richter M, Brunton J. Sequence heterogeneity of the *eae* gene and detection of Verotoxin-producing *Escherichia coli* using serotype-specific primers. *Epidemiol Infect* 1994; 112: 449-61.
- Martin A P, Wendy J, Rasik K, Alexander B. Epidemiologic subtyping of *E. coli* serogroup O157 strains isolate in Ontario by phage typing and PFGE. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2366-8.

- McQuigge M, Ellis A, Stratton J, Aramini J, Middleton D, Jamieson F, Ciebin B, Majowicz S, Middleton B, Patterson D, Paton J. A large outbreak of *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter* infections due to contaminated municipal drinking water. *The Fourth International Symposium and Workshop on Shiga-Toxin (Verocytotoxin) - Producing Escherichia coli Infections*. Oct. 29- Nov. 2, 2000, Kyoto, Japan.
- Meng J, Zhao S, Zhao T, Doyle MP. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157: H7 isolates by pulse-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J Med Microbiol* 1995; 42: 258-63.
- Mogbal NE, Ferreira MAS, Howie AJ, Milford DV, Raafat F, Taylor CM. The late histologic findings in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1998; 133: 220-3.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Megraud, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 995-8.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Micro Rev* 1998; 11: 142-201.
- Newland JW, Neill RJ. DNA probes for Shiga-like toxin I and II and for toxin-converting bacteriophages. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1292-7.
- Pal A, Ghosh S, Ramamurthy T, Yamasaki S, Tsukamoto T, Bhattacharya SK, Nair GB, Takeda Y. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta India. *Indian J Med Res* 1999; 110: 83-85.
- Paton AW, Paton JC, Goldwater PN, Manning PA. Direct detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in primary fecal cultures using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 3063-7.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assay for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb* O157. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 598-602.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* 1938; 27: 493-7.

- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med* 1983; 308: 681-5.
- Ro O, Sunao I, Shu-ichi N, Akimito W, Shiro Y, Haruo W. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phage from enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 isolates. *J Med Microbiol* 2000; 49: 565-74.
- Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 189-96.
- Schmidt H, Geitz C, Tarr PI, Frosch M, Karch H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genotypic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J Infect Dis* 1999; 179: 115-23.
- Smith HR, Scotland SM. Isolation and identification methods for *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-producing strains. *J Clin Pathol* 1993; 46: 10-7.
- Suthienkul O, Brown JE, Seriwatana J, Tienthongdee S, Sastravaha S, Echeverria P. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 1990; 53: 2394-6.
- Takeda Y, Kurazono H, Yamasaki S. Vero toxins (Shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-producing *E. coli*). *Microbiol Immunol* 1993; 37: 591-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4.
- Udo K, Fiona M, Thomsan C, Pennington TH. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by PFGE and comparison with that by bacteriophage typing. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 959-61.

- Uesaka Y, Otsuka Y, Lin Z, Yamasaki S, Yamaoka J, Kurazono H, Takeda Y. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb Pathog* 1994; 16: 71-6.
- Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides; extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbo Chem* 1965; 5: 83-91.
- Willshaw GA, Smith HR, Scotland SM, Field AM, Rowe B. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding Verocytotoxins: comparison of cloned sequences determinating VT1 and VT2 and development of specific gene probes. *J Clin Microbiol* 1987; 133: 1309-17.
- WHO. Manual of national workshop on transfer of appropriate technology for diagnosis and surveillance of shigellosis (Myanmar, Thailand, Nepal, Sri Lanka, Bangladesh). *South East Asia Regional Office, Bangkok* 1989.
- Yutsudo T, Kurazono H, Sasakawa C, Yoshikawa M, Iwaya M, Takeda T, Takeda Y. Cloning of a Vero toxin (VT2) gene from a *vt2*-converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 1987a; 48: 273-276.
- Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of a Vero toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically unrelated to Shiga toxin. *Microb Pathog* 1987b; 3: 21-30.
- Zadik PM, Chapman PA, Siddons CA. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J Med Microbiol* 1993; 39: 155-8.

โครงการย่อยที่ 3

**การเตรียมส่วนประกอบของวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ชนิดกิน
และทดสอบประสิทธิภาพของแอดจูแวนท์ชนิดใหม่**

**(Preparation of Oral Cholera Vaccine Component and Efficacy
Testing of New Vaccine Adjuvant)**

โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 1

การผลิต *V. cholerae* O1 Toxin co-regulated pili (Tcp) โดยพันธุวิศวกรรมเพื่อเตรียม fimbriae (pilin) ปริมาณมากสำหรับใช้เป็น oral cholera vaccine component

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียม probe จาก *V. cholerae* classical biotype, Inaba serotype

Nucleotide sequence ของ pilin subunit (*tcpA*; toxin co-regulated pilus) ได้มาจาก gene bank database; accession number M33514 Oligo primers 1 คู่ ได้เลือกมาเพื่อการสร้าง PCR product ขนาดประมาณ 500 bp ซึ่ง PCR product นี้นำไปใช้ในการเตรียม PCR probe โดยขั้นตอนการเตรียมจะใส่ DIG labelling ลงใน master mix และ PCR probe นี้จะนำไปใช้ในการ screening genomic DNA library ต่อไป

การออกแบบ PCR primers

tcpA DNA

					position
AAAAAATAAA	AAACACAGCA	AAAATGACAT	CTGTCAATTG	TAGGTGACTT	50
TGTGTGGTTA	AATGTGCGTG	TTGCTTACGT	TATCTAAAAA	AGACCAAGCG	100
ACGCATTCT	TTAAAGACAG	TAAAATGGTG	GAGTTACATA	AATATGCAAT	150
TATTTAAACA	GCTTTTAAAG	AAGAAATTTG	TAAAAGAAGA	ACACGATAAG	200
AAAACCGGTC	AAGAGGGTAT	GACATTACTC	GAAGTGATCA	TCGTTCTAGG	250
<u>CATTATGGGG</u>	<u>GTGGTTTCGG</u>	CGGGGGTTGT	TACTCTGGCG	CAGCGTGCGA	300
TTGATTGCGA	GATTATGACC	AAGGCCGCGC	AAAGTCTCAA	TAGTATCCAA	350
GTTGCACTGA	CACAGACATA	CCGTGGTCTA	GGTAATTATC	CAGCAACAGC	400
TGATGCGACA	GCTGCTAGTA	AGCTAACTTC	AGGCTTGGTT	AGTTTAGGTA	450
AAATATCATC	CGATGAGGCA	AAAAACCCAT	TCAATGGTAC	AAATATGAAT	500
ATTTTTTCAT	TTCCGCGTAA	TGCAGCAGCT	AATAAAGCAT	TTGCAATTTC	550
AGTGGATGGT	CTGACACAGG	CTCAATGCAA	GACACTTATT	ACCAAGTTCG	600
GTGATATGTT	CCCATATATT	GCAATCAAAG	CTGGTGGCGC	AGTAGCACTT	650
GCAGATCTAG	GTGATTTTGA	GAATTCTGCA	GCAGCGGCTG	AGACAGGCGT	700
TGGTGTGATC	<u>AAATCTATCG</u>	<u>CTCCCGCTAG</u>	TAAGAATTTA	GA TCTAACGA	750
ACATCACTCA	CGTTGAGAAA	TTATGTAAAG	GTACTGCTCC	ATTCGGCGTT	800
GCATTTGGTA	ACAGCTAATT	CAAATAAGTT	TGTTAACTT	AATCTTAACG	850
TTGCCCATTA	AATAATGGGC	AACTTATTAA	ATTCAATGTG	GTATCAATAT	850
GAGAAAATAC	CAACAAGGTG	TCGGATTATT	GGAGGCGATT	CTGGCTTCTG	900
CGTATTAGGG	ATGGCATTGG	TCGCTGCTGG	GAGCTATTAC	AAGCGGGAAG	1000
CTGAACTCAT	GATTAAATCC	AGTAACGCAT	TTGATGTTAT	TGAGTTGT	1050

P-1 forward primer design from position 253 to 271

5'..... TTA TGG GGG TGG TTT CGG3'

P-2 Reverse primer design from position 713 to 731 in the reverse complement view

5'..... GCG GGA GCG ATA GAT TTG3'

ขนาดของ PCR product คือ 475 bp

การเตรียม DIG-labeling PCR probe

ในการศึกษาครั้งนี้ DNA probe ที่ใช้ในกระบวนการ Southern hybridization และ colony hybridization สร้างขึ้นโดยวิธี PCR จาก oligo primers ที่ออกแบบไว้ข้างต้น และ genomic DNA จาก *V. cholerae*, classical biotype strain 569B จะสังเกตว่า gene *tcpA* ที่นำมาศึกษาและออกแบบ primer เป็นของ classical biotype จึงได้ใช้ genomic DNA จาก strain 569B ซึ่งเป็น classical biotype เช่นเดียวกันมาเป็น template ได้เคยทดลองใช้ genomic DNA จาก strain O17SR EI Tor biotype เป็น template แต่คู่ oligo primers ที่เลือกไว้ไม่สามารถ amplify O17SR ได้ แสดงว่าลำดับ nucleotide sequence ของ *tcpA* จาก *V. cholerae* ทั้งสอง biotypes นั้นมีความแตกต่างกัน

ปฏิกิริยา PCR เพื่อการเตรียม probe มีส่วนประกอบดังนี้

2.5	μl	2mM dNTPs
2.5	μl	10 × <i>Taq</i> buffer
0.5	μl	10 × DIG labeling nucleotide (DIG-dUTP) (Roche)
1.0	μl	primer I
1.0	μl	primer II
17.25	μl	DW
0.25	μl	<i>Taq</i> polymerase enzyme
25.0	μl	total volume

Amplification cycle จะทำซ้ำ 35 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วย

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	เป็นเวลา 1 นาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55°C	เป็นเวลา 1 นาที
Extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	เป็นเวลา 1 นาที

PCR product ที่ได้นำไปแยกโดย agarose gel electrophoresis แล้วตัด PCR product ออกจาก gel และนำไปละลายใน hybridization buffer ให้ได้ความเข้มข้นของ DNA ประมาณ 50-100 ng/ml

2. Southern hybridization ของ PCR probe ที่สร้างจาก *tcpA* *V. cholerae* ของ classical biotype

นำ Genomic DNA จาก *V. cholerae* ทั้ง classical และ EI Tor biotypes ไปย่อยด้วย restriction enzyme ต่าง ๆ ซึ่งมีอยู่ใน multiple cloning sites ของ plasmid vector pBluescript II KS ดังนี้; *Bam*HI, *Cl*al, *H*incII, *H*indIII, *E*coRI, *E*coRV, *X*baI แล้วจึงนำ genomic DNA เหล่านี้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน agarose gel และทำการ transfer DNA ไปยัง nylon membrane โดยวิธี capillary transfer ตามวิธีที่รายงานโดย Southern *et al.* (1975) ผลจากการทดลองนี้ทำให้เราทราบขนาดและชนิดของ restriction enzyme-fragments ของ DNA ที่ gene *tcpA* ตั้งอยู่ เมื่อเลือกได้ว่าจะ

clone ชิ้นส่วน DNA ชนิดใด จะได้สร้าง genomic library ของชิ้นส่วน DNA ที่ตัดด้วย restriction enzyme ชนิดนั้น ๆ

จากรูปที่ 3.1 ชิ้นส่วน DNA จาก *V. cholerae* El Tor biotype strain O17SR ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I และ *Hinc*II มีขนาดประมาณ 4.5 kb อันเป็นขนาดที่เหมาะสมในการโคลน ในที่นี้ได้เลือกทำการโคลน *Cla*I-DNA เนื่องจาก *Cla*I เมื่อย่อย DNA จะได้ชิ้นส่วนที่เป็น sticky end ซึ่งจะง่ายในการโคลน ในขณะที่ *Hinc*II จะได้ชิ้นส่วน DNA ที่เป็น blunt end ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการ ligation ของชิ้นส่วนเหล่านี้ไม่ดีเท่าที่ควร จากผล Southern hybridization เหล่านี้ จึงได้เลือกที่จะโคลน ชิ้นส่วน DNA ซึ่งได้จากการที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I

ข้อสังเกตจากผล Southern hybridization คือ probe ที่สร้างขึ้นจาก *V. cholerae* Classical biotype สามารถที่จะ hybridize ต่อ El Tor biotype แสดงว่า *tcpA* ของทั้งสอง biotypes มีความคล้ายคลึงกัน แม้ว่าจะไม่ identical แต่ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะโคลน *tcp* จาก El Tor biotype, Ogawa serotype ซึ่งได้มีรายงานการระบาดในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา

3. การสร้าง library ของชิ้นส่วน genomic DNA ของ *V. cholerae* El Tor biotype, strain O17SR ที่ตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I

เตรียม Genomic DNA จาก *V. cholerae* O17SR จากเชื้อที่เลี้ยงใน liquid medium เป็นเวลา 18-24 ชม. โดยวิธี CTAB precipitation ซึ่งรายงานโดย Ausubel *et al.* (1993) แล้วนำ genomic DNA ที่ได้ไปตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I เป็นเวลา 24 ชม. ต่อจากนั้นหยุดปฏิกิริยาของ enzyme โดยนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 15 นาที

เตรียม DNA จาก plasmid pBluescript II KS โดยวิธีซึ่งรายงานโดย Birnboim *et al.* (1979) แล้วนำ plasmid DNA ไปตัดด้วย restriction enzyme *Cla*I เป็นเวลา 24 ชม. แล้วกำจัดโมเลกุล PO₄ ส่วนปลายของสาย DNA ออก โดยให้ทำปฏิกิริยากับ calf intestine alkaline phosphatase 1 unit ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นกำจัด alkaline phosphatase enzyme ออกจาก DNA โดยสกัดด้วยสารละลาย phenol ปริมาตรเท่าตัวของ DNA แล้วจึงใช้สารละลาย chloroform ปริมาตรเท่าตัว สกัดสาร phenol ที่หลงเหลืออยู่ในสารละลาย DNA ต่อจากนั้นจึงตกตะกอน DNA โดยวิธี ethanol precipitation โดยการใส่ 3 M sodium acetate, pH 4.6 ในปริมาตร 1/10 ของสารละลาย DNA และใส่ absolute ethanol ในปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย DNA ต่อมาจึงปั่นตะกอน DNA ใน microcentrifuge ที่ 13,000 × *g* เป็นเวลา 15 นาที หลังจากล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol แล้วจึงทำให้แห้ง และละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 20-40 µl

ปฏิกิริยา ligation เพื่อเชื่อมต่อ plasmid DNA กับ genomic DNA ข้างต้นของ *V. cholerae* O17SR ทำโดยใช้ enzyme T4 DNA ligase (Roche) โดยใช้ plasmid vector ในปริมาณ 10 ng และ insert DNA ในสัดส่วน 1 : 3 (vector : insert) โดยใช้ enzyme 1-5 unit ในปริมาตร 20 µl และ

incubate ที่ 16°C เป็นเวลา 16-18 ชม. ต่อมานำ preparation ไปทำแห้งโดย vacuum centrifugation แล้วจึงล้าง DNA pellet ด้วย 70% ethanol ทำให้แห้งแล้วจึงละลายในน้ำกลั่น 20 µl ต่อมานำ preparation ปริมาตร 2 µl มาใช้ในกระบวนการ transformation ไปสู่ electrocompetent *E. coli* DH5α โดยใช้เครื่อง Electroporator EC-100 แล้วนำ *E. coli* cells ที่ถูก transform ไป recover ใน SOC medium โดยเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงนำไป spread ใน LB agar ที่ประกอบด้วย 100 µg/ml Ampicillin และ 0.16 µg/ml X-gal. Library ที่มี DNA insert จะปรากฏเป็น colonies สีขาว และส่วน colony สีน้ำเงินซึ่งเป็นเซลล์ที่มีแต่ vector จากการทำการทดลองพบว่า มีสัดส่วนของ colony สีขาวมากกว่า 70% ซึ่ง library ที่ได้นำไปใช้ในกระบวนการ colony hybridization เพื่อการ screen หา clone ที่มี *tcpA*

4. Colony hybridization

วัสดุ สารเคมีและสารละลาย buffer ที่ใช้

Nitrocellulose membrane; diameter 82 mm (Whatmann)

Hybridization buffer

0.1% N-laurylsarcosine Na-salt

0.02% SDS

5% milk powder in 5 × SSC solution

Denaturation solution; 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

Neutralization solution; 1.0 M Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 M NaCl

2 × SSC buffer; 0.3 mM NaCl, 30 mM sodium citrate, pH 7.0

Proteinase K; 2 mg/ml Proteinase K in 2 × SSC buffer

Low stringency washing solution; 2 × SSC, 0.1% SDS

High stringency washing solution; 0.1 × SSC, 0.1% SDS

Anti-Digoxigenin-AP* (750 units/ml Anti-Digoxigenin, Fab fragments conjugated to alkaline phosphatase [Roche])

NBT solution (75 mg/ml nitroblue tetrazolium salt in 70% dimethylformamide [v/v])

BCIP solution (50 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate [BCIP], toluidinium salt in 100% dimethylformamide)

Washing buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween-20 [v/v])

Blocking solution (5% skim milk in 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)

Detection buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5)

Colony lift

ทำการ spread *E. coli* cell library ลงบน LB agar plate โดยให้ได้จำนวน colonies ประมาณ 100-300 ต่อ plate หลังจาก incubate ข้ามคืนแล้วจึงใช้ nitrocellulose membrane disc (Whatmann เส้นผ่าศูนย์กลาง 82 mm) วางบนผิว LB agar เพื่อ transfer colony ไปยัง membrane ต่อจากนั้นนำแผ่น membrane ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย denaturation 5 นาที สารละลาย neutralization 15 นาที และสารละลาย $2 \times \text{SSC}$ 10 นาที โดยการนำกระดาษกรอง Whatmann 3 mm ไปทำให้เปียกด้วยสารละลายข้างต้นแล้ววางแผ่น membrane ลงบนกระดาษกรองนั้น ให้ colony อยู่ด้านบน ต่อจากนั้นจึงทำการกระบวนการ cross-linked DNA โดยนำไปอบใน vacuum oven ที่ 80°C เป็นเวลา 30 นาที

Proteinase K treatment

นำแผ่น membrane ที่อบแล้วนี้ไปทำให้เปียกด้วยสารละลาย $2 \times \text{SSC}$ แล้วใส่สารละลาย proteinase K (2 mg/ml) ปริมาตร 0.5 ml ลงบนแผ่น membrane และ incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชม. ต่อจากนั้นล้างเอา cell debris ออกด้วยสารละลาย $2 \times \text{SSC}$

Hybridization

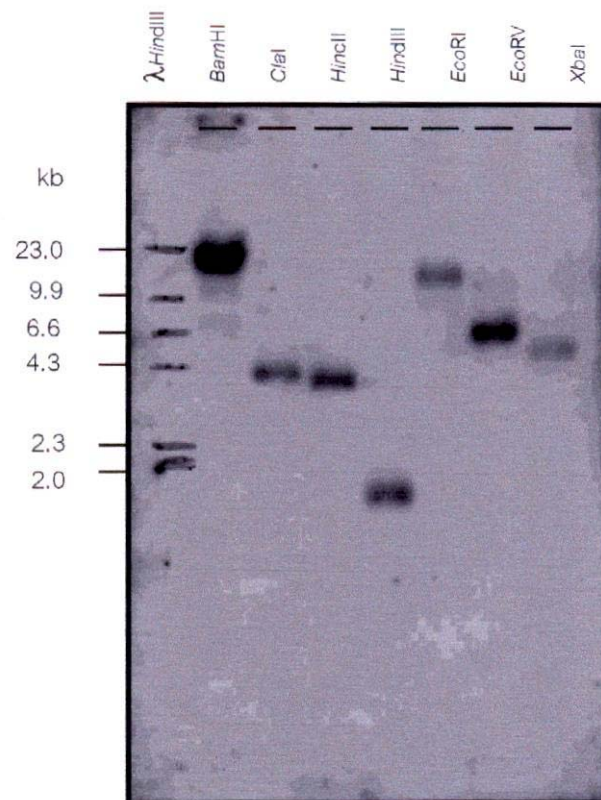
นำแผ่น membrane ไปทำ pre-hybridization โดย incubate กับ hybridization buffer ที่ 68°C เป็นเวลา 1-2 ชม. แล้วนำไป incubate กับ DIG-labeling PCR probe ที่ 68°C เป็นเวลา 16-18 ชม.

Stringency washes

หลังจากกระบวนการ hybridization นำแผ่น membrane ไปล้างด้วย low stringency washing solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วย high stringency washing solution ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 15 นาที อีก 2 ครั้ง

Colorimetric detection

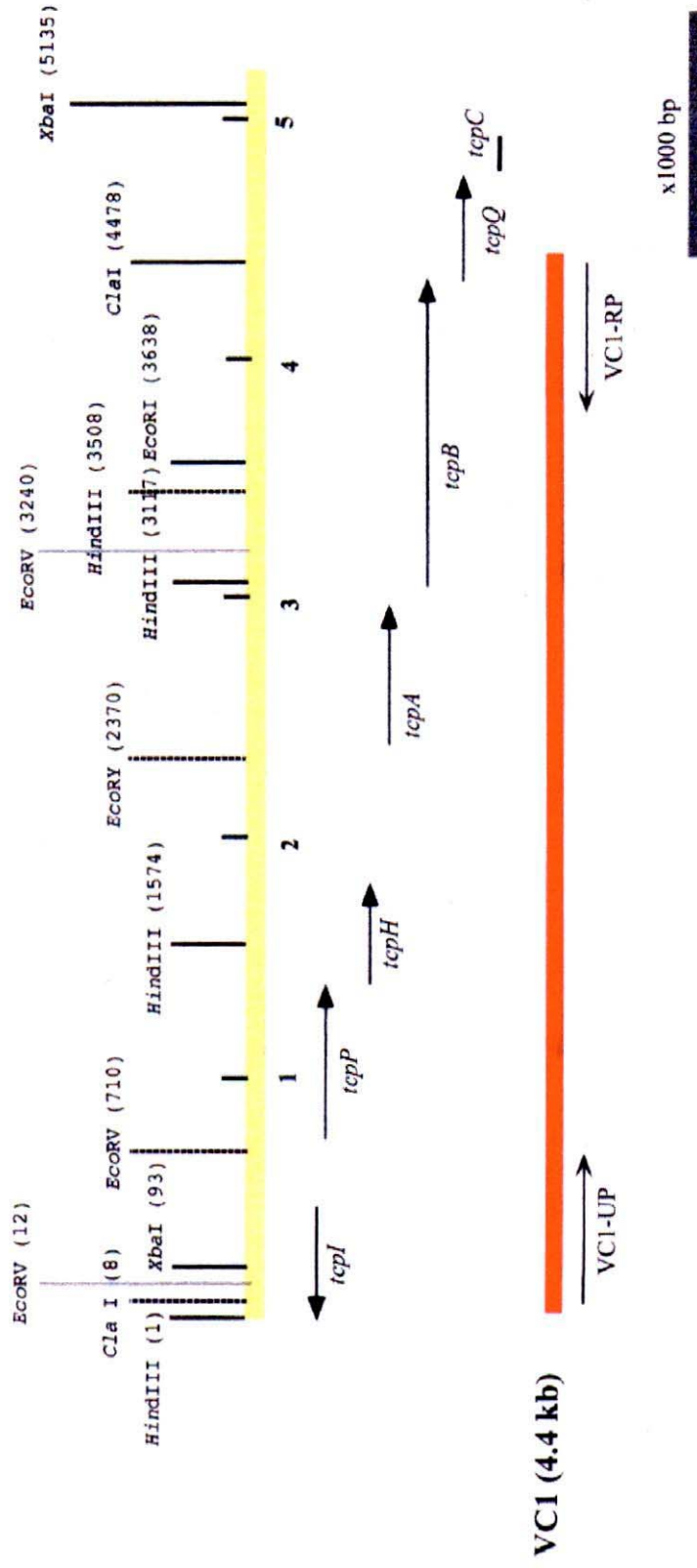
ล้างแผ่น membrane ด้วย buffer I แล้วนำไป incubate ใน blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อมานำ membrane ไป incubate ในสารละลาย anti-dioxigenin-alkaline phosphatase ที่ความเจือจาง 1: 10,000 ใน blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นล้าง membrane ด้วย washing buffer 2 ครั้ง และนำไปแช่ใน buffer III (detection buffer) ก่อนที่จะใส่ color substrate ซึ่งเตรียมโดยการผสม NBT solution ปริมาตร 45 μl และ BCIP solution ปริมาตร 35 μl ใน 10 ml buffer III แล้วนำไป run ใน gel electrophoresis membrane ในถุงพลาสติกและเก็บในที่มืดอย่างน้อย 12 ชม. แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น colony ที่ให้ผลบวกจะมีสีม่วง นำ colony เหล่านี้ไป inoculate ลงใน LB broth ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ผสมอยู่แล้วจึงนำ *E. coli* culture นี้ไปสกัดเอา plasmid เพื่อเป็นการยืนยันว่ามียีนส์ *tcpA* อยู่ใน clone ที่เลือกไว้จริง



รูปที่ 3.1

Results of Southern hybridization of PCR probe derived for *tcp* of *V. cholerae* classical biotype, Inaba serotype, strain 569B against some restriction enzyme-digested DNA of *V. cholerae* El Tor biotype strain O17SR.

The positions of *HindIII*-digested lambda DNA size markers (kb) are shown in the most left lane



รูปที่ 3.2 แสดงโครงสร้างของ *tcp* locus จาก *V. cholerae* El Tor biotype (accession no. X 74730)

Nucleotide sequence จาก clone VC1 จะ assembly กับ sequence ของ locus นี้ที่ตำแหน่ง ClaI site และขนาดของ insert ประมาณ 4.4 kb ขนาดเท่ากับข้อมูลจาก gene bank ดังแสดงในรูป

นำ plasmid ที่สกัดจากโคลนที่คาดว่ามี *tcpA* insert ไปตัดด้วย enzyme *ClaI* แล้วนำไป run ใน gel electrophoresis จากนั้นนำ electrophoresis gel ที่มี insert ที่ 4 kb ไปทำ Southern hybridization กับ *tcpA* probe ชิ้นส่วน *ClaI* DNA ที่มีผลบวกเท่านั้นจึงเป็นโคลนที่ต้องการ

5. Automated DNA sequencing

นำ plasmid DNA ของ clone ที่ให้ผลบวกไปยืนยันว่ามี *tcpA* โดยกระบวนการ sequencing โดยใช้ ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit. Oligo primers ที่ใช้เป็น primers มาตรฐานที่มีอยู่ใน pBluescript plasmid vector คือ RP และ UP ซึ่งมีตำแหน่งอยู่คนละข้างของ multiple cloning site ผลจากลำดับ nucleotide ของ plasmid จาก clone VC1 ที่ได้สามารถยืนยันได้ว่า clone นี้มีความคล้ายคลึงกับ *tcp* locus ของ *V. cholerae* จาก Classical biotype accession no. × 74730

6. การ subclone VC1

เพื่อยืนยันความคล้ายคลึงต่อ *tcpA* sequence ของ El Tor biotype และเพื่อหา subclone ที่เหมาะสมที่จะ express protein จาก *tcpA* gene จากการ subclone VC1

การทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหา *tcpA* gene ว่าอยู่ที่ตำแหน่ง restriction site ใด เพราะต้องการที่จะ express เฉพาะส่วน *TcpA* โปรตีนเท่านั้น ในการ subclone ได้ใช้ restriction enzyme 1 ชนิดตัด DNA เป็นชิ้นขนาดเล็กลง แล้วจึงนำไป ligate กับ pBluescript II KS ที่ตัดด้วย restriction enzyme ชนิดเดียวกัน โดยก่อนนำ vector ไป ligate ได้ทำปฏิกิริยา phosphatase กับ vector นั้นเพื่อป้องกัน กระบวนการ re-ligation ของ vector ต่อมานำ ligated DNA ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α จากการเลี้ยง *E. coli* บน LB agar plate เฉพาะ clones ที่มี insert ของ pBluescript II KS เท่านั้น จึงจะขึ้นบน LB agar ที่มี Ampicillin เป็นองค์ประกอบ ต่อมาสกัด plasmid จาก *E. coli* แต่ละ clone แล้วย่อยด้วย restriction enzyme เดียวกันที่ใช้ตัดก่อนทำ ligation นำไป run electrophoresis ซึ่ง electrophoresis profiles จะแสดงให้เห็นขนาดของ insert ในแต่ละ clone

ได้ใช้ universal primer และ reverse primer ของ vector เพื่อหาว่า *tcpA* gene อยู่ที่ subclone ใด ดังแสดงใน **รูปที่ 3.3** *tcpA* gene ที่ครบชุดจะพบใน *EcoRV* insert ขนาดประมาณ 0.8 kb เมื่อวิเคราะห์ DNA sequence ของ clone นี้ซึ่งชื่อว่า VC7 พบว่ามีขนาดความยาว 869 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์ protein translation พบว่า start codon ATG ซึ่งจะสร้าง methionine เริ่มที่ลำดับเบสที่ 119 และสิ้นสุดที่ลำดับเบสที่ 791 แล้วจึงตามด้วย stop codon TTA ดังแสดงใน **รูปที่ 3.4** โปรดสังเกตว่า VC7 clone มี ribosome binding site หรือ Shine-Dalgarno sequence ที่สมบูรณ์ โปรตีนจาก VC7 clone ประกอบด้วย 224 amino acids และมี molecular weight 23234 daltons ข้อ

สังเกตเกี่ยวกับ promoter region ที่ควบคุม expression ของ VC7 clone ดังแสดงใน รูปที่ 3.5 plasmid map ของ pBluescript II KS พบว่า start codon ของ *tcpA* อยู่ภายใต้การควบคุมจาก T7 promotor ไม่ใช่ T3 promoter หรือ *lacZ*

ต่อมาจึงนำ clone VC7 ไปศึกษาว่า จะสามารถ express protein ได้หรือไม่ โดยใช้ pBluescript II KS เป็น negative control ในการนี้เราใช้วิธีการมาตรฐานในการเตรียม whole cell lysate, soluble protein fraction และ insoluble fraction ดังมีรายละเอียดการเตรียมดังนี้

Whole cell lysate เตรียมโดยนำ culture 1 ml ไป centrifuge ที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาทีหลังจากดูด supernatant ทิ้งแล้วนำ pellet ไปละลายใน sample buffer (for SDS-PAGE) 100 μ l

Soluble และ insoluble protein fractions เตรียมโดยนำ culture 1 ml ไป centrifuge ที่ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากดูด supernatant ทิ้งไปแล้วนำ pellet ไปละลายใน lysis buffer (0.1M NaH_2PO_4 , 0.01M Tris-HCl pH8.0; 8M urea) 100 μ l ต่อจากนั้นนำไป mix โดย Vortex และ sonicate ที่ 4°C , 3 ครั้ง ครั้งละ 20 วินาที แล้วจึงนำไป centrifuge ที่ $10,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 20-30 นาที ส่วน supernatant คือ soluble protein fraction และส่วน pellet คือ insoluble fraction นำทั้ง 2 ส่วนนี้ไปต้มใน sample buffer เพื่อทำ electrophoresis ในการแยก proteins ต่อไป

ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ใช้สาร IPTG ในการ induction ทำ เพราะทิศทางของ promoter ที่ควบคุม start codon ของ *tcpA* ไม่ได้มาจาก *lacZ* จากผลการวิเคราะห์ protein fraction ต่างๆ โดย SDS-PAGE ไม่พบความแตกต่างในระหว่าง vector และ VC7 clone แต่อย่างใด

7. การ subclone *EcoRV* insert จาก VC7 เพื่อให้ start codon ของ *tcpA* อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZ*

7.1 การโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ low copy number plasmid, pWSK29

จากผล sequencing และ restriction map ของ pBluescript II KS ได้ตัด VC7 clone ด้วย enzyme *Bam*HI และ *Cla*I ซึ่งจะสามารถตัดแยก vector และ insert ออกจากกัน และขนาดของ insert ประมาณ 800 bp ตามที่คาดไว้ ผล sequencing แสดงได้ว่า ส่วน start codon อยู่ที่ด้าน *Bam*HI site ส่วนของ insert ที่ได้จากการตัดด้วย enzyme ข้างต้น เมื่อนำไปแยกใน agarose gel electrophoresis จะเห็นส่วนของ vector (2.9 kb) และ insert (0.8 kb) ต่อจากนั้นตัดเฉพาะส่วนของ insert ออกจาก gel แล้วจึงทำการ elute DNA ออกมาโดยใช้ QIAEX II Gel extraction kit (QIAGEN) ต่อจากนั้นตัด vector pWSK29 ด้วย enzyme *Bam*HI และ *Cla*I แล้วนำไป ligate กับ DNA insert ที่ extract ออกจาก gel นำ ligation mixture นี้ไป transform เข้า *E. coli* DH5 α host

จากการทดลองนี้เราได้ clone ชื่อ VC13 ซึ่งเมื่อ sequence insert ของ clone สามารถยืนยันได้ว่า เป็น *tcpA* gene จริง และมีทิศทางของ start codon อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZα* (รูปที่ 3.6)

7.2 การโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ pUC18 derived plasmid, pHSG 398 (Takara Biochemical)

เหตุผลที่ผู้วิจัยเลือกใช้ pHSG 398 vector เพราะ vector นี้มีจำนวน copy number ของ plasmid สูงคือ 500-700 copies ใน 1 cell และ pHSG 398 มียีนส์ดื้อยา chloramphenicol (Cm[®]) จึงค่อนข้างง่ายในการโคลน insert จาก VC7 ที่มี Ampicilin resistant gene โดยได้เลือกโคลนที่มีการดื้อยา chloramphenicol เท่านั้น ในการทดลองนี้ได้ตัด insert จาก VC7 และ pHSG 398 vector ด้วย restriction enzyme *EcoRI* และ *HincII* หลังจาก heat-inactivated enzyme ที่ 70°C เป็นเวลา 15 นาที จึงนำ vector และ insert มาต่อกันโดยขบวนการ ligation ต่อมาจึงนำ ligated plasmid ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α host แล้วจึงเลือกเฉพาะ clone ที่เป็น white colony (มี insert) และมีการดื้อยา chloramphenicol ได้ clone ชื่อ VC20, VC21 ซึ่งเมื่อ confirm โดยวิธี sequencing สามารถยืนยันได้ว่ามี *tcpA* gene จริง และมีทิศทางของ start codon อยู่ใต้การควบคุมของ *lacZα* (รูปที่ 3.7)

8. Protein expression ของ clone ที่มี *tcpA* gene และทิศทางของ initiation codon อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย *lacZ* หรือ T3 promoter

การทดลองนี้ใช้ clone ที่มี vector อย่างเดียวเปรียบเทียบกับ clone ที่มี insert ของ *tcpA* และเนื่องจาก clones ต่างๆที่สร้างขึ้นอยู่ในทิศทางของการควบคุมของ *lacZα* ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการ induction ด้วย 1mM IPTG โดยเตรียม overnight culture ใน LB broth 5 ml และเช้าวันรุ่งขึ้น subculture 0.5 ml ของ overnight culture ลงใน LB broth 5 ml หลอดใหม่ นำไป incubate พร้อมเขย่าที่ 200 rpm และ 37°C เป็นเวลา 1-2 ชม. จนกระทั่งได้ OD ประมาณ 0.6 แบ่ง culture 1 ml ไปใช้สำหรับเตรียม pre-induction whole cell lysate แล้วเติม IPTG ลงไปใน culture ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1 mM แล้วจึง incubate ต่ออีกประมาณ 3 ชม. แบ่ง 1 ml เพื่อทำ whole cell lysate และอีก 1 ml เพื่อทำ soluble protein fraction และ non-soluble protein fraction ดังที่ได้อธิบายในหัวข้อที่ 1 รูปที่ 3.8 แสดง protein profiles ของ clone ที่มี insert เปรียบเทียบกับ clone ที่มี vector อย่างเดียว จาก samples ที่เก็บตอนเริ่มต้นก่อน induction และ 3 ชม. หลังจาก induction ด้วย 1 mM IPTG โดย VC13 clone (specimen B) เปรียบเทียบกับ parental vector pWSK29 (specimen A) ส่วน VC20 (specimen D) และ VC21 (specimen E) เปรียบเทียบกับ parental vector pHSG398 (specimen C) ผลการทดลองนี้ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง clone ที่มี insert และ parental vector ใน protein ที่เตรียมจากส่วนต่างๆทั้ง whole cell lysate, soluble และ insoluble protein fractions

9. Protein expression โดยใช้ระบบของ T7 RNA polymerase promoter

การแสดงออกของยีนส์ภายใต้การควบคุมของ T7 RNA polymerase มีข้อได้เปรียบ *E. coli* RNA polymerase หลายประการ เช่นเป็น enzyme ที่ active ซึ่งสามารถที่จะสังเคราะห์ RNA ในอัตราที่สูงกว่า RNA polymerase ของ *E. coli* หลายเท่า โดยมีความถี่ที่น้อยมากในการหยุด transcription นอกจากนี้ T7 RNA polymerase ยังมีความจำเพาะที่จะสังเคราะห์จาก T7 promoter (P_{T7}) เท่านั้น และจะไม่มี การเริ่มต้น transcription จาก promoter sequence อื่นๆของ *E. coli* DNA

ผู้วิจัยใช้ระบบ Two-plasmid system ในกระบวนการ expression โดยระบบแรกใช้ expression vector pBlueScript II KS (Stratagene) ซึ่งมี DNA sequence ของ T7 promoter เป็นองค์ประกอบ จากรูปที่ 3.5 โปรดสังเกตว่า สำหรับ VC7 clone ทิศทางของ start codon ของ *tcp* อยู่ในทิศทางเดียวกับ T7 promoter ส่วน plasmid ในระบบที่ 2 ได้รับความอนุเคราะห์ *E. coli* strain ที่มี plasmid pGP1-2 (Tabor and Richardson, 1985) (E-2096) จาก University of Adelaide, Australia (รูปที่ 3.9) ใน plasmid นี้ enzyme T7 RNA polymerase จะอยู่ใต้การควบคุมของ λp_L promoter และสามารถถูกยับยั้งโดย repressor protein C1857 ซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิ กล่าวคือ ที่อุณหภูมิต่ำ (30°C) repressor protein จะยับยั้งกระบวนการ transcription จาก λp_L promoter ในขณะที่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง (42°C) repressor protein จะถูก inactivate มีผลให้เกิดการสร้าง enzyme T7 RNA polymerase นอกจากนี้ plasmid pGP1-2 ยังประกอบด้วยยีนส์ที่ดื้อยา Kanamycin ซึ่งจะสะดวกในการเลือกโคลนที่มียีนส์ที่ต้องการ

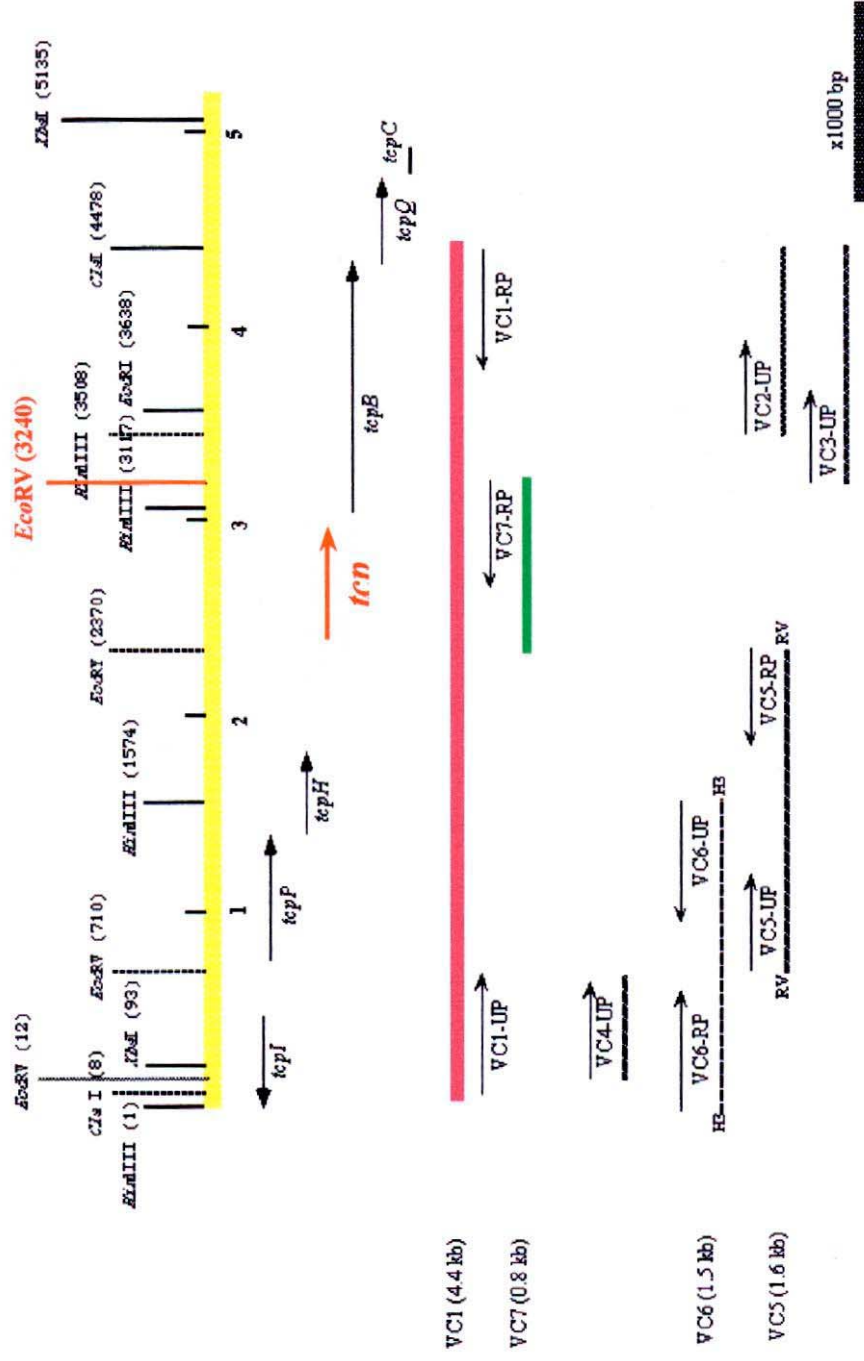
ผู้วิจัยจึง transform gene ที่ต้องการ express เข้าสู่ *E. coli* strain ที่มี plasmid pGP1-2 (E-2096) โดยเตรียม chemical competent ของ E-2096 โดยวิธีของ Hanahan (1970) ข้อควรระวังในการเลี้ยงเชื้อ E-2096 คือต้องพยายามเลี้ยงที่อุณหภูมิไม่เกิน 30°C และ chemical competent cells ที่ได้สามารถเก็บเป็น aliquots ไว้ที่ -70°C ต่อมาจึงทำกระบวนการ transformation gene ที่ต้องการ โดยทดลองเปรียบเทียบกับ parental plasmid vector ซึ่งในที่นี้คือ pBlueScript II KS vector

ในการ transformation เข้า chemical competent cells ได้ใส่ plasmid ปริมาณ 500 ng-1 μg ในปริมาตร 1-5 μl แล้วนำไป incubate กับ chemical competent cells ที่ 4°C เป็นเวลาประมาณ 30-40 นาที ต่อจากนั้นนำ cells ไป heat-shock ที่ 42°C เป็นเวลา 90 วินาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งที่ 4°C อีกเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปใส่ใน LB broth 1 ml นำไป incubate 30°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 1 ชม. ต่อจากนั้นนำไป spread ลงบน selective medium ที่ผสมด้วย Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) และ Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) แล้ว incubate ที่ 30°C , 2-3 วัน colonies ที่ขึ้น บน plates ได้แสดงว่ามี Ampicillin resistant gene จาก pBlueScript ได้ถูกนำเข้าสู่ E-2096 ที่มี Kanamycin resistant gene แล้วนำ clone ที่ได้ไปทำ expression ต่อไป

ในการ express protein ได้เตรียม overnight culture ใน LB broth ปริมาณ 5 ml ที่มี Kanamycin และ Ampicillin ผสมอยู่ เช้าวันต่อมา นำ overnight culture ปริมาตร 100 μ l ไป inoculate ลงใน medium หลอดใหม่ และนำไป incubate ที่ 30°C พร้อมเขย่าเป็นเวลา 3-5 ชม. จนกระทั่ง OD₅₉₀ $\cong$ 0.4 ต่อจากนั้นนำไป incubate ที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเขย่าต่อที่ 37°C จากนั้นเก็บตัวอย่างหลังจาก incubate ที่ 60 นาที 120 นาที และ 150 นาที ตามลำดับ เพื่อนำมาเตรียม whole cell lysates, soluble protein fractions และ insoluble protein fractions เพื่อศึกษาว่ามีการสร้างโปรตีนเป้าหมายเพิ่มใน clone ที่มี DNA insert หรือไม่

รูปที่ 3.10 เปรียบเทียบ expressed proteins ของ *E. coli* strain E-2096 ซึ่งมี pBlueScript II KS vector (**3.10 a**) และ E-2096 ซึ่งประกอบด้วย VC7 clone (**3.10 b**) จะเห็นว่า VC7 clone ซึ่งมี insert ของ *tcpA* สามารถสร้างโปรตีนที่ molecular weight ประมาณ 23 kDa ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนที่คาดหวังที่เสนอไว้ใน **รูปที่ 3.4** โดยเมื่อเทียบกับ E-2096 ที่มี vector อย่างเดียว ไม่มี protein ที่ 23 kDa อย่างชัดเจน

โดยสรุปผู้วิจัยสามารถ express toxin-coregulated pillus protein (TcpA) ซึ่งได้มีรายงานว่า เป็น subunit protein ที่มีความสำคัญในการก่อโรค (pathogenesis) อหิวาต์ โดยเชื้อ *V. cholerae* และ TcpA มีความสามารถในการกระตุ้น host ให้สร้างภูมิคุ้มกัน จึงเป็น vaccine candidate (Attridge *et al.*, 1999) และภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ของ TcpA protein มีความจำเพาะต่อแต่ละ biotype เท่านั้น เช่น ภูมิคุ้มกันต่อ TcpA จาก El Tor biotype จะไม่สามารถป้องกัน host จาก อหิวาต์ที่เกิดจากเชื้อ Classical biotype ได้ (Attridge *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้เลือกที่จะ clone และ express *tcpA* gene จาก El Tor biotype ซึ่งมีรายงานการระบาดในสอง-สามทศวรรษ หลังนี้



รูปที่ 3.3 โครงสร้างของ *tcp* locus จาก *V. cholerae* El Tor, biotype (genebank accessionno. X74730) แสดงตำแหน่งและทิศทางการของ *orf* ต่าง ๆ

ข้อมูลจาก sequencing จากส่วนปลาย 5' และ 3' ของ clone VC1 assembly ที่ตำแหน่ง *ClaI* site และขนาดของ insert ประมาณ 4.4 kb ตรงกับผลการทดลองที่ได้ ส่วนผลจาก sequencing ของ subclones ต่าง ๆ คือ VC2, VC3, VC4, VC5, VC6 และ VC7 ได้ assembly เข้าใน *tcp* locus ตรงตามชนิดของ restriction enzyme ที่ใช้ในการกระบวนกร subcloning โปรดสังเกตว่า *tcpA* gene ซึ่งทำหน้าที่ผลิต subunit ที่สำคัญของ pilin จะอยู่ที่ *EcoRV* fragment ของ VC7 clone

รูปที่ 3.4 Translation of VC7 clone แสดง Open reading frame จากตำแหน่ง base ที่ 119-791

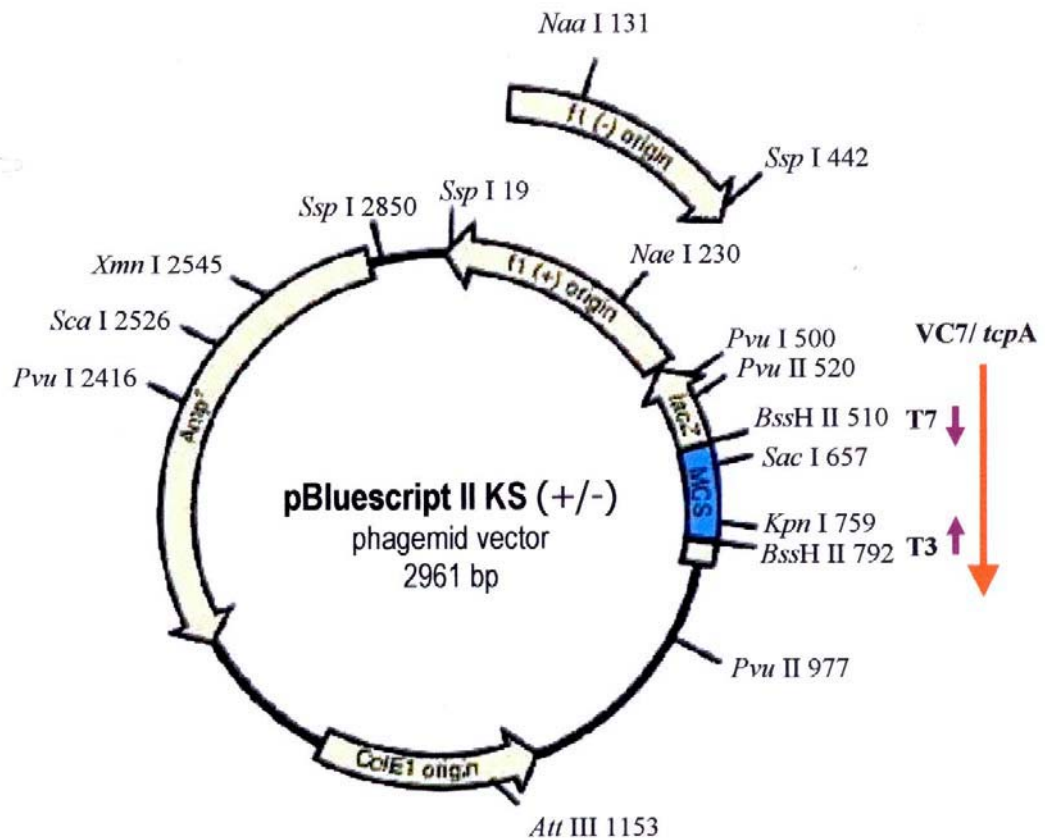
NA	61	TTAAAAAAGGACCAAGCAATGCATTTTCCTTAAACACAAATGGTGGAGTTATATAAATAT
AA	1	M
NA	121	GCAATTATTAAACAGCTTTTTAAGAAGAAGTTTGTAAGAAGAACACGATAAGAAAAC
AA	2	Q L L K Q L F K K K F V K E E H D K K T
NA	181	CGGTCAAGAGGGTATGACATTACTCGAAGTAATCATTGTTCTGGGTATTATGGGTGTGGT
AA	22	G Q E G M T L L E V I I V L G I M G V V
NA	241	CTCAGCGGGTGTGTTACGCTGGCTCAGCGTGCGATTGATTCGCAGAATATGACTAAGGC
AA	42	S A G V V T L A Q R A I D S Q N M T K A
NA	301	TGCGCAAAATCTAAACAGCGTGCAAATTGCAATGACACAACTTATCGTAGTCTTGGTAA
AA	62	A Q N L N S V Q I A M T Q T Y R S L G N
NA	361	TTATCCAGCTACCGCAAACGCAAATGCTGCTACACAGCTAGCTAATGGTTTGGTCAGCCT
AA	82	Y P A T A N A N A A T Q L A N G L V S L
NA	421	TGGTAAGGTTTCAGCTGATGAGGCAAAGAATCCTTTCACTGGTACAGCTATGGGGATTTT
AA	102	G K V S A D E A K N P F T G T A M G I F
NA	481	CTCATTTCCACGAAACTCTGCAGCGAATAAAGCATTTCGCAATTACAGTCGGTGGCTTGAC
AA	122	S F P R N S A A N K A F A I T V G G L T
NA	541	CCAAGCACAATGTAAGACTTTGGTTACAAGCGTAGGGGATATGTTTCCATTTATCAACGT
AA	142	Q A Q C K T L V T S V G D M F P F I N V
NA	601	GAAAGAAGGTGCTTTTCGCTGCTGTCGCTGATCTTGGTGATTTTCGAAACGAGTGTCGCAGA
AA	162	K E G A F A A V A D L G D F E T S V A D
NA	661	TGCTGCTACTGGCGCTGGCGTAATTAAGTCCATTGCACCAGGAAGTGCCAACTTAAACCT
AA	182	A A T G A G V I K S I A P G S A N L N L
NA	721	AACTAATATCACGCATGTTGAGAAGCTTTGTACAGGAAGTCTCCATTCACAGTAGCTTT
AA	202	T N I T H V E K L C T G T A P F T V A F
NA	781	TGGTAACAGTTAATCTACACCATTATCTTGATAATTTAATAATAATTTGCCCATGGAAAT
AA	222	G N S

Universal code; Total amino acid number: 224, MW=23234 daltons

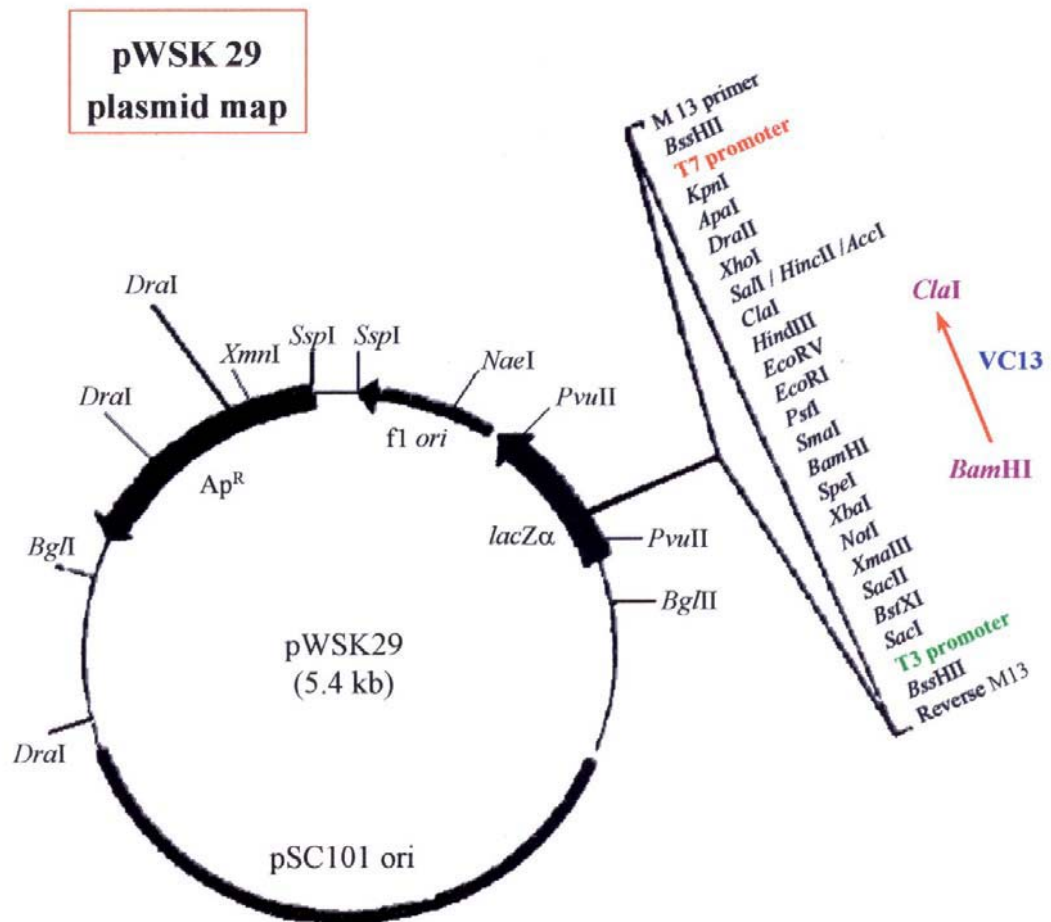
หมายเหตุ NA = Nucleic acid

AA = Amino acid

รูปที่ 3.5 แสดง plasmid vector pBluescript II KS vector ที่ใช้ในการ cloning เข้าใน VC7 ประกอบด้วย *tcpA* gene ที่สมบูรณ์ และทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ T7 promoter

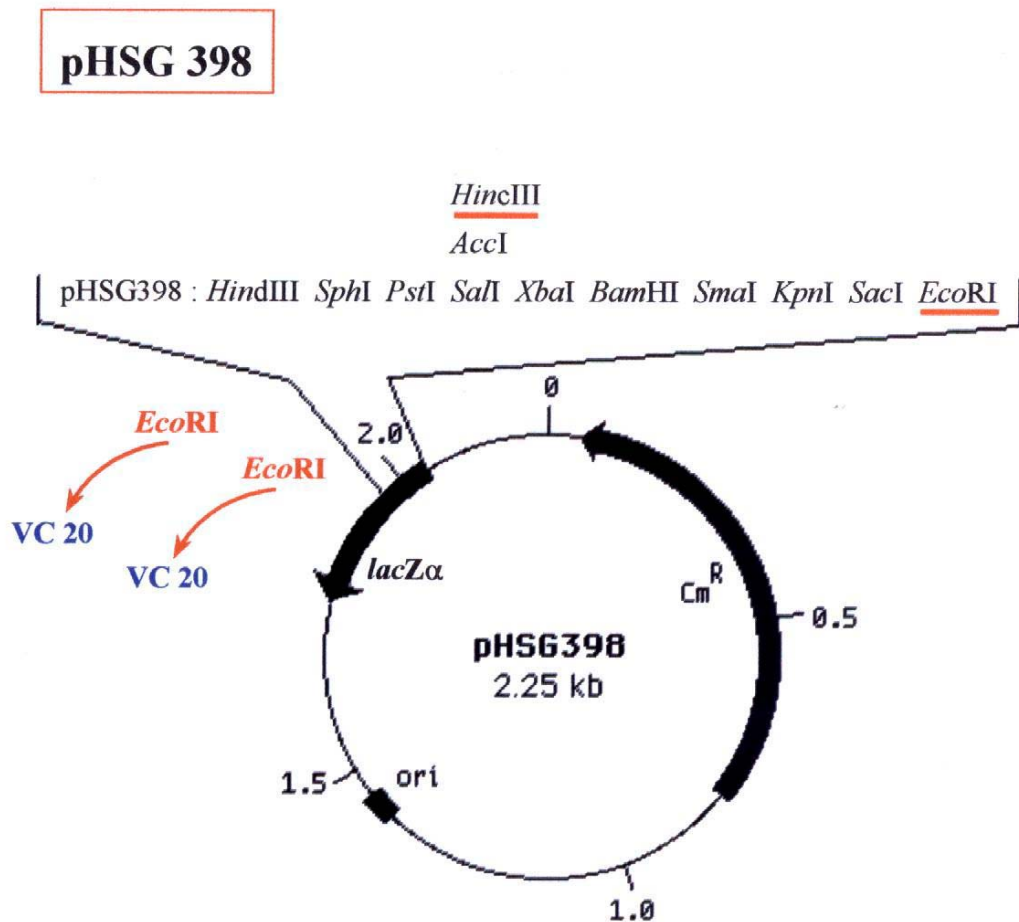


รูปที่ 3.6 แสดง plasmid vector pWSK29 ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ *lacZ α* promoter



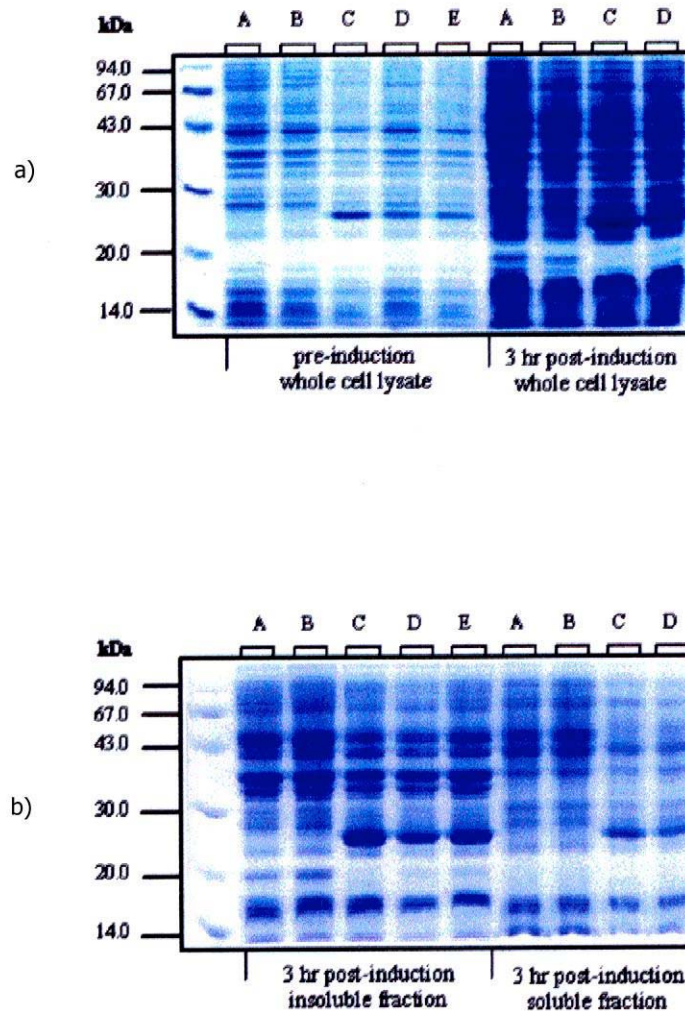
ดังแสดงในรูป clone VC13 ได้มาจากการตัด insert ของ VC7 ด้วย restriction enzyme *BamHI* และ *ClaI* และ clone เข้าสู่ pWSK29 ที่ตัดด้วย enzyme ขุดเดียวกัน

รูปที่ 3.7 แสดง plasmid vector pHSG398 (Takara) ที่ใช้ในการ clone fragment จาก VC7 เพื่อให้ทิศทางของ initiation codon อยู่ในความควบคุมของ *lacZ α* promoter



ดังแสดงในรูป clone VC20 และ VC21 ได้มาจากการตัด insert ของ VC7 ด้วย restriction enzyme *EcoRI* และ *HindII* และ clone เข้าสู่ pHSG398 ที่ตัดด้วย enzyme ชุดเดียวกัน

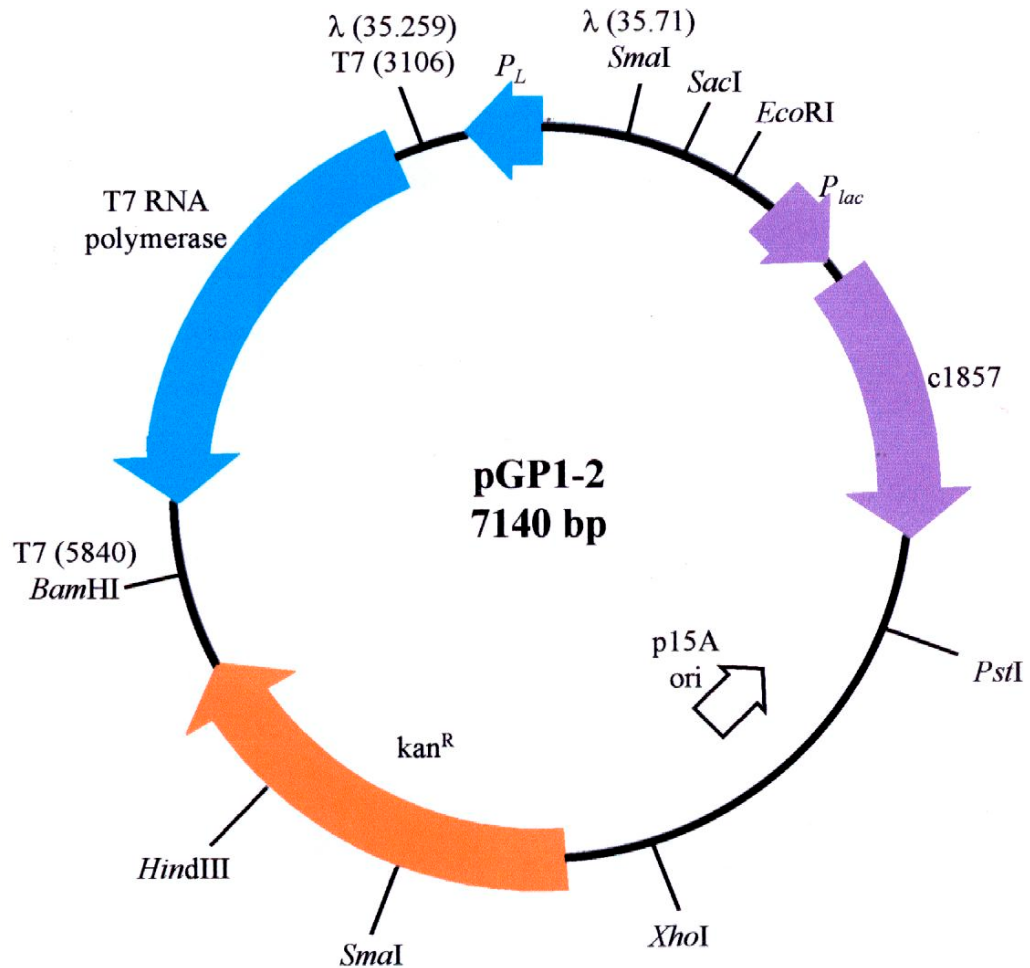
รูปที่ 3.8 แสดง protein expression ใน clone ที่มี gene *tcpA* ที่สมบูรณ์ โดยที่ initiation codon ของ clone เหล่านี้อยู่ในทิศทางที่ควบคุมโดย *lacZ* และอยู่ในทิศทางของ T3 promoter



- A, Clone ที่มีเฉพาะ vector pWSK29
- B, VC13 clone (vector pWSK29 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)
- C, Clone ที่มีเฉพาะ vector pHSG398
- D, VC20 clone (vector pHSG398 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)
- E, VC21 clone (vector pHSG398 ที่มี insert ของ *tcpA* ขนาดประมาณ 0.8 kb)

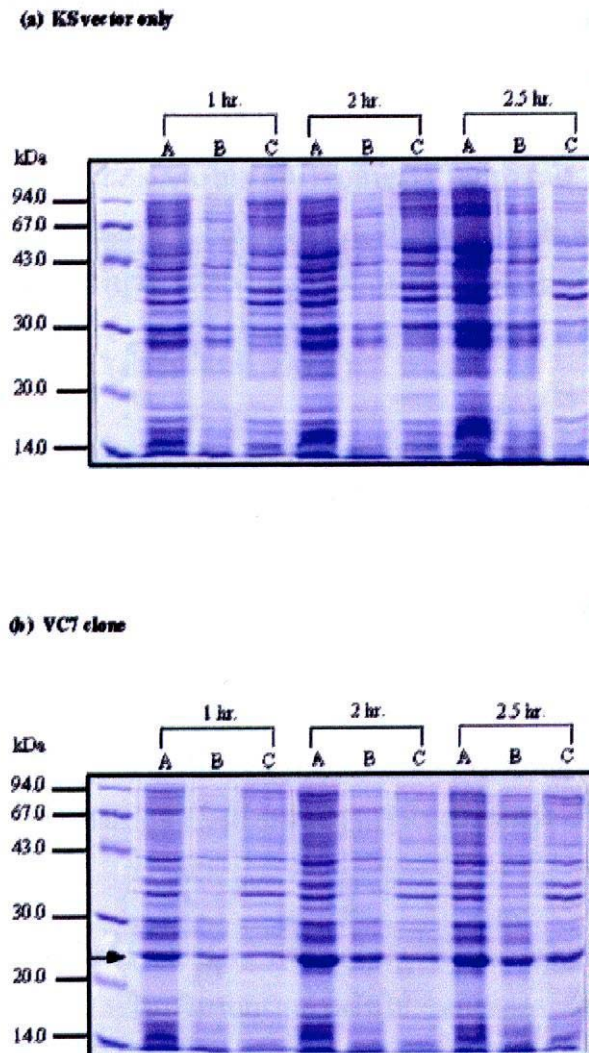
เนื่องจาก clone ต่างๆเหล่านี้ อยู่ภายใต้การควบคุมโดย *lacZ* ดังนั้นจึงมีการ induce ด้วย IPTG 1 mM เมื่อ bacterial cells เติบโตเข้าสู่ exponential phase จากนั้นจึงเปรียบเทียบกับ electrophoresis ของ proteins ที่ได้จาก whole cell lysate, insoluble fraction และ soluble fraction ของ bacterial cells

รูปที่ 3.9 plasmid vector pGP1-2 ประกอบด้วย gene ที่ทำหน้าที่สร้าง T7 RNA polymerase ซึ่งอยู่ใต้การควบคุมของ λp_L promoter



Vector นี้ยังประกอบด้วย gene *c1857* ที่สร้างโปรตีน λ repressor ซึ่งจะ express ภายใต้การควบคุมของ *E. coli lac* promoter ซึ่งที่อุณหภูมิต่ำโปรตีน repressor นี้จะยับยั้งกระบวนการ transcription จาก λp_L promoter อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 42°C repressor protein จะถูก inactivate ซึ่งจะมีผลให้เกิดการ induction ของ λp_L promoter และนำไปสู่กระบวนการสร้าง T7 RNA polymerase

รูปที่ 3.10 Protein expression จาก *E. coli* strain E-2096 ซึ่งได้ transform plasmid จาก pBlueScript II KS (a) และ VC7 (b)



A = whole cell lysate preparation

B = soluble protein fraction

C = insoluble protein fraction ในการทดลองเราเก็บ specimen ที่เวลาต่างๆ คือ 1, 2 และ 2 1/2 ชม. หลังจาก induction ของ enzyme T7-RNA polymerase

โปรตีนสังเกตว่า VC7 clone จะให้ protein ขนาด 23 kDa ที่ชัดเจน ซึ่งไม่พบใน clone ที่มีเฉพาะ vector

10. การพัฒนากระบวนการเพื่อผลิต TcpA protein ในปริมาณมาก

จาก *E. coli* strain E-2096 ที่ประกอบด้วย plasmid 2 ชนิดคือ pGP1-2 และ VC7 ได้ทดลองเพิ่มปริมาณ โดยเลี้ยงใน 50 ml LB broth ที่มี kanamycin 50 µg/ml ใน flask ขนาด 250 ml โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 30°C ก่อน จนได้ OD₅₅₀ ประมาณ 0.6 ต่อจากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปที่ 42°C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อ inactivate repressor protein เพื่อให้มีการสร้าง enzyme T7 RNA polymerase และ enzyme นี้จะกระตุ้น T7 promoter ให้เกิด transcription ของ VC7 plasmid ซึ่งมีส่วนประกอบของ T7 promoter อยู่หน้ายีนส์ *tcpA* ต่อจากนั้นจึงเลี้ยงเชื้อต่อไปที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม ก่อนนำ bacterial culture ไป centrifuge ที่ 8,000 × *g* เป็นเวลา 15 นาที นำ cell pellet ที่ได้ไปละลายใน inclusion body solubilization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 50 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 8 M urea) ในสัดส่วน 3 ml ต่อ bacterial wet weight 1 กรัม ต่อจากนั้นจึงนำไป sonicate เพื่อช่วยให้เซลล์แตกดีขึ้น แล้วนำ cell lysate ที่ได้ไป centrifuge ที่ 10,000 × *g* เพื่อแยกเอา cell debris ออกและนำ supernatant ที่ได้ไป dialyse ในน้ำกลั่น เมื่อนำ crude protein (ใน supernatant) ที่ได้ไปแยกด้วย acrylamide gel electrophoresis พบว่ามี protein band ที่ประมาณ 25 kDa ซึ่งคาดว่าเป็น TcpA ชัดเจน โดยได้ปริมาณโปรตีนจาก LB broth 2 ลิตร ประมาณ 15 กรัม

11. Immunogenicity ของ TcpA protein

ผู้วิจัยได้ immunize หนู mice ด้วย crude bacterial lysate (lysate ของ recombinant *E. coli*) เพื่อศึกษาว่า TcpA สามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองตอบสนองด้วยระบบภูมิคุ้มกันโดยการสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA ได้หรือไม่ (immunogenicity ของ TcpA) โดยได้ immunize ทั้งทาง intraperitoneal และ oral routes ในการ immunize ทาง intraperitoneal route ได้ใช้ crude bacterial lysate ปริมาณ 250 µg โดยผสม immunogen กับ adjuvant และฉีดทั้งหมดสาม doses ห่างกันครั้งละสองสัปดาห์ ใน dose แรกผสม immunogen กับ complete Freund adjuvant และใช้ incomplete Freund adjuvant ใน doses ที่สองและสาม หลังจากฉีดโดสที่สามแล้วหนึ่งสัปดาห์จึงจะเลือดหนูที่ immunized ไปทดสอบหาแอนติบอดีต่อ homologous antigen

สำหรับการ immunize ทาง oral route ได้ใช้ crude bacterial lysate 1 mg ป้อนหนูแต่ละตัว โดยให้ทั้งหมดสามโดสด้วยกันและเว้นระยะห่างแต่ละครั้งสองสัปดาห์ หลังจาก immunize ครั้งสุดท้ายหนึ่งสัปดาห์ได้จะเลือดหนูแต่ละตัวเพื่อนำไปตรวจวัดระดับแอนติบอดีเช่นเดียวกัน (ในการป้อนหนูกลุ่มนี้ได้ให้หนูทดลองกินสารละลาย 5% sodium bicarbonate ปริมาตร 0.1 ml ก่อนป้อน immunogen เพื่อไม่ให้ immunogen ถูกทำลายจากกรดในกระเพาะ)

นอกจากนี้ยังได้ทำ Western blot analysis เพื่อตรวจว่าซีรัมของหนูทดลองที่ถูก immunized ด้วย crude bacterial lysate มีการสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA protein หรือไม่ โดยนำ nitrocellulose membrane ที่ blot ไว้ด้วย SDS-PAGE separated-crude bacterial lysate ไปทำ ปฏิกิริยากับซีรัมของ immunized mice ที่เจือจาง 1:200 (ซีรัมที่จะทดสอบ ได้ถูกนำไป absorbed ด้วย *E. coli* 2096 ก่อนเพื่อลด background antibody ต่อ *E. coli* 2096 ซึ่งเป็น host strain) ผลการทดลองทำ Western blot analysis พบว่า mice ที่ถูก immunized ด้วย TcpA + adjuvant ทาง intraperitoneal route สร้างแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ molecular weight ประมาณ 25 kDa (Figure 3.11, lanes 3 และ 4) โดยไม่พบ antibody นี้ใน serum ก่อน immunize (Figure 3.11, lanes 1 และ 2) ส่วน mice ที่ถูก immunize ทาง oral route ก็สามารถสร้าง antibody ต่อโปรตีนที่ molecular weight ตรงกับที่สร้างใน mice กลุ่มที่ immunized โดย intraperitoneal injection เช่นกัน (Figure 3.11, lanes 7 และ 8)

12. การผลิต purified TcpA protein

ในการศึกษา immunogenicity ของ TcpA มีความจำเป็นต้องใช้ purified TcpA protein ในการตรวจว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นสร้างแอนติบอดีต่อ TcpA จริง ดังนั้นจึงได้พยายาม purified TcpA โดยใช้ Sephadex G-75 gel filtration chromatography และ DEAE 52 anion exchange chromatography แต่ไม่สามารถ purify TcpA ให้บริสุทธิ์ 100% ได้สำเร็จ ต่อมาจึงได้ใช้วิธี affinity column chromatography โดยสร้างโปรตีน TcpA ที่มี histidine 6 โมเลกุลติดอยู่ที่ส่วน C-terminal และ histidines เหล่านี้สามารถจับกับ resin ที่มีโลหะ nickel เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้สามารถ elute โปรตีนที่มีความจำเพาะนั้นๆ ออกมาจาก column ได้ภายหลังจากการล้างเอาส่วนประกอบอื่น ๆ ของ *E. coli* ใน host ที่ไม่จับกับ column ออกไปหมดแล้ว

การวิจัยส่วนนี้มี 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนที่หนึ่งเป็นการโคลน *tcpA* gene เข้าสู่ vector pTrcHis2 (Invitrogen) ที่มี histidine จำนวน 6 โมเลกุลติดอยู่ที่ส่วน C-terminal และเมื่อได้ clone ที่สร้างโปรตีนที่ต้องการแล้ว จึงนำไป induce ให้สร้างโปรตีนปริมาณมากๆ ก่อนนำไปสู่ขั้นตอนที่สองคือการนำโปรตีนไปผ่าน Probond resin affinity column ซึ่งจับได้ดีกับโมเลกุลของ histidine แล้วจึง elute โปรตีนออกมาหลังจากล้างส่วนอื่นที่ไม่จับกับ column ออกไปแล้ว

ในขั้นตอน cloning ได้นำ plasmid จาก VC7 clone มาตัดด้วย restriction enzymes *Bam*HI และ *Xho*I แล้วนำไป clone เข้าสู่ vector สามชนิด คือ pTrcHis2A, pTrcHis2B และ pTrcHis2C ซึ่ง vector สามชนิดนี้มีความแตกต่างกันที่ส่วนของ multiple cloning site อันเป็นผลให้ reading frames ของโปรตีนที่จะ transtate ออกมาต่างกัน ได้นำ vector ทั้งสามชนิดนี้มาตัดด้วย enzyme ทั้งสองชนิดข้างต้นคือ *Bam*HI และ *Xho*I แล้วนำมา ligate กับ 0.8 kb DNA fragments ของ VC7 clone ที่ elute ออกมาจาก agarose gel ต่อมาจึงนำ ligated DNA ไป transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α host แล้ว screen หา clone ที่ได้โดยการเตรียม plasmid (miniprep) แล้วตัด plasmid DNA ด้วย restriction enzyme *Bam*HI และ *Xho*I และได้เลือก

โคลนที่มี insert นำไป express โดยทำการ induce ด้วย 1 mM IPTG ในช่วง early log phase growth ของ recombinant clone แล้ว culture ต่อไปอีก 2 ชม จนถึง late log phase จากนั้นจึงนำแบคทีเรียจาก clone ต่างๆไปเตรียม whole cell lysates แล้วตรวจว่ามีการสร้าง recombinant protein จาก insert DNA หรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับ whole cell lysate จาก vector ตัวเดียวกันที่ไม่มี insert

ในการ clone *tcpA* gene เข้าไปยัง vector ทั้งสามชนิด พบว่า *tcpA* insert ที่ clone เข้าสู่ pTrcHis2A เท่านั้นที่สร้าง recombinant protein จาก Figure 3.12 จะเห็นว่า clone ที่มีเพียง vector pTrcHis2A ก่อน (lane 1) และหลัง (lane 2) การ induce ด้วย 1 mM IPTG จะไม่มีการสร้างโปรตีนพิเศษใดๆ เพิ่มขึ้นจากโปรตีนปกติ แต่โปรตีนจาก clones A3, A5, A6 ที่มี *tcpA* insert พบว่ามีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 25 kDa เมื่อการ induce ด้วย 1 mM IPTG (lanes 4, 6, และ 8) และเปรียบเทียบกับ protein profile ก่อน IPTG induction (lanes 3, 5 และ 7)

เมื่อพบว่า recombinant clone สามารถ express โปรตีนเป้าหมายได้แล้วจึงนำ *E. coli* clone มาเลี้ยงเพื่อเตรียม cell lysate ขั้นตอนการเตรียมโดยย่อ คือนำ bacterial culture ที่ induce ด้วย 1 mM IPTG 50 ml ไป centrifuge ให้ได้ cell pellet แล้วจึงนำไปละลายใน guanidinium lysis buffer, pH 7.8 ปริมาตร 10 ml โดยปล่อยให้ cell lysis ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ต่อจากนั้นจึงนำไป sonicate ในที่เย็น เพื่อ shear DNA และ RNA ก่อนนำไป centrifuge เพื่อแยก cell debris ออกไป แล้วนำส่วน supernatant มาแบ่งเป็น 2 ส่วนๆละ 5 ml เพื่อทำ affinity column ต่อไป

นำ *E. coli* lysate 5 ml แรกมา incubate กับ Invitrogen's Probond resin เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ polyhistidine-tagged protein จับกับ nickle บน resin แล้วทิ้งให้ resin ตกตะกอนลงมาเอง (หรืออาจใช้ low speed centrifugation; $800 \times g$ ก็ได้) ต่อจากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำออกไป และนำ 5 ml lysate ส่วนที่ 2 ทำซ้ำข้างต้น หลังจากนั้นล้าง protein อื่นๆ ที่ไม่จับกับ nickle บน resin ดังนี้

- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing binding buffer (ปริมาตร 4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 7.8)
- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing wash buffer 6.0 (4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 6.0)
- ล้าง 2 ครั้งด้วย denaturing wash buffer 5.3 (4 ml $\times$ 2) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 5.3)

ขั้นตอนสุดท้ายคือการ elute protein เป้าหมายออกมาจาก column ด้วย denaturing elution buffer 4.0 (5 ml) (8M urea, 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 4.0) โดยเก็บแยก elute เป็น fractions (1 ml) และนำแต่ละ fraction ไปวัด OD₂₈₀ ว่ามี protein ถูก elute ออกมาจริง ต่อจากนั้นนำโปรตีนในแต่ละ fraction มา dialyse ใน 10 mM Tris, pH 8.0, 0.1% Triton X-100 เพื่อกำจัด urea ออกไป แล้วนำแต่ละ fraction ไปตรวจดู protein profile ด้วยวิธี SDS-PAGE เพื่อดูว่า protein บริสุทธิ์ที่ต้องการอยู่ที่ fraction ใด จาก Figure 3.13 จะเห็นว่า protein profile ของ fractions 1 และ 2 ที่ถูก elute จาก affinity column มีโปรตีนขนาด 25 kDa ซึ่งน่าจะเป็น TcpA

13. การเตรียม recombinant cholera toxin (rCT) และ procholera toxin (P)

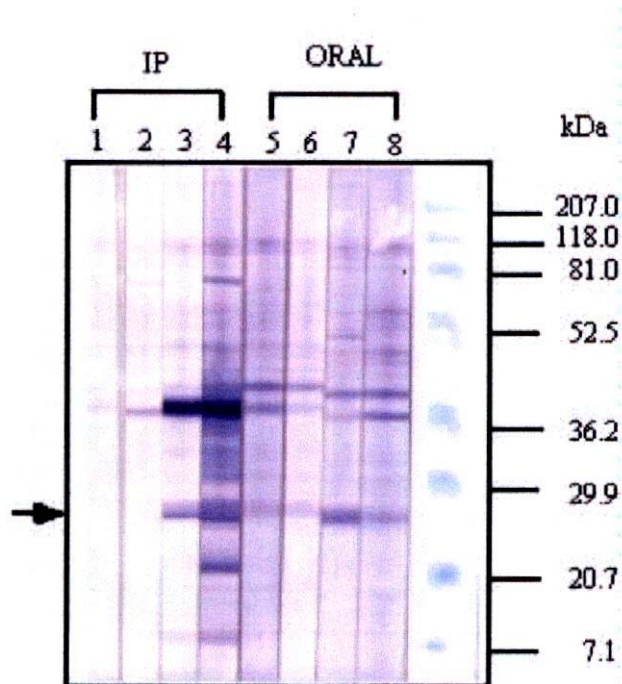
ส่วนประกอบหลักของ oral cholera vaccine ที่คณะผู้วิจัยได้เสนอไว้คือ lipopolysaccharide, TcpA (fimbriae) และ procholera toxin (P) ซึ่ง P ก็คือ heat-inactivated, high molecular weight cholera toxin (CT) ซึ่งส่วนที่เป็นพิษคือ A-subunit จะถูกทำลายไปเกือบหมด เหลือ B-subunit ซึ่งเป็น immunogen ที่สำคัญของ oral vaccine ที่จะกระตุ้นให้ร่างกายของโฮสต์สร้างแอนติบอดีต่อ B-subunit ซึ่งจะขัดขวางการจับของ CT กับ GM1 ganglioside ผู้วิจัยได้ใช้ recombinant *E. coli* strain MC1061 ซึ่งผลิต cholera toxin (CT) ได้ในปริมาณมากมาใช้เป็น source ของ cholera toxin โดยใช้วิธีการเตรียม cholera toxin ซึ่งได้อธิบายไว้โดย Uresaka *et al.*, 1994 ซึ่งสรุปได้โดยย่อคือเลี้ยง *E. coli* strain MC1061 ใน LB broth ที่มี ampicillin ผสมอยู่ 100 µg/ml โดยเขย่าเชื้อที่ 37°C ข้ามคืน แล้วจึงเก็บ cell pellet โดย centrifugation ต่อจากนั้นนำ cell pellet มาละลายใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งผสม 0.9% NaCl แล้วนำ bacterial cell suspension ไป sonicate เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้น centrifuge เพื่อแยก cell debris ออกไปก่อนนำส่วน supernatant ไปตกตะกอนโปรตีน โดยเติมสาร ammonium sulfate ให้ได้ความเข้มข้น 65% saturation (516 g/litre) แล้วจึงเก็บตะกอนโปรตีนที่ได้โดย centrifuge ที่ 10,000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนโปรตีนที่ได้นำไปละลายใน TEAN buffer (50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 0.2 M NaCl, 3 mM NaN₃, 1 mM EDTA) แล้วนำไป dialyse ข้ามคืน ใน buffer เดียวกันนี้ โปรตีนที่ได้นำไปผ่าน immobilized galactose column และเนื่องจาก B-subunit ของ CT มีน้ำตาล galactose จึงสามารถจับกับ column นี้ได้ ต่อจากนั้นล้างโปรตีนอื่นๆ ของ *E. coli* host ออกไปให้หมดด้วย TEAN buffer จนกระทั่ง eluate มีค่า OD₂₈₀ เป็น 0 ต่อจากนั้นจึง elute CT ออกจาก immobilized column ด้วย 0.5 M galactose ใน TEAN buffer และเก็บ 1 ml fractions นำมา dialyse ในน้ำกลั่น และตรวจดู protein profile ด้วยวิธี SDS-PAGE จะเห็นจาก Figure 3.14 ว่า CT ที่ถูก elute ออกมาเมื่อนำไปต้มใน sample buffer ที่มี 2-mercaptoethanol ผสมอยู่จะได้ protein bands ที่ molecular weights 30 และ 10 kDa ซึ่งตรงกับ น้ำหนักของ A และ B subunits ของ CT ตามลำดับ

Recombinant CT protein ที่ผลิตได้นี้เมื่อนำไป heat-inactivated เพื่อทำลายส่วน A-subunit ซึ่งเป็นส่วน active toxin ที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงเรียกว่า procholeraegenoid (P) ซึ่งจะใช้เป็นส่วประกอบของ oral cholera vaccine สำหรับการวิจัยในขั้นต่อไป

โครงการย่อยที่ 3 ส่วนที่ 2:

การทดสอบประสิทธิภาพของ liposome และ CpG DNA

องค์ประกอบของ oral cholera vaccine ที่เสนอโดยคณะผู้วิจัยจะประกอบด้วย fimbriae หรือ toxin co-regulated pili protein (TcpA), procholeraeoid และ lipopolysaccharide จาก *V. cholerae* O1 ผู้วิจัยจะทดสอบวัคซีนโดยใช้ adjuvant 2 ชนิด คือ liposome และ CpG DNA ว่า adjuvants ทั้งสองชนิดนี้จะสามารถเพิ่ม immunogenicity ของ vaccine ได้หรือไม่ โดยจะทำการทดลองในหนู rat และจะตรวจว่าหนูเหล่านี้สร้างแอนติบอดีต่อ immunogen แต่ละอย่างมาก-น้อยเพียงใด โดยจะตรวจดูจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดี (plasma cells) ที่มีความจำเพาะต่อ immunogen แต่ละชนิด ใน lamina propria tissue section

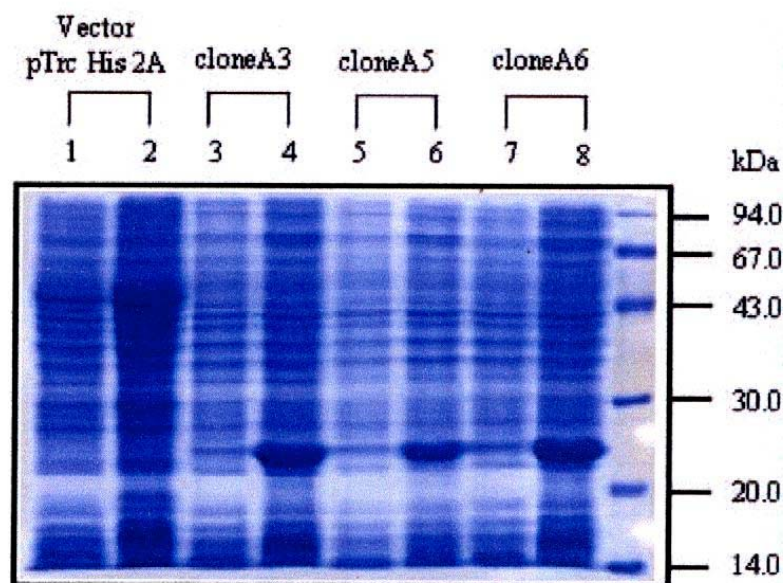


รูปที่ 3.11 Western blot analysis ของ mouse serum ต่อ bacterial lysate ของ *E. coli* clone ที่ผลิต TcpA protein

หนูกลุ่มแรกถูก immunize โดยทาง intraperitoneal route; Lanes 1 และ 2 เป็น serum samples ของหนูปกติก่อนถูก immunize ด้วย TcpA + adjuvant ทาง intraperitoneal route และ lanes 3 และ 4 เป็น serum samples ของหนูสองตัวเต็มหลังจากถูก immunized ด้วย TcpA แล้ว 3 doses

หนูกลุ่มที่สองถูก immunized โดยทาง oral route; Lanes 5 และ 6 เป็น serum samples ก่อนได้รับ immunogen และ lanes 7 และ 8 เป็น serum samples หลังจาก immunized แล้ว 3 doses

ลูกศรชี้ตรงระดับ protein band ที่คาดว่าจะจะเป็น band ของ immuno complex ของ TcpA protein กับแอนติบอดี



รูปที่ 3.12 แสดง SDS-PAGE patterns ของโปรตีน ของ expression vector pTrcHis2A ที่มีและไม่มี insert ของ *tcpA* gene

lane 1, bacterial lysate ของ *E. coli* strain ที่มี vector pTrcHis2A ก่อน IPTG induction

lane 2, bacterial lysate ของ *E. coli* strain ที่มี vector pTrcHis2A หลัง IPTG induction

lane 3, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A3 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 4, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A3 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

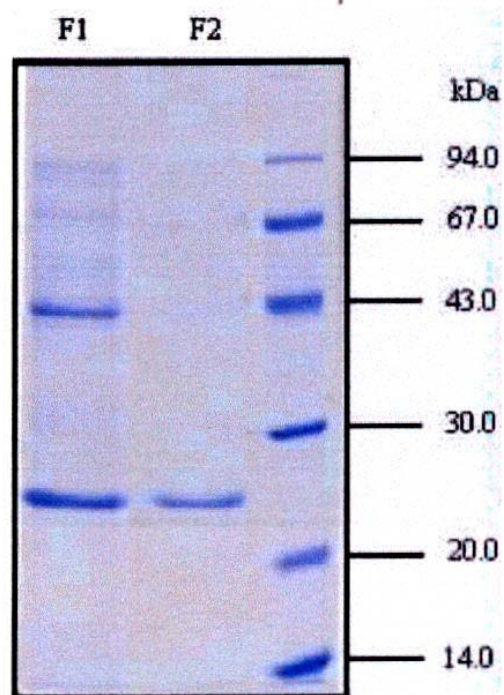
lane 5, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A5 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 6, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A5 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

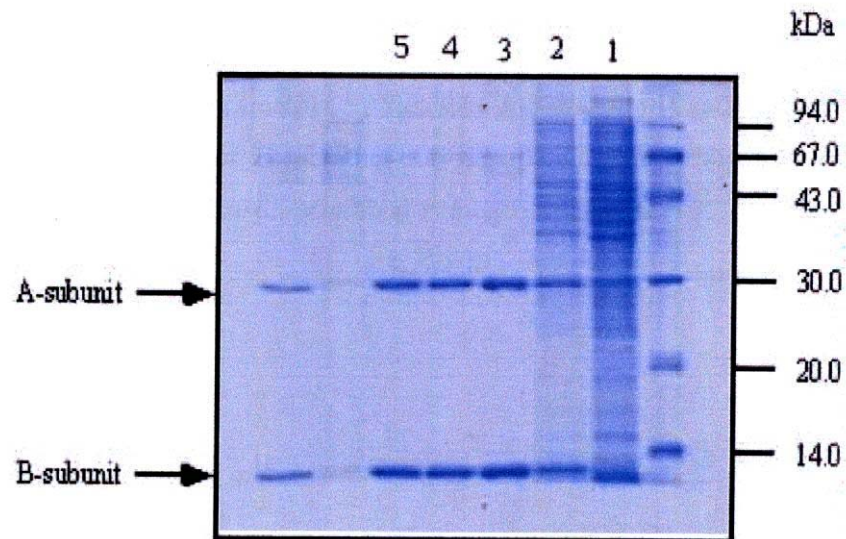
lane 7, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A6 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert ก่อน IPTG induction

lane 8, bacterial lysate ของ *E. coli* strain A6 ที่มี pTrcHis2A และ *tcpA* insert หลัง IPTG induction

Lane ขวาสุดคือ standard molecular weights



รูปที่ 3.13 Protein profile ของ purified TcpA protein fractions 1 (F_1) และ 2 (F_2) ที่ถูก elute จาก Probond Nickle affinity column ซึ่ง purified protein มี molecular weight ประมาณ 25 kDa



รูปที่ 3.14 แสดง protein profiles ในขั้นตอนการเตรียม recombinant CT

Lane 1, protein profile ของ *E. coli* MC1061

Lanes 2-5, protein profiles จาก fractions ต่างๆ ที่ elute ออกมาจาก immobilized galactose column

ลูกศรชี้ bands ของ CT-A ($\approx 30\text{kDa}$) และ CT-B ($\approx 10\text{ kDa}$) subunits

วัคซีนอหิวาต์ซึ่งประกอบด้วย immunogens สามชนิดนี้ได้นำไปทดสอบหา immunogenicity ในสัตว์ทดลองคือ rat model ใน formulations ต่างๆกันคือ:

- Vaccine 1:** ประกอบด้วย TcpA, P, LPS (immunogens), liposomes (delivery vehicle) และ CpGDNA (ODN#1826) ซึ่งทำหน้าที่เป็น adjuvant ทั้งนี้โดยใช้ TcpA 5 mg, P 200 µg, LPS 5 mg, CpGDNA 100 µg [โดยเตรียม liposomes จาก cholesterol และ sphingomyelin ตามวิธีของ Chaicumpa *et al.* (1990)] ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 2:** ประกอบด้วย immunogens ทั้งสามชนิด (คือ TcpA, P และ LPS โดสเท่ากับ vaccine 1), liposomes และ non-CpGDNA (ODN#1928) (100 µg) ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 3:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ liposomes โดยไม่มี CpGDNA (ODN#1826) โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 4:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ CpGDNA (ODN#1826) โดยไม่มี liposomes โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 5:** ประกอบด้วย TcpA, P และ LPS และ non-CpGDNA (ODN#1928) โดยไม่มี liposomes โดสเท่ากับ vaccine 2 ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Vaccine 6:** ประกอบด้วย immunogens ทั้งสามชนิด (TcpA, P และ LPS) เท่านั้น โดสเท่ากับ vaccine 1 ใน 3 ml 5% NaHCO₃

นอกจากนี้ได้เตรียม Placebos อีกสามสูตรคือ

- Placebo 1:** ประกอบด้วย liposomes เพียงอย่างเดียว ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Placebo 2:** ประกอบด้วย CpG DNA (ODN#1826) เพียงอย่างเดียว (100 µg) ใน 3 ml 5% NaHCO₃
- Placebo 3:** ประกอบด้วย 5% NaHCO₃ solution ปริมาตร 3 ml ซึ่งใช้เป็น diluent ของ vaccine ทุก formulation ใน 3 ml 5% NaHCO₃

การเตรียม recombinant TcpA

ใช้ VC7 clone ซึ่ง carry *tcpA* gene ที่ ligated อยู่กับ vector pBluescript II KS โดยปกติ plasmid system นี้จะต้อง maintain ที่อุณหภูมิต่ำคือ 30°C แต่เมื่อนำไปเพิ่มอุณหภูมิเป็น 42°C จะสามารถ inactivate repressor protein และทำให้มีการสร้าง T7 RNA polymerase และผลสุดท้ายมีการ express TcpA ซึ่ง TcpA มีขนาดประมาณ 23-25 kDa แต่เนื่องจากการ purify *tcpA* โดย gel filtration หรือ ion exchange column chromatographies มีความยุ่งยาก เราจึงได้ subclone เข้าไปใน vectors pTrcHis 2 A, B และ C แล้วจึง transform vectors เข้าใน *E. coli* DH5 α พบว่า plasmid TrcHis 2 A ซึ่ง transform เข้า *E. coli* DH5 α สามารถ express TcpA ได้ แต่ TrcHis 2 B และ TrcHis 2 C ไม่ express TcpA

ในการเตรียม TcpA ได้นำ recombinant *E. coli* ไป inoculate ลงใน LB broth 3 ml ซึ่งผสม ampicillin 50 μ g/ml แล้ว incubate ที่ 37°C พร้อมเขย่าข้ามคืน วันรุ่งขึ้นได้ inoculate overnight culture ปริมาณ 1 ml ลงใน LB broth 50 ml (ผสม ampicillin 50 μ g/ml) incubate ที่ 37°C พร้อมเขย่า 3 ชั่วโมง จนมี OD ที่ 600 nm = 0.6 (เซลล์อยู่ใน mid-log phase) เติมน IPTG ลงใน culture ให้ได้ความเข้มข้น 1 mM (0.5 ml ของ 100 mM IPTG) แล้ว incubate ต่ออีก 2 ชั่วโมงที่ 37°C จากนั้นนำ culture ไปปั่นที่ 8,000 $\times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำ pellet ไป resuspend ใน denaturing binding buffer แล้วนำไปผ่าน purify ProBond Purification System เพื่อใช้เป็นวัคซีนต่อไป

การเตรียม LPS

ได้ extract LPS จาก *Vibrio cholerae* biotype El Tor strain O17SR โดย phenol-water extraction method (Westphal and Jann, 1965)

การเตรียม Procholeragenoid (P)

Procholeragenoid (P) คือ heat-mediated conversion of CT (cholera toxin หรือ cholera toxin) เพื่อให้เป็น cholera toxoid (B-subunits ซึ่งมี trace activity of A-subunit เหลืออยู่ไม่เกิน 5% ของ holotoxin) ทั้งนี้โดยการนำ CT ไป heat ที่ 65°C เป็นเวลา 15 นาที ถ้า heat นานกว่านี้ (25 นาที) จะมี activity ของ subunit A (toxicity) เหลือ 1 % การที่ไม่ทำลาย activity ของ CT A-subunit ให้หมดก็เพราะต้องการให้ A-subunit เป็น adjuvant และ break oral tolerance ต่อ protein antigen ด้วย

ได้เตรียม CT จาก recombinant *E. coli* MC 1061 (pKTJ5-15X) ซึ่งได้ clone *ctx* genes ไว้แล้ว โดยนำ recombinant *E. coli* มา streak บน agar plate ซึ่งมี ampicillin ผสมอยู่ 100 μ g/ml เพื่อให้ได้ single colonies หลังจาก incubate ข้ามคืนที่ 37°C นำ colonies จาก

plate ประมาณ 1 loop ไป inoculate ใน LB broth ซึ่งผสม ampicillin (100 µg/ml) แล้ว incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไป inoculate ลงใน LB broth 500 ml (ผสม ampicillin 100 µg/ml) แล้ว incubate พร้อมเขย่าที่ 37°C ข้ามคืน

ในวันรุ่งขึ้นนำ culture มาปั่นเพื่อให้ได้ cell pellet จากนั้น resuspended pellet ใน 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.6 ซึ่งผสม 0.9% NaCl จากนั้นนำ cell suspension ไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonication ที่ 20 kHz, 2 นาที 5 ครั้ง ปั่นเอา supernatant แล้วนำไปตกตะกอนด้วยการเติม ammonium sulfate ให้เป็น 65% saturation (516 g/liter) แล้วนำ precipitate ไปละลายใน TEAN buffer, pH 7.4 หลังจาก dialyse เอา ammonium sulfate ออกใน buffer เดียวกันแล้วจะได้ “crude CT”

นำ crude CT ไป purify ให้ได้ pure CT โดยใช้ galactose column chromatography (Pierce Co., Rockford, USA) และใช้ technique เหมือนกับวิธีเตรียม LT จาก ETEC (โปรดดูวิธีการในโครงการย่อยที่ 2 หน้า 41 และ 42)

การเตรียม rabbit anti-CT immunoglobulins

ได้ immunized กระจ่าย (2-2.5 kg) ด้วย cholera toxin ตามตารางที่ 3.1

ได้เจาะเลือดจากหัวใจกระจ่ายในวันที่ 64 (Day 64) แล้วแยกซีรัมเพื่อนำไปตกตะกอนเอา immunoglobulins โดยใช้ ammonium sulfate precipitation (50% saturation)

การเตรียม rabbit anti-TcpA

ได้ immunized กระจ่าย ด้วย purified TcpA

หลังจาก immunized ครั้งสุดท้ายแล้วสองสัปดาห์ ได้เจาะเลือดจากหัวใจกระจ่ายไปแยกเอาซีรัมเพื่อเตรียม immunoglobulins เช่นเดียวกับการเตรียม rabbit anti-CT immunoglobulins

การเตรียม Anti-*V. cholerae* O1 LPS

ใช้ mouse monoclonal antibodies ซึ่ง specific ต่อ *V. cholerae* O1 LPS จาก hybridoma clone 27E10 โดยได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Sciences Development and Management Ltd. ซึ่งซื้อสิทธิบัตร clone ดังกล่าวไปจาก สวทช. (Chaicumpa *et al.*, 1995)

ตารางที่ 3.1 Rabbit immunization schedule and dosages of CT

Day	CT ($\mu\text{g/ml}$ NSS)
0	4
8	10
15	20
33	40
43	40
50	40

สัตว์ทดลองและการ immunize

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการวิจัยส่วนนี้คือ Wistar rats ซึ่งมีอายุ 8 สัปดาห์ขณะเริ่มการทดลอง โดยซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล แบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว(เลี้ยงรวมกัน 5 ตัวต่อหนึ่งกรง) ใช้ sterile woodchips เป็น bedding และเลี้ยงด้วยอาหารหนูซื้อจากบริษัท ซี พี ส่วนน้ำดื่มเป็นน้ำกรองและห้องปรับอากาศ

ก่อนเริ่มการทดลองได้เลี้ยงหนูให้อยู่ในห้องเลี้ยงสัตว์ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อนเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์เพื่อให้ชินกับสภาวะห้องเลี้ยงใหม่ และคลายความเครียดลง

ได้ให้หนูอดอาหารเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ก่อนป้อนวัคซีนตัวละหนึ่งโดสซึ่งละลายอยู่ใน 5% NaHCO_3 ปริมาณ 3 ml โดยใช้ Luer fitting cannula ซึ่งปลายเป็นโลหะกลม สอดเข้าไปใน esophagus (Campbell, 1991)

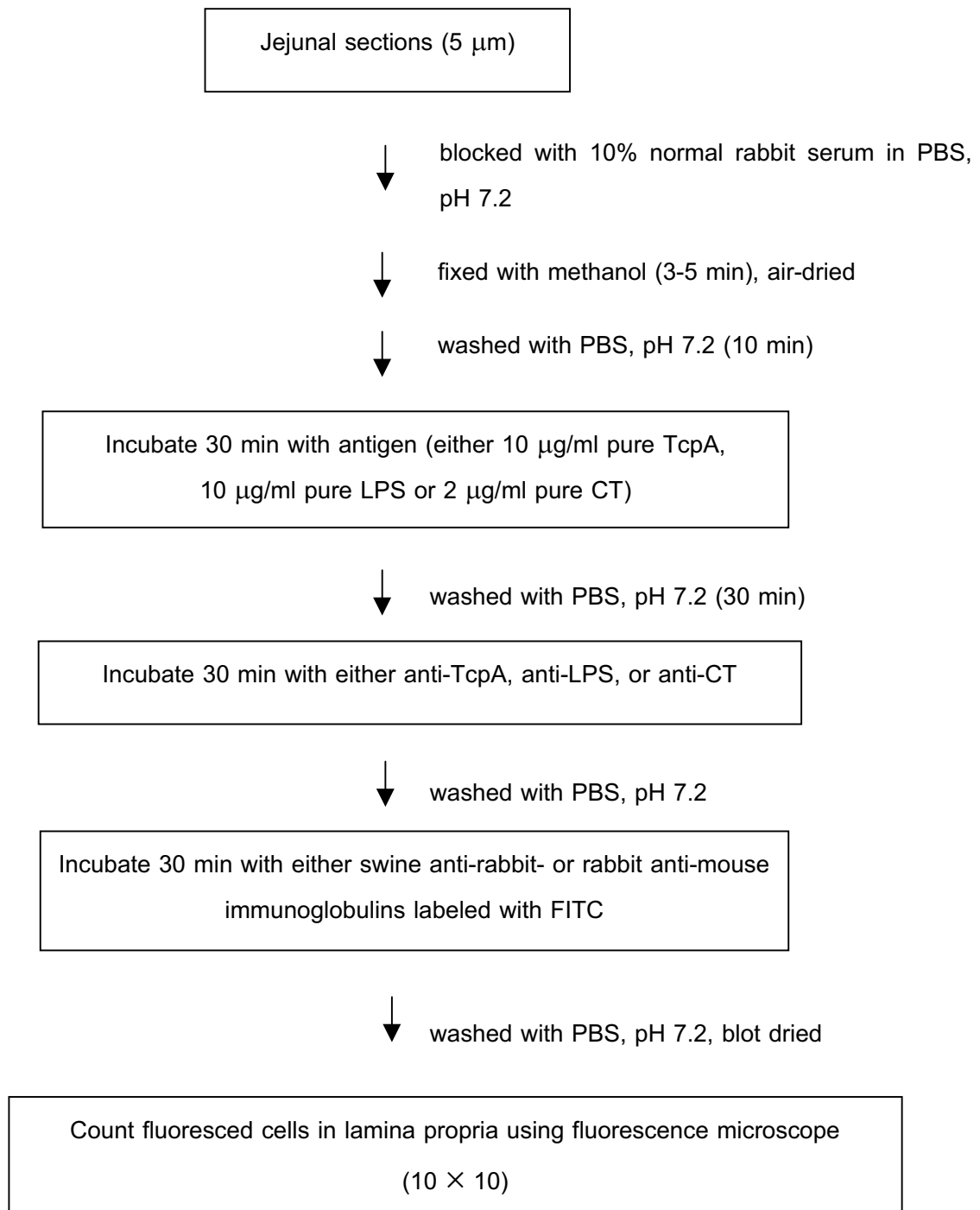
หนูแต่ละกลุ่มได้รับ oral vaccine หรือ placebo รวมทั้งสิ้นตัวละสามโดส โดยเว้นระยะห่างระหว่างโดสสองสัปดาห์

การเก็บตัวอย่างและการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิตแอนติบอดีในลำไส้

หลังจากป้อนวัคซีนโดสสุดท้ายครบเจ็ดวัน ได้ให้หนู rats อดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (แต่ให้น้ำดื่มตามปกติ) วางยาสลบหนู rat แต่ละตัวด้วย diethylether จนสลบดีแล้ว จึงเจาะเลือดเพื่อแยกเอาซีรัม และ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ก่อนฆ่าหนูโดยวิธี cervical dislocation จากนั้นผ่าเปิดหน้าท้องหนูแต่ละตัว ตัดเอาลำไส้เล็กตลอดความยาวออกมาล้างทั้งด้าน serosal และ mucosal surface ด้วย cold PBS, pH 7.2 ตัดลำไส้เล็กจาก pylorus ประมาณ 28-32 ซม. เป็นชิ้นยาวประมาณชิ้นละ 1 ซม. เก็บใน disposable molds ซึ่งมี OCT (frozen section medium) บรรจุอยู่ นำไปเก็บที่ -70°C เพื่อใช้ตรวจหาและนับจำนวน antibody producing cell (AbPC) ใน lamina propria ต่อไป ด้วยวิธี double antibody sandwich method of immunofluorescence ซึ่งมีขั้นตอนดัง Diagram 2

ในการนับจำนวนเซลล์ที่เรืองแสง fluorescein (AbPC) ต่อแอนติเจนแต่ละชนิดใช้ tissue sections จำนวน 2 sections ต่อหนู 1 ตัว รวม 10 sections ใน แต่ละกลุ่ม (กลุ่มละ 5 ตัว) ในแต่ละ section ได้นับจำนวน AbPC ใน 25 microscopic fields (กำลังขยายขณะนับเซลล์ 10 ocular $\times$ 10 objective) รวมทั้งสิ้นในแต่ละกลุ่มจะนับเซลล์ทั้งหมดใน 250 microscopic fields เพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$) และ standard deviation (SD)

Diagram 2 : แสดงขั้นตอนการตรวจหาและนับจำนวน antibody producing cells (AbPC) ใน jejunal sections ของ immunized rats ด้วยวิธี double antibody sandwich method of immunofluorescence



ผลการวิจัย

การทดสอบ Immunogenicity ของวัคซีนทั้ง 6 formulations และ 3 placebos ในการ induce AbPC ในลำไส้ของหนู rat ทดลอง เพื่อดูว่า CpGDNA จะใช้เป็น oral adjuvant ใน mucosal vaccine ได้หรือไม่ เปรียบเทียบกับ placebos 3 กลุ่ม ได้ผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวน antibody producing cells (ค่าเฉลี่ยและ standard deviation) เมื่อนับด้วย microscopic magnification 10× และ objective 10× ต่อ 1 microscopic field

พบว่า จำนวน anti-LPS ของกลุ่มที่ 1-9 คือ 118.72 ± 2.47 , 109.23 ± 2.59 , 108.06 ± 2.27 , 86.85 ± 2.11 , 80.11 ± 2.20 , 80.08 ± 2.58 , 12.15 ± 0.39 , 8.48 ± 0.31 , และ 8.02 ± 0.41 ตามลำดับ

ส่วนค่าเฉลี่ยจำนวน anti-TCP producing cells ของกลุ่มที่ 1-9 คือ 47.70 ± 0.54 , 43.10 ± 0.67 , 43.17 ± 0.64 , 37.30 ± 0.58 , 34.24 ± 0.65 , 34.68 ± 0.43 , 7.10 ± 0.23 , 5.70 ± 0.19 , และ 5.74 ± 0.17 ตามลำดับ

ค่าเฉลี่ยจำนวน anti-CT producing cells ต่อ 1 microscopic field คือ 111.73 ± 2.55 , 94.38 ± 2.13 , 93.51 ± 2.27 , 83.44 ± 2.21 , 74.74 ± 2.16 , 74.80 ± 2.02 , 9.04 ± 0.41 , 5.59 ± 0.44 , และ 5.01 ± 0.18 ตามลำดับ

ดังนั้น vaccine formulation 1 ซึ่งมีแอนติเจนทั้งสามชนิดคือ LPS, TCP และ procholera toxin (P) associate กับ liposome (L) และผสม bacterial CpG DNA (# OKN 1826) จึงมี immunogenicity สูงที่สุด ซึ่งสามารถเขียน order of magnitude ของ immunogenicity ได้ ดังนี้

$1 > 2, 3 > 4, 5, 6 > 7, 8, 9$ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3.2 แสดงจำนวน antigen specific antibody producing cells ใน intestinal (jejunal) sections ของหนู rats ทั้งเก้ากลุ่มที่ได้รับวัคซีนทั้งหก formulations และ placebos สามชนิด

Group no.	Average numbers ($\pm$ S.E.) of AbPCs specific to:		
	Anti-LPS	Anti-TcpA	Anti-CT
1	118.72 ($\pm$ 2.47)*	47.70 ($\pm$ 0.54)*	111.73 ($\pm$ 2.55)*
2	109.23 ($\pm$ 2.59)	43.10 ($\pm$ 0.67)	94.38 ($\pm$ 2.13)
3	108.06 ($\pm$ 2.27)	43.17 ($\pm$ 0.64)	93.51 ($\pm$ 2.27)
4	86.85 ($\pm$ 2.11)	37.30 ($\pm$ 0.58)	83.44 ($\pm$ 2.21)
5	80.11 ($\pm$ 2.20)	34.24 ($\pm$ 0.65)	74.74 ($\pm$ 2.16)
6	80.08 ($\pm$ 2.58)	34.68 ($\pm$ 0.43)	74.80 ($\pm$ 2.02)
7	12.15 ($\pm$ 0.39)	7.10 ($\pm$ 0.23)	9.04 ($\pm$ 0.41)
8	8.48 ($\pm$ 0.31)	5.70 ($\pm$ 0.19)	5.59 ($\pm$ 0.44)
9	8.02 ($\pm$ 0.41)	5.74 ($\pm$ 0.17)	5.01 ($\pm$ 0.18)

* นับจาก 2 sections ของหนูแต่ละตัว section ละ 10 microscopic fields ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีหนู 5 ตัว ดังนั้นในแต่ละกลุ่มจึงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 250 microscopic fields (กำลังขยาย 10 ocular $\times$ 10 objective)

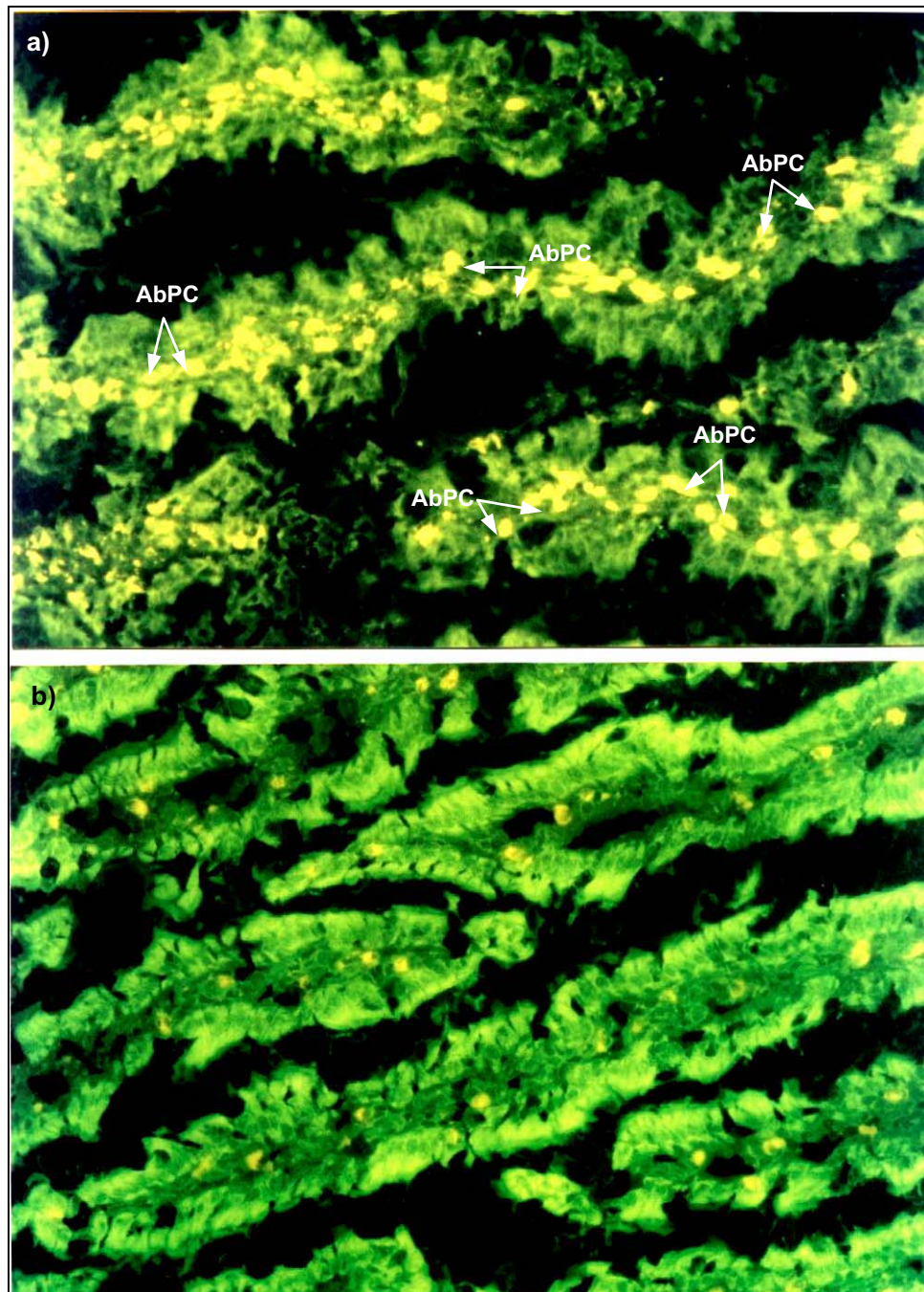


Figure 3.15 a) Anti-LPS producing cells in jejunal lamina propria of rat at villous core (group 1); 10 × ocular, 10 × objective
b) Liposome control

Selected References

- Attridge, S R, Voss, E and Manning, P A. Pathogenic and vaccine significance of toxin-coregulated pili of *Vibrio cholerae* E1 Tor. *Journal of Biotechnology* 1999; 73: 109-17.
- Cooper, G N and Narendranathan, R. Antibacterial immunity to *Vibrio cholerae* in rats. *Journal of Medical Microbiology* 1986; 22: 133.
- Hanahan, D. Techniques for transformation of *E. coli*. DNA cloning : a practical approach, Glover, D M (ed.). 1970; Vol. 1. IRL Press, Oxford and Washington D.C.
- Tabor, S and Richardson, CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 1074-8.

References

- Anderson PM, Hanson DC, Haz DE, Halet MR, Blazar BR, Ochoa AC. Cytokines in liposomes: preliminary studies with IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF and interferon- γ . *Cytokine* 1994; 6: 92-101.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Chaicumpa W, Chaisri U, Tapchaisri P, *et al*. Oral vaccine against cholera prepared from *V. cholerae* antigens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1987; 18: 142-8.
- Chaicumpa W, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, *et al*. Immunogenicity of liposome-associated and refined antigen oral cholera vaccines in Thai volunteers. *Vaccine* 1998; 16(7): 678-84.
- Chaicumpa W, Parairo J, New RC, *et al*. Immunogenicity of liposome-associated oral cholera vaccine prepared from combined *Vibrio cholerae* antigens. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1990; 8: 87-94.

- Chaicumpa W, Parairo J. Liposomes and their potential in oral cholera vaccines. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1988; 6: 70-6.
- Chaicumpa W, Thattiyaphong A, Chongsa-nguan M, *et al.* Rapid detection of *V. cholerae* O1. *Serodiag Immunother Infect Dis* 1995; 7(4): 161-72.
- Ehara M, Ishibashi M, Ichinose Y, *et al.* Purification and partial characterization of fimbriae of *Vibrio cholerae* O1. *Vaccine* 1987; 5: 283-5.
- Ehara M, Iwami M, Ichinose Y, *et al.* Purification and partial characterization of fimbriated of *Vibrio cholerae* O1 strain Bgd 17. *Trop Med* 1991; 33(4): 109-25.
- Finkelstein RA, Boesman- Finkelstein M, Chang Y, Hase CC. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun* 1992; 60(2): 472-8.
- Freter R, Jones GW. Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 647-58.
- Freter R. Mechanism of association of bacteria with mucosal surfaces. *Ciba Found Symp* 1981; 80: 36-55.
- Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Control Release* 1996; 41: 49-56.
- Harokopakis E, Hajishengallis G, Michalek SM. Effectiveness of liposomes possessing surface-linked recombinant B subunit of cholera toxin as an oral antigen delivery system. *Infect Immun* 1998; 66 (9): 4299-304.
- Holmgren J, Lonnroth I, Mansson J-E, Svennerholm AM. Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of the small intestine. *Proc Natl Acad USA* 1975; 72: 2520-4.
- Holmgren J, Lonnroth I, Svennerholm AM. Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure studies with GM1 ganglioside and related glycolipids. *Infect Immun* 1973; 8: 208-14.
- Honda T, Lertpocasombat K, Hata A, Miwatani T, Finkelstein RA. Purification and characterization of protease produced by *Vibrio cholerae* non -O1 and

- comparison with protease of *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* 1989; 57(9): 2799-803.
- Husband AJ. Mucosal memory-maintenance and recruitment. *Vet Immunol and Immunopathol* 2002; 87: 131-6.
- Kalambaheti T, Chaisri U, Srimanote P, *et al.* Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. *Vaccine* 1998; 16 (2-3): 201-7.
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, *et al.* CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin-6, interleukin-12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (7): 2879-83.
- Krieg AM, Hartmann G, Yi AK. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247: 1-21.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374 (6522): 546-549.
- Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(1): 35-43.
- McCluskie MJ, Weeratna RD, Krieg AM, *et al.* CpG DNA is an effective oral adjuvant to protein antigens in mice. *Vaccine* 2001; 19: 950-7.
- Moldoveanu Z, Love-Homan L, Huang WQ, *et al.* CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine* 1998; 16 (11-12): 1216-24.
- Newby JJ and Stokes CR. Local immune responses of the gut. CRC Press, Boca Raton, 1984; p. 143.
- Ogierman MA, Zobihi S, Mourtziros L and Manning PA. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene* 1993; 126: 51-60.
- Szoka F Jr, Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; (9): 4194-8.

- Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, et al. Randomized, double-blind, placebo controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun* 1999; 67 (12): 6341-6345.
- Tacket CO, Kotloff KL, Losonsky G, et al. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *V. cholerae* O1 vaccine strain CVD111. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 533-7.
- Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD110, a Δ ctxA Δ zot Δ ace derivative of El Tor Ogawa *V. cholerae*. *J Infect Dis* 1993; 168: 1536-1540.
- Wagner H, Hacker H, Lipford GB. Immunostimulatory DNA sequences help to eradicate intracellular pathogens. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 147-52.
- Wang Z, Karras JG, Colarusso TP, et al. Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol* 1997; 180:162-7.
- WHO Memorandum. Intestinal immunity and vaccine development. *Bull WHO* 1979; 57: 719-734.
- Yoshihiko U, Yoko O, Zaw L, et al. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb Pathog* 1994; 16: 71-6.

3. Output ของการวิจัย

1. จำนวน publications, manuscripts ที่ส่งไปตีพิมพ์แล้ว และที่กำลังเตรียมเพื่อตีพิมพ์

- 1.1. Ittiprasert W, Chongsa-nguan M, Manatrakul D, Jongsuksuntigul P, Meesomboon V, Wongsaroj T, Kitikoon V, Sakolvaree Y, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Prevalence of antibodies to *Schistosoma mekongi* among inhabitants of the high-risk area of Thailand. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology* 1999; 22(1): 7-14.
- 1.2. Srimanote P, Ittiprasert W, Sermsart B, Chaisri U, Mahannop P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Maleewong W, Kurazono H, Hayashi H, **Chaicumpa W**. *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen-based diagnosis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2000; 18: 37-45.
- 1.3. Ittiprasert W, Butraporn P, Kitikoon V, Klongkamnuankarn K, Pholsena K, Vanisaveth V, Sakolvaree Y, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Mahakunkijcharoen Y, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Differential diagnosis of schistosomiasis mekongi and trichinellosis in human. *Parasitology International* 2000; 49: 209-18.
- 1.4. Suppadit T, Kitikoon V, Key JP, **Chaicumpa W**, Jaturasitha S, Pongpichan P. Development of broiler litter as valuable animal feed ingredient by mixing casava meal or effective microorganism by fermentation method. The Second Symposium on Sustainable Utilization of Agricultural Byproducts for Animal Production, Chulalongkorn University Press 2001 ISBN 974-13-1427-2; 19-28.
- 1.5. Chaisri U, Nagata M, Kurazono H, Horie H, Tongtawe P, Hayashi H, Watanabe T, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, **Chaicumpa W**. Localization of Shiga toxins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in kidneys of paediatric and geriatric patients with fatal haemolytic uraemic syndrome. *Microbial Pathogenesis* 2001; 31(2): 59-67.
- 1.6. Sonjai K, Soisangwan R, Sakolvaree Y, Kurazono H, Chongsa-nguan M, Tapchaisri P, Mahakunkijcharoen Y, Nair GB, Hayashi H, **Chaicumpa W**. Validation of salmonellosis and shigellosis diagnostic test kits at a provincial hospital in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 115-27.
- 1.7. Wongsaroj T, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Maleewong W, Kittikoon V, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Cross JH. Affinity purified oval antigen for diagnosis of opisthorchiasis viverri. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19: 245-58.
- 1.8. Saengjaruk P, **Chaicumpa W**, Watt G, Tapchaisri P, Sittinont C, Tomnakan K, Wambongco MAL, Chongsa-nguan M, Mahakunkijcharoen Y, Kalambaheti T, Sakolvaree Y, Naigowit P, Kurazono H, Hayashi H. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody based-antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 2002; 40(2): 480-9.

- 1.9. Slom TJ, Cortese MM, Gerber SI, Jones RC, Holtz TH, Lopez AS, Zambrano CH, Sufit RL, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Herwaldt BL, Johnson S. An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from Caribbean. *New Engl J Med* 2002; 436(9): 668-75.
- 1.10. Suppadit T, Kitikoon V, Key JP, **Chaicumpa W**, Pongpiachan P, Jaturasitha S. Utilization of broiler litter as a source of crude protein for cattle: I. The nutritional effect of different feed modification. *Thai J Agric Sci* 2002; 35(4): 427-36.
- 1.11. Taweetawornsawat P, **Chaicumpa W**, Chaisri U, Chuanbal U, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Wongsaroj T. Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: A potential diagnostic reagent for strongyloidiasis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2002; 20: 247-56.
- 1.12. Sookrung N, Diraphat P, **Chaicumpa W**, Tongtawe P, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Mahakittikul V, Tungtrongchitr A, Vichyanond P, Bunnag C. Development of a test kit for detection of cockroach allergens and the study of cockroach allergens in Thai allergic patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003; 21(1):1-9.
- 1.13. Diraphat P, Sookrung N, **Chaicumpa W**, Pumhirun P, Vichyanond P, Tapchaisri P, Sookroong N, Kalambaheti T, Mahakunkijcharoen, Sakolvaree Y, Bunnag C. Recombinant american cockroach component, Per a1, reactive to IgE of Thai allergic patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2003; 21(1):11-20.
- 1.14. Samosornsuk S, Von Seidleim L, Robertson S, Ali M, Clemens J, **Chaicumpa W**. Use of cluster survey to estimate treatment preference for diarrhea and dysentery Kangkoi district, Saraburi province. Manuscript in preparation
- 1.15. Wongkamchai S, Choochote W, Jitpuckdee A, Suvanadabba S, Sakolvaree Y, Tapchaisri P, Loymak S, **Chaicumpa W**. An antigen detection assay for diagnosis of brugian filariasis. Submitted to *Int J Parasitol*
- 1.16. Leelawongtawon R, **Chaicumpa W**, Somroop S, Chaisri U, Tongtawe P, Chongsanguan M, Kalambaheti T, Tapchaisri P, Pichayangoon S, Kurazono H, Hayashi H. Role of CpG DNA and liposome in immune response to oral cholera vaccine. Submitted to "Vaccine".
- 1.17. Panutdaporn N, Chongsanguan M, Nair GB, Ramamurthy T, Yamasaki S, Chaisri U, Tongtawe P, Eampokalarp B, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Kurazono H, Ba Thein W, Hayashi H, Takeda Y, **Chaicumpa W**. Genotypes and phenotypes of Shiga toxin producing-*Escherichia coli* Isolated from healthy cattle in Thailand. Accepted for publication in the *Journal of Infections* (in press).

- 1.18. Na Ubol M, Chaiyaroj S, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Sakolvaree Y, Yamazaki S, Hayashi H, Kurazono H, **Chaicumpa W**. Virulence genes of *Vibrio cholerae* Thailand isolates. Manuscript in preparation.
- 1.19. Lintaworndee S, Sakolvaree Y, **Chaicumpa W**, Johnson S, Wongsaroj T, Maleewong W. Analysis of *Angiostrongylus cantonensis* antigenic components cross-reactive to antibodies incited by other helminthes. Manuscript in preparation
- 1.20. Suwimolteerabut J, **Chaicumpa W**, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Kalambaheti T, Ramasoota P, Saengjaruk P, Sakolvaree Y, Virakul P. Detection of *Leptospira* antigenuria among cattle at farms in Thailand. Accepted for publication in Asian Pacific J Allergy Immunol.
- 1.21. Khan A, Nandi RK, Ramamurthy T, Khanam J, Shimizu T, Yamasaki S, Bhattacharya SK, **Chaicumpa W**, Takeda Y and Nair GB. Environmental isolates of *Citrobacter braakii* that agglutinate with *Escherichia coli* O157 antiserum but do not possess the genes responsible for the biosynthesis of O157 somatic antigen. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 179-86.

2. บทความทางวิชาการ/หนังสือ

- 2.1 หนังสือที่ระลึก 40 ปี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เรื่อง
 - Diarrhea and Enteric Fever
 - Trichinellosis
- 2.2 หนังสือรายงานประจำปี (Annual Report) ของคณะเวชศาสตร์เขตร้อนปี 2000, 2001, 2002 เรื่อง "Special Laboratory Services"
- 2.3 Proceedings of the 12th Workshop on Diarrheal Diseases จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุข และ World Health Organization เมื่อ 24-26 ตุลาคม 2543 ห้องประชุมอารีย์ วัลยเสวี คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี เรื่อง "Vaccine for Diarrhea : Bacterial Vaccines"
- 2.4 หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana*) รายงานเสนอขออนุญาตขึ้นทะเบียนว่ามีการกระทรวงสาธารณสุข เพื่อกำหนดนโยบายด้านสมุนไพรและพืชเศรษฐกิจของประเทศ มกราคม 2545
- 2.5 ผลไม้ไทย (Exotic Thai Fruits) บทความเสนอขออนุญาตขึ้นทะเบียน พ.ต.ท. ทักษิณ ชินวัตร เพื่อปรับปรุงกลยุทธ์การส่งออกผลไม้ไทย

3. การให้การฝึกอบรมและดูงาน ตัวอย่างเช่น :

3.1 ให้การสาธิตและฝึกปฏิบัติการ : การประยุกต์ใช้เทคนิค dot-blot ELISA เพื่อวินิจฉัยโรคทริคิเนลโลสิส (trichinellosis) และโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือด (schistosomiasis) และการวินิจฉัยแยกโรคทั้งสองโรคด้วยวิธีการทางอิมมูโนวิทยาแก่เจ้าหน้าที่ชั้นสูตรสาธารณสุข จำนวน 30 คน

3.2 ให้การดูงานด้านเลปโตสไปโรซิสและให้คำปรึกษาด้านการทำวิจัยแก่ อาจารย์นายสัตวแพทย์กำลัง ชุมพลบุญชร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.3 ให้การฝึกอบรมและดูงาน เรื่อง “การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสรวดเร็วโดยการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ” แก่ แพทย์หญิง มาริสสา อะเลจันเดรีย จาก Section of Infectious Diseases, General Philippines Hospital, The University of Philippines เมื่อ 9 พฤษภาคม 2544

3.4 ให้การดูงานและบรรยาย เรื่อง “โรคติดเชื้อในเขตร้อน” แก่นักศึกษาแพทย์ชาวญี่ปุ่นจาก University of Kyoto ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 2 คน เมื่อ 22-23 สิงหาคม 2544

3.5 ให้การดูงานด้านการตรวจวินิจฉัยไทฟอยด์และ *Salmonella* septicemia อย่างรวดเร็วแก่ แพทย์ชาวต่างประเทศซึ่งเป็นแพทย์ดูแลผู้ป่วยพลีภัยที่ค่ายผู้ป่วยพลีภัย จังหวัดราชบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2544

3.6 บรรยายและให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Mrs. Chee Chean Gan, WHO Fellow จากประเทศมาเลเซีย ระหว่างวันที่ 7-9 พฤศจิกายน 2001 เรื่อง “Immunodiagnosis of Parasitic Infections: Western blot analysis” เพื่อวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจืด (gnathostomiasis) และพยาธิหอยโข่ง (angiostrongyliasis), urine antigen detection เพื่อวินิจฉัยโรคเท้าช้าง (filariasis) การวินิจฉัยโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับโดยใช้ affinity purified-egg antigen ของ *Opisthorchis viverrini* เพื่อตรวจหา serum antibodies โดย dot-ELISA การวินิจฉัยแยกโรคพยาธิใบไม้เลือด โรคทริคิเนลโลสิส พยาธิใบไม้ปอด และ strongyloidiasis โดยกรรมวิธีทางอิมมูโนวิทยา

3.7 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Dr. Bo A. Claesson แพทย์จาก Department of Infectious Diseases, Sahlgrenska University ประเทศสวีเดน เมื่อวันที่ 31 ตุลาคม 2544

3.8 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข เขต 5, 6, 7 และเจ้าหน้าที่จากส่วนกลาง จำนวน 13 คน เรื่อง “การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* ในปัสสาวะ”

3.9 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ Dr. Masashiro Ishikawa เรื่อง “Immunodiagnosis of Infectious Diseases” เมื่อวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2545

3.10 ให้การฝึกอบรมและดูงาน เรื่อง “โรคติดเชื้อในเขตร้อน” แก่แพทย์ 4 รายและพยาบาล 2 รายจากประเทศญี่ปุ่น เมื่อวันที่ 2 พฤศจิกายน 2544

3.11 สอนและให้การฝึกอบรมและดูงานแก่ fellow สาขาโรคติดเชื้อจากภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้านการวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเขตร้อน (พญ. รังสิมา โล่ห์เลขา พญ. วันทปรียา พงษ์สามารถ และ พญ. อุไร วงศ์สวัสดิ์) เมื่อวันที่ 6-9 พฤศจิกายน 2544

3.12 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่บุคลากรทางการแพทย์จากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ตามพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จำนวน 4 คน โดยบรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคติดเชื้อที่พบในเมืองร้อนด้วยวิธีทางอิมมูโนวิทยา” เมื่อวันที่ 23 มกราคม 2545

3.13 ให้การฝึกอบรมและดูงานแก่นักวิทยาศาสตร์ของโรงพยาบาลสุวรณภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด และโรงพยาบาลจังหวัดขอนแก่น

เป็นต้น

4. จำนวนผลงานจดสิทธิบัตร

- 4.1 กำลังดำเนินการเพื่อขอจดสิทธิบัตรต่อยอด “ชุดตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส” โดยต่อยอดจากสิทธิบัตรการผลิตไฮบริโดมาเฉพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา และสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งเป็นของบริษัทพัฒนานวัตกรรมและการจัดการ (SDM)
- 4.2 กำลังดำเนินการเพื่อขอสิทธิบัตรเรื่องไฮบริโดมาเฉพาะต่อ O157 LPS และ Shiga-toxin producing *E. coli* และชุดตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ STEC และ *E. coli* O157 อย่างรวดเร็ว
- 4.3 กำลังดำเนินการเพื่อจดสิทธิบัตรการตรวจวินิจฉัยโรค Brugian filariasis

5. นักวิจัยรุ่นใหม่

ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา ทำหน้าที่เป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง (mentor) ของนักวิจัยรุ่นใหม่รวม 7 คน ดังนี้

- 5.1 ดร. พงศ์ราม รามสูต
อาจารย์ระดับ 6 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.2 ดร. ยุวดี มหาคุณกิจเจริญ
อาจารย์ระดับ 6 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.3 ดร. ธาวัชรินทร์ กะลัมพะเหติ
อาจารย์ระดับ 6 กำลังรวบรวมผลงานเพื่อขอตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.4 ดร. สันนิภา สุรทัต
อาจารย์ระดับ 5 ได้เลื่อนเป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ทุน post-doc สกว.)
- 5.5 ผศ. แพทย์หญิง ดร. อัญชลี ตั้งตรงจิตร
ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล (ทุน post-doc สกว.)
- 5.6 สพ.ญ. วีระวรรณ ดิละนันท์กร

สาขาวิชาคลินิกโคนม คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ วช.)

5.7 ดร. พัชรินทร์ แสงจารีก

อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตน์ฯ (ทุน post-doc สกว.)

5.8 นาง ยุพพร สากลวารี นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 5 เลื่อนเป็นผู้ชำนาญการระดับ 6

6. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (2000-2003)

ศาสตราจารย์ วันเพ็ญ ชัยคำภา เมธีวิจัยอาวุโสทำหน้าที่ :

6.1 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (major advisor) ระดับปริญญาเอก หลักสูตร Ph. D. (Trop. Med.) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษาแล้ว จำนวน 10 คน

1. นางสาวอุไร ไชยศรี สำเร็จการศึกษาปี 2543 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยาเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นางพัชรินทร์ แสงจารีก สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 7 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตน์ฯ
3. นางสาวจิตติมา วงศาโรจน์ สำเร็จการศึกษาปี 2544 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระดับ 8 สำนักโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
4. นายธวัชชัย ศุภดิษฐ์ สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน อาจารย์ สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
5. นางสาววรรณพร อิทธิประเสริฐ สำเร็จการศึกษาปี 2544 ปัจจุบัน นักวิจัย P3 โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
6. นางสาวสิริจิต วงศ์กำชัย สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7 ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล
7. นางราตรี ลีละวงศ์เทวัญ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 6 สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
8. นางสาวพรพรรณ ดีระพัฒน์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 5 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปัจจุบันเป็น post-doctoral fellow ของ the University of Harvard, USA
9. นางสาวนันทิกา ปนัดดาภรณ์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน Post-doctoral fellow, Obihara, Japan

10. นายสัตวแพทย์ปิยะนันท์ ทวีถาวรสวัสดิ์ สำเร็จการศึกษาปี 2545 ปัจจุบัน อาจารย์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

6.2 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (co-advisor) ระดับปริญญาเอก หลักสูตร Ph. D. (Trop. Med.) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 2 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษา

11. พันตรีหญิงเพชร ทศนา
12. นายสัตวแพทย์รองเดช ตั้งตระการพงษ์

6.3 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 9 คน สำเร็จการศึกษาแล้วทุกคนในปีการศึกษา 2544 และ 2545

13. นางสาวกาญจนา สนใจ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลพระจอมเกล้า จังหวัดเพชรบุรี
14. นางสาวบังอร เสริมสาตร์ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
15. นางสาวจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6 ภาควิชาสูติศาสตร์-เณรเวชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
16. นางสาวเกษร บุญยรักษ์โยธิน ปัจจุบัน นักเทคนิคการแพทย์ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภาคใต้ จังหวัดตรัง
17. นายนิทัศน์ สุขรุ่ง ปัจจุบัน ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก หลักสูตรชีวเวชศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ด้วยทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สกว. รุ่นที่ 4
18. นายวงศ์สวรรค์ ผงสีเสี ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก Melbourne, Australia ด้วยทุนผู้ช่วยวิจัย
19. นางสาวสุนีย์ สังขะวาลี ปัจจุบัน นักเทคนิคการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
20. นางสาวสุปราณี หลินถาวร ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ฝ่ายไวรัสตับอักเสบบี กองสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
21. นางสาวมธุกร ณ อุบล ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6.4 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (อายุรศาสตร์เขตร้อน) หลักสูตรนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 3 คน

22. นางสาวกาญจนา อู่สุวรรณทิพย์ จบการศึกษาระดับปริญญาโท ปีการศึกษา 2545 ปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 5 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ลาศึกษาต่อหลักสูตรปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ หลักสูตรนานาชาติ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ด้วยทุนพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย

23. นางพิมลรัตน์ ทองงาม ยังไม่สำเร็จการศึกษา
24. นางสาวอรนุช พงศ์เพชรสถิตย์ ยังไม่สำเร็จการศึกษา

6.5 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคติดเชื้อ คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษาแล้วทั้ง 2 คน ในปีการศึกษา 2545

25. นางสาวยุพา เกิดพีชน์ ปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเวชศาสตร์สังคมและสิ่งแวดล้อม คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
26. นางสาวอุษา ชื่นบาล ปัจจุบัน เจ้าพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ 5 โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

6.6 เป็น Home Advisor นักศึกษา Ph. D. (Epidemiology), London School of Hygiene and Tropical Medicine ประเทศสหราชอาณาจักร

27. นางสาวพรทิพย์ จอมพุก จบการศึกษานปี 2546

6.7 เป็นประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 10 คน

28. นายนิทัศน์ สุขรุ่ง คปก. รุ่นที่ 4
29. นายเกษม กุลแก้ว คปก. รุ่นที่ 5
30. นางยุวพร สากลวารี คปก. รุ่นที่ 5
31. นางสาวศุภีพร พ่วงแพ คปก. รุ่นที่ 6
32. นางสาวมุสตี โตบันลือภพ ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
33. นายเสกสรรค์ สโมสรสุข ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
34. นางสาววรรณ โควะวินทวีวัฒน์ ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
35. นายเอนก ภูทอง ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
36. นางสาวกาญจนา อุสุวรรณทิม ทุนพัฒนาอาจารย์สาขาขาดแคลน ทบวงมหาวิทยาลัย
37. นายวงศ์สวรรค์ ผงสีใส (ลาออกเพื่อศึกษาต่อ ณ ประเทศออสเตรเลีย ในภาคการศึกษาที่ 1 ของหลักสูตร Ph. D. (Biomed. Sci.)

6.8 เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาเอก สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 2 คน

38. นายสันติ มณีวัชรรังษี ทุน คปก. รุ่นที่ 3
39. นายภูมิ อติศักดิ์วัฒนา ทุน คปก. รุ่นที่ 3

6.9 เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาชีวเวชศาสตร์ (หลักสูตรนานาชาติ) คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จำนวน 2 คน

40. นางสาวศรึนวล สมรูป
41. นางสาวอัญญา ถาวรวรรณ

สรุป

ขณะเป็นเมธีวิจัยอาวุโส (2000-2003) ศ. วันเพ็ญ ชัยคำภา เป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
รวมทั้งสิ้นจำนวน 41 คน :-

ปริญญาเอก หลักสูตรนานาชาติ จำนวน 25 คน

เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 20 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 10 คน ยังไม่สำเร็จอีก 10 คน
เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 5 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษาทั้ง 5 คน

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จำนวน 16 คน

เป็นประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 11 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 9 คน ยังไม่สำเร็จอีก 2 คน
เป็นกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ 5 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว 3 คน ยังไม่สำเร็จการศึกษา 2 คน

7. การเป็นวิทยากรบรรยาย ตัวอย่างเช่น

ระดับชาติ

1. การอบรมฟื้นฟูความรู้ด้านชั้นสูตรสาธารณสุข เรื่อง “การประยุกต์ใช้เทคนิคทางอิมมูโนวิทยา และอณูชีววิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคติดเชื้อปรสิต” ณ โรงแรมรอยัลซิดี

1.1 ได้รับเชิญให้บรรยายพิเศษเรื่อง “สถานภาพปัจจุบันและแนวทางการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อปรสิต”

1.2 ได้รับเชิญให้เป็นผู้อภิปรายร่วมกับวิทยากรอื่นอีก 2 ท่าน เรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหนองพยาธิโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาและอณูชีววิทยา”

2. การประชุมวิชาการสมาคมโลหิตวิทยา ณ โรงแรมสยามซิตี กรุงเทพมหานคร มกราคม 2544 เสนอผลงานเรื่อง “PAIgG and platelet dysfunction in idiopathic thrombocytopenia purpura” โดยนางสาวยุพนา คคกลิ่นกุล นักศึกษาปริญญาโทเป็นผู้นำเสนอ

3. การประชุมปฏิบัติการออกจากร่วม ครั้งที่ 12 ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Update on diarrhea vaccines: Bacterial Vaccines” ณ ห้องประชุมอารี วิลละเสวี โรงพยาบาลรามารับดี 25 ตุลาคม 2543

4. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “การพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส” และเป็นประธานกลุ่มย่อยเรื่องทิศทางการวิจัยเรื่องเลปโตสไปโรซิส ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง “มาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทย” เมื่อวันที่ 28-29 มิถุนายน 2544 โรงแรมเซ็นจูรี่พาร์ค กรุงเทพฯ จัดโดยสถาบันวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก ร่วมกับคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

5. เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “ประสบการณ์การศึกษาและชีวิตการทำงานวิจัยให้ประสบความสำเร็จ” แก่ผู้รับทุนโครงการ พสวท. ศึกษาต่างประเทศ ประจำปีการศึกษา 2545 วันที่ 6 ตุลาคม พ.ศ. 2544 ให้แก่สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

6. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “โรคติดเชื้อจากปรสิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ” วันที่ 22-23 พฤศจิกายน 2544 ณ โรงแรมโซฟิเทล จังหวัดขอนแก่น จัดโดยภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

7. ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “การทำ Bacterial Vaccine R + D ที่กำลังพัฒนาในประเทศไทย” ในการประชุมเชิงวิชาการสถานภาพ งานวิจัย พัฒนา และผลิตวัคซีนในประเทศไทยในโอกาสฉลองครบรอบ 20 ปี วันสถาปนาสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล วันที่ 30 พฤศจิกายน 2544

8. บรรยายเรื่อง “การตรวจวินิจฉัยและตรวจหาเชื้อ *Salmonella* อย่างรวดเร็ว โดยการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป” ศช. เมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2545

9. บรรยายเรื่อง “การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ” ในการประชุมโรคสัตว์สู่คน จัดโดยกระทรวงสาธารณสุข ณ โรงแรม เจบี หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เมื่อ มีนาคม 2546

10. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Liposome associated vaccine” ในการประชุมวิชาการประจำปี ของสมาคมเภสัชกรรมแห่งประเทศไทย วันที่ 28 มีนาคม 2546

11. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Emerging and re-emerging Bacterial Enteric Infections” ในการประชุมวิชาการเรื่อง “โรคติดต่อทางอาหารและน้ำ” กรมควบคุมโรค จัดที่โรงแรมเดอะแกรนด์ กรุงเทพฯ เมื่อ 5 สิงหาคม 2546

12. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Update on Vaccine of Bacterial Enteric Infection” ในการประชุมวิชาการเกี่ยวกับข้อ (11) ในวันที่ 7 สิงหาคม 2546 และได้รับเชิญให้เป็นผู้เชี่ยวชาญใน session อภิปรายทั่วไปในช่วงสุดท้ายของการประชุมวิชาการ

เป็นต้น

ระดับนานาชาติ

1. ได้รับเชิญให้เสนอผลงานเรื่อง “Enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from cattle in Bangkok” ที่ Fourth International Symposium and Workshop on “Shiga-toxin (Verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections” หรือ VTEC 2000, Oct 29 – Nov 2, 2000, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan. Abstract หมายเลข 107 ใน Program and Abstract Book โดยรัฐบาลญี่ปุ่นออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น

2. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Severe Diarrhea in Thailand” The XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Cartagena, Colombia, Aug 20-25, 2000 โดยผู้จัดการประชุม ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น
3. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diagnosis of trichinellosis” The Third Seminar on Food-borne Parasitic Zoonoses. Dec 7, 2000, the Royal River Hotel, Bangkok
4. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diagnosis of leptospirosis” The Joint International Tropical Medicine Meeting 2000. Dec 7, 2000, the Royal River Hotel, Bangkok
5. เสนอผลงานเรื่อง “Localization of Stx(s) in intoxicated mice and hemolytic uremic syndrome (HUS) patients”. The 30th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Sendai International Center and Miyagi Sports Center, Sendai, Japan. Nov 14-16, 2000. โดยนางสาวอุไร ไชยศรี นักศึกษาปริญญาเอกในขณะนั้นเป็นผู้นำเสนอ ได้รับทุนค่าใช้จ่ายในการเดินทางและเบี้ยเลี้ยงจาก Japanese Association of Clinical Immunology
6. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Diarrheal Diseases in Thailand” Presented at “The Sixth International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim”. US – Japan Cooperative Medical Sciences Program in Support of the Common Agenda. At the Westin Phillipines Plaza Hotel, Manila, the Phillipines. Jan 13-15, 2001. Full Sponsored by the Government of Japan.
7. เสนองานวิจัยเรื่อง “Eosinophilic meningitis outbreak among American students travelled to *Angiostrongylus* spp. endemic area” Presented at the Conference on Infectious Diseases, New Orleans, USA. September, 2000 โดย collaborator คือ Dr. Stuart Johnson จาก Division of Infectious Diseases, Northwestern University Medical School, USA เป็นผู้นำเสนอ
8. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Leptospirosis” ในการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยการตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ” ที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน จัดโดยสำนักเลปโตสไปโรซิส กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข เมื่อ 27 กรกฎาคม 2544
9. บรรยายเรื่อง “Immunodiagnosis of Tropical Infections” ใน Training for the International Infectious Diseases Control (Oversea Training in Thailand October 29 – November 23, 2001)
10. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Shigellosis” ใน “Training of the Trainers” จัดโดย International Vaccine Institute, WHO, Korean Office ที่โรงพยาบาลอำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี เมื่อ พฤษภาคม 2544
11. ได้รับเชิญจาก “The Indian College of Allergy, Asthma and Applied Immunology” ให้บรรยายเรื่อง “Development of Diagnostic Test kits for Developing Countries” ใน The 35th ICAAI Convention 2001, South India, Trivendrum

12. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Immunodiagnosis of food-borne parasitic infections: from research experiences to practical applications” ในการประชุม The 9th Asian Conference on Diarrheal Diseases and Nutrition ที่ Delhi, India, 28-29 กันยายน 2544
13. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Development of Diagnostic Test Kits for Developing Countries” ใน Symposium of the International Federation of Tropical Medicine and Malaria, The 450th Anniversary of the National Autonomous University of Mexico, October 18-19, 2001
14. บรรยายเรื่อง “Rapid diagnosis of shigellosis” ที่ London School of Hygiene and Tropical Medicine เมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2545
15. บรรยายเรื่อง “Body resistance to infections and rapid diagnosis of infectious diseases” แก่สัตวแพทย์ของประเทศที่สาม ที่สำนักสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมปศุสัตว์ เมื่อ มีนาคม 2545 และ มิถุนายน 2546
16. เป็น Invited speaker ใน BioThailand 2001: From Research to Market เรื่อง “Invention of Ready to Use Diagnostic Test Kits for Tropical Infections” November 8, 2001, Queen Sirikit Convention Center, Bangkok
17. ได้รับเชิญให้บรรยายเรื่อง “Mucosal Vaccine” ที่ Department of Agriculture Osaka Prefecture University วันที่ 25 มีนาคม 2546
18. บรรยายเรื่อง Emerging and re-emerging pathogens ในการประชุมวิชาการประจำปี สัตวแพทย์สมาคมในพระบรมราชูปถัมภ์ เมื่อ ธันวาคม 2545 ณ โรงแรมอิมพีเรียลคีนส์ปาร์ค เป็นต้น

8. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิเพื่อประเมินโครงการวิจัย รายงานการวิจัยและติดตามงานวิจัย

1. T2-Programme เรื่อง “Efficacy and tolerability of Ivermectin on gnathostomiasis”
2. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Molecular epidemiology of the pandemic clones of *Vibrio parahaemolyticus* in Bangladesh”
3. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Molecular epidemiology and evolution of clinical significant *Shigella* species in Bangladesh”
4. ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เรื่อง “Phenotypic and genotypic analysis of clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 to identify pathologic clones and their pathogenic mechanisms”
5. International Vaccine Institute, WHO, Korea โครงการวิจัย เรื่อง “Long-term efficacy of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine in Baoying county, Jiangsu, China

following the 1994-1995 individually randomized double-blind placebo-controlled trial” ของ Dr. Ning Wang ประเทศจีน

6. T-2 Programme เรื่อง “A comparative molecular study and antibiotic susceptibility of *V. cholerae* O1 and non-O1 non-O139 isolated from southern Thailand”

7. T-2 Programme โครงการวิจัยเรื่อง “The study of genetic variation of *Blastocystis hominis* in Thailand”

8. โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาความชุกและลักษณะเฉพาะระดับโมเลกุลของ *Salmonella* ในไข่ไก่และภาชนะบรรจุจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในเขตกรุงเทพมหานคร” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

9. “การตรวจหาเชื้อ *Cryptosporidium parvum* ด้วยพีซีอาร์” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

10. “การศึกษาความชุกของ *Legionella* and *Acanthamoeba* ในแหล่งน้ำธรรมชาติและสถานประกอบการในกรุงเทพมหานคร ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงและเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์” ของกองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

11. โครงการวิจัย เรื่อง “การตรวจวิเคราะห์เชื้ออหิวาต์ด้วยวิธี MAb-based dot-blot ELISA ในสิ่งส่งตรวจที่ผ่านการแยกเชื้อด้วย immunomagnetic enrichment” กองบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยมหิดล

12. โครงการเรื่อง “การศึกษาความผิดปกติด้านอนุเซลล์พันธุศาสตร์ของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในคน โดยเทคนิคคอมพิวเตอร์พีจีโนมิกส์ไฮบริดไฮเซนชัน” สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธี Latex agglutination ที่ใช้แอนติเจนจำเพาะของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola hepatica* สำหรับปัจจัยทางภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองวิทยาต่อโรคพยาธิใบไม้ตับ (Fascioliasis)” มหาวิทยาลัยขอนแก่น

14. โครงการวิจัยเรื่อง “คุณลักษณะความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Trypanosoma evansi* ที่แยกได้จากการระบาดต่างๆ ในปศุสัตว์ของประเทศไทย” สกว. กรกฎาคม 2544

15. โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัสใบหยิกเหลืองมะเขือเทศ” ของศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม สิงหาคม 2544

17. โครงการวิจัยเรื่อง “Emerging Filariasis infection in *Wuchereria bancrofti* nonepidemic patient with human immunodeficiency virus infection” ทุน China Medical Board คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

18. โครงการ “การพัฒนาและการผลิตน้ำยาอิมมูโนเคมีเพื่อตรวจหาสารแอมเฟตามีน (ยาบ้าและยาอี)” ศ. ดร. กวี รัตนบรรณางกูร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

19. โครงการ “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคใบหงิกของต้นข้าว เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในพืชและในแมลง” นายชัยวัฒน์ กิตติกุล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

20. โครงการวิจัยเรื่อง “การแก้ไขปรับปรุงระเบียบว่าด้วยการอนุญาตให้นักวิจัยชาวต่างประเทศเข้ามาทำการวิจัยในประเทศไทย” รศ. ดร. สืบศักดิ์ นันทวานิช สถาบันวิจัยมหาชาติ สิริธร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ หัวหน้าโครงการ ได้รับทุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

21. โครงการเรื่อง “การศึกษาเพื่อหาศักยภาพของแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ในการใช้เป็นวัคซีนและปรับปรุงการตรวจวินิจฉัยโรค” ศ.ดร. วิฑูรย์ ไวยนันท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หัวหน้าโครงการได้รับทุนจาก ส.ว.ท.ช.

22. โครงการเรื่อง “Development of PCR for detection of *Opisthorchis viverrini* in stools and its application in therapeutic treatment” รศ. ดร. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หัวหน้าโครงการ ได้รับทุน T-2 Programme

23. โครงการพยาธิใบไม้ตับเรื่อง “การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับ และความผิดปกติของท่อน้ำดี” ของ รศ. ไพบุลย์ สุทธิถาวรและคณะ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับประเทศเกาหลี ทุนของสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

24. โครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตาแดงขาว เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

25. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่อง “การใช้เทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโค : การวิเคราะห์หาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและอีสตราไดออล โดยวิธีอิมมิวโนแอสเส” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ส.ว.ท.ช. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

26. ประเมินความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสหัวเหลืองและไวรัสตัวแดงดวงขาว เพื่อใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ” ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม (12 กันยายน 2544)

27. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Production and characterization of monoclonal antibodies to novel functional rare epitopes in dengue proteins” โครงการของ ศช. 12 กันยายน 2544

28. ประเมินรายงานการวิจัยตามโครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-เกาหลี) เรื่อง “การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับ และความผิดปกติของระบบท่อน้ำดี” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
29. ประเมินรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาและ การผลิตน้ำยา อิมมูโนเคมีเพื่อการตรวจหาสารแอมเฟตามีน (ยาบ้าและยาอี)” ศช. เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2544
30. เป็นประธานอนุกรรมการติดตามประเมินผลการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ไวรัสใบหยิกเหลืองมะเขือเทศโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา” ศช. เมื่อ 6 พฤศจิกายน 2544
31. พิจารณารายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัสโรคใบหยิกของต้นข้าว เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในพืชและในแมลง” ศช.
32. พิจารณาโครงการวิจัย เรื่อง “การวินิจฉัยอาการไข้จากโรคเลปโตสไปโรซิส ด้วยอาการทางคลินิกและการตรวจภูมิคุ้มกันในน้ำเหลือง” กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข 22 พฤศจิกายน 2544
33. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Genetic variants of *Vibrio cholerae* O139 and development of a vaccine against O139 cholera” ของ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ 21 พฤศจิกายน 2544
34. ตรวจ manuscript เรื่อง *Citrobacter* ให้แก่ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ เมื่อวันที่ 6 ธันวาคม 2544
35. ประเมินโครงการวิจัยเรื่อง “Assessment of virulence associated gene pool in environmental *Vibrio* species and its relation to the emergence of clinically significant new pathogenic clone” ให้แก่ ICDDR – B ประเทศบังกลาเทศ
36. ประเมินรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง “การพัฒนา Dipstick colloidal dye ในการทดสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาในห้องที่สำหรับโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวและแบคทีเรียในโคนม” สกว. เมื่อวันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2545
37. ประเมินรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อนิวโรเปปไทด์ฮอร์โมนในก้านตากลุ่มกุลาดำ” ศช. เมื่อวันที่ 19 กุมภาพันธ์ 2545
38. โครงการวิจัยเรื่อง “Utilization of human cell line stably expressing various forms of dengue virus NS1 protein study contributions of NS1 in Dengue virus infection” T-2 เมื่อวันที่ 24 มกราคม 2545
39. โครงการวิจัยเรื่อง “พยาธิวิทยาในระดับเซลล์และโมเลกุลของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดีในโรคติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ” สกว. เมื่อมกราคม 2545

40. โครงร่างวิจัยเรื่อง “Interaction between plaque bacteria and dendritic cells” สกว. เมื่อ ธันวาคม 2544

41. ประเมินรายงานการวิจัยเรื่อง “A comparative molecular study and antibiotic susceptibility of *V. cholerae* O1 and non-O1 non-O139 isolated from southern Thailand” T-2 เมื่อวันที่ 27 ธันวาคม 2545

42. โครงร่างการวิจัยเรื่อง “Effect of BIOLAC and MICRO-GUARD on Broiler Performance and Prevent *Salmonella* Intection” คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

43. โครงร่างการวิจัยเรื่อง “Molecular epidemiology and evolution of clinically significant *Shigella* species in Bangladesh” ของ ICDDR-B ประเทศบังกลาเทศ

44. ประเมินโครงร่างทุนพัฒนาที่วิจัยของ ศช. 5 โครงการ

45. ประเมินหนังสือ เรื่อง “การประกันคุณภาพ การบริหารความปลอดภัยในห้องปฏิบัติการ ชันสูตรโรค” ของชมรมคุณภาพและมาตรฐานห้องปฏิบัติการชันสูตรโรค บรรณาธิการคือ สุดารัตน์ มโน เชี่ยวพินิจ กุลนารี สิริสาส์ ปานทิพย์ วัฒนวิบูลย์ จำรัส พร้อมมาศ

เป็นต้น

9. การจัดประชุมวิชาการนานาชาติ

1 เป็นประธานจัดประชุมวิชาการนานาชาติ (The DOMI Program: Shigellosis Workshop) ให้แก่ International Vaccine Institute, WHO, Korea ที่โรงแรมเซ็นจูรี่ปาร์ค 6-11 พฤศจิกายน 2543

2 The Third Seminar on Food-borne Parasitic Zoonoses ในฐานะกรรมการอำนวยการและที่ปรึกษา Scientific Committee เป็นประธานภาคการประชุม Symposium เรื่อง “Trichinellosis” และติดต่อวิทยากรท่านอื่น ๆ จากต่างประเทศและสถาบันอื่น เมื่อ 6-8 ธันวาคม 2543 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์ กรุงเทพฯ

3 Joint International Tropical Medicine Meeting ในฐานะคณะกรรมการอำนวยการและที่ปรึกษา Scientific Committee เป็นผู้จัด Symposium เรื่อง Pyrexia of Unknown Origin และติดต่อวิทยากรท่านอื่น ๆ จากต่างประเทศและสถาบันอื่นรวมทั้งเป็นประธานร่วมในภาคการประชุม 6-8 ธันวาคม 2543 ณ โรงแรมรอยัลริเวอร์ กรุงเทพฯ

4 การประชุมปฏิบัติการออกจากร่าง ครั้งที่ 12 “การควบคุมออกจากร่าง: ปัญหาและแนวทางการแก้ไขในทศวรรษที่ 21” จัดโดยมหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมกับกระทรวงสาธารณสุขและองค์การอนามัยโลก 24-26 ตุลาคม 2543 ที่ห้องประชุมอารี วิลยะเสวี คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ทำหน้าที่คณะกรรมการจัดประชุม และ Scientific Committee

5 เป็นประธานจัด Close Workshop on Social Science Aspects of Shigellosis, Typhoid and Cholera ให้แก่ International Vaccine Institute ประเทศเกาหลี ณ โรงแรมเซ็นจูรี่ปาร์ค กรุงเทพฯ วันที่ 18 – 22 กุมภาพันธ์ 2545

6 เป็นที่ปรึกษาและคณะกรรมการอำนวยการจัดประชุมวิชาการนานาชาติ “2002 ICLAS Regional Scientific Meeting on a Search for Quality and Better Welfare” คำสั่งมหาวิทยาลัยมหิดล ที่ 2121/2544

7 เป็นประธานจัด Workshop on Leptospirosis Diagnosis by Antigen Detection ให้แก่สำนักเลปโตสไปโรซีส กรมควบคุมโรคติดต่อ เมื่อ 27 กรกฎาคม 2544

8 เป็น International Scientific Committee จัดประชุม The 9th & the 10th Asian Conference on Diarrheal Diseases and Nutrition, Delhi, India, September 28-30, 2001, และที่ ICDDR-B, Bangladesh, 7-8 ธันวาคม 2546 ตามลำดับ

9 เป็นประธานจัดการประชุมวิชาการ RGJ Seminar Series: Immunology of Infectious Diseases, Thailand Research Fund เมื่อวันที่ 19 กรกฎาคม 2544

10 คณะกรรมการอำนวยการจัดประชุมนานาชาติ Joint International Tropical Medicine เมื่อ สิงหาคม 2544

เป็นต้น

10. เป็นกรรมการเป็นที่ปรึกษา ผู้ทรงคุณวุฒิ และ resource person

1. เป็นที่ปรึกษา ฯพณฯ รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงสาธารณสุข นายแพทย์สุรพงษ์ สืบวงศ์ลี คำสั่งกระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 474/2544 ลว. 12 มิถุนายน 2544

2. เป็นกรรมการที่ปรึกษาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คำสั่ง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เลขที่ 167/2544 ลว. 22 มีนาคม 2544

3. เป็น JICA Expert ในโครงการ South to South ถ่ายทอดเทคโนโลยี และเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ WHO Collaborating Center, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, India เมื่อกุมภาพันธ์ 2544 โดยเป็น JICA Expert คนแรกของ Project นี้ที่ไม่ใช่ชาวญี่ปุ่น

4. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของทบวงมหาวิทยาลัยเพื่อประเมินผลงานทางวิชาการของผู้ขอกำหนด ตำแหน่งศาสตราจารย์และศาสตราจารย์ระดับ 11

5. เป็นกรรมการพิจารณาตำแหน่งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยมหิดล จนถึง กันยายน 2545

6. ประเมินผลงานของผู้ขอกำหนดตำแหน่งทางวิชาการและตำแหน่งในระดับที่สูงขึ้นของหน่วยงานในต่างประเทศคือ

1). University of Malaya 2 ราย คือ

- Dr. Zurainee bt. Mohamed Nor
- Dr. Jamaiah bt. Ibrahim

2). Laboratory Science Division, Institute of Cholera and Diarrheal Diseases Research of Bangladesh (ICDDR-B) 2 รายคือ

- Dr. Tasmin Azine
- Dr. Anowar Hossain

7. เป็น External Evaluator ของ Laboratory Science Division, International Center for Diarrheal Diseases Research of Bangladesh, Dhaka, Bangladesh เมื่อ 2-5 มิถุนายน 2545

8. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของหน่วยงานต่างๆ เช่น

- มหาวิทยาลัยต่างๆ เพื่อประเมินผลงานของผู้เสนอกำหนดตำแหน่งทางวิชาการที่สูงขึ้น อาทิ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ศิลปากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์
- เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของกระทรวงสาธารณสุข สร้าง “คู่มือแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันในผู้ใหญ่”
- เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเพื่อพิจารณานักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ ผลงานวิจัยดีเยี่ยมแห่งชาติและวิทยานิพนธ์ประจำปีและรางวัลนักประดิษฐ์คิดค้นแห่งชาติ

9. เป็นคณะกรรมการสภာวิจัยแห่งชาติสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

10. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิในคณะกรรมการวัคซีนแห่งชาติ

11. กำหนดนโยบายการวิจัยระดับชาติ

กำหนดนโยบายแห่งชาติฉบับที่ 6 ด้านสุขภาพชุดโครงการที่ 8 : ชุดตรวจวินิจฉัยโรคสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

12. เป็น Resource person เช่น:

- เป็น Resource person ในการประชุมเรื่อง “บทบาทของเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ต่อระบบการวิจัยแห่งชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี” ระหว่าง 14-16 ธันวาคม 2544 ณ โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี และที่จังหวัดเชียงใหม่ ธันวาคม 2545
- เป็น Resource person ให้แก่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขเรื่อง “ผลิตภัณฑ์เชื้อกำจัดหนูชีวภาพ Biorat โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis*” เมื่อวันที่ 8 ตุลาคม 2544
- เป็น Resource person ในการประชุมโต๊ะกลมให้แก่ ศช. เรื่อง “สถานภาพการวิจัยและการพัฒนาวัคซีน และแนวทางการวิจัยด้านวัคซีนในอนาคต” เมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2544 ที่โรงแรมโนโวเทล โลตัส สุขุมวิท ซอย 33
- เป็น Resource person ให้แก่สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในการทำแผนการวิจัยแห่งชาติฉบับที่ 6 เมื่อวันที่ 22 กุมภาพันธ์ 2545

เป็นต้น

13. เป็นบรรณาธิการวารสารนานาชาติ

□ Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology ซึ่งเป็นวารสารทางการแพทย์ของ Federation of Allergology and Immunology ซึ่ง Launched โดยสมาคมโรคภูมิแพ้และอิมมูนวิทยาแห่งประเทศไทย และเป็นวารสารนานาชาติเพียงวารสารเดียวในประเทศไทยที่อยู่ใน ISI และมี Impact factor ตั้งแต่ volume 10-volume 21 (ปัจจุบัน)

□ เป็นที่ปรึกษาคณะบรรณาธิการของ The Journal of Tropical Medicine and Parasitology

□ เป็นที่ปรึกษากองบรรณาธิการ “เขตร้อนสัมพันธ์”

14. งานบริการวิชาการ

14.1 การตรวจพิเศษทางอิมมูนวิทยา

ให้บริการการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อทางอิมมูนวิทยาโดยวิธีพิเศษที่ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูนโโลยีพัฒนาขึ้นมาเอง ได้แก่ การวินิจฉัยโรคพยาธิตัวจิ๋ว ไข้ไทฟอยด์ ทริคิเนลโลสิส โรคพยาธิหอยโข่ง และซัลโมเนลโลสิส ซึ่งทำเป็นประจำและโรคอื่นๆ ซึ่งให้บริการเป็นครั้งคราว

14.2 เป็นหัวหน้าโครงการของศูนย์ประยุกต์และบริการวิชาการ คือ โครงการ tmwcc tropical infection diagnostic test kits ซึ่งเตรียม (manufacture) จัดจำหน่ายและจัดส่งชุดตรวจโรคติดเชื้อในเขตร้อนสำเร็จรูป พร้อมทั้งประสานงานกับผู้ใช้ อธิบายและให้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์

14.3 ให้บริการต่างๆ เช่น

□ ให้แอนติเจน monoclonal antibodies ซึ่รุ่มและสารเคมีเพื่อใช้ในการวิจัยและการบริการแก่นักวิชาการและหน่วยงานต่างๆ

14.4 จัดแสดงนิทรรศการ เรื่องการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* อย่างรวดเร็วโดยชุดตรวจสำเร็จรูปวันที่ 28 กุมภาพันธ์ 2545 ณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

□ ผลงานนิทรรศการเรื่อง “การวินิจฉัยโรคติดเชื้อในเขตร้อนและการพัฒนาวัคซีน” ในงานฉลองครบรอบ 40 ปี เพื่อถวายสมเด็จพระมหาลงนราธิวาสราชชนครินทร์ทอดพระเนตรในการเปิดอาคารเฉลิมพระเกียรติ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน เมื่อ ธันวาคม 2543

□ รายการโทรทัศน์ “หน้าต่างสุขภาพ” ของช่อง 11 เรื่อง “โรคปัสสาวะหนู” 25 กรกฎาคม 2544 และ 11 สิงหาคม 2544

□ บริการความรู้แก่ประชาชนในหนังสือพิมพ์บางกอกโพสต์เรื่อง “การตรวจวินิจฉัยโรคฉี่หนู” สิงหาคม 2544

- ให้คำปรึกษาแนะนำการเขียน กม.03 กม.07 กจ.08 กจ.07 การขอตำแหน่งวิชาการระดับต่าง ๆ ผู้ชำนาญการ ผู้เชี่ยวชาญ และอื่น ๆ
- ให้คำปรึกษาแนะนำการทำวิจัยแบบครบวงจรตั้งแต่การ identify ปัญหา การเขียนโครงร่างการวิจัย และเสนอขอทุน โดยชี้แนะแหล่งทุนที่เหมาะสม การวางแผนและขั้นตอนการทำวิจัย การส่งข้อและจัดหาวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ การแปลผลการทดลอง การวิเคราะห์ข้อมูล การวิจารณ์ผลสรุปการทดลอง การเขียนรายงาน การเขียน manuscript ตามคำแนะนำ ดิชม และข้อคิดเห็นของวารสาร การ revise manuscript และอื่น ๆ
- ให้คำปรึกษาแนะนำการทำหลักสูตรใหม่ การปรับปรุงหลักสูตร แกไขรหัสวิชาคำอธิบายรายวิชา และอื่น ๆ
- ออกจดหมายรับรองการเข้าศึกษาต่อ และการสมัครงานแก่บัณฑิตที่จบการศึกษาไปแล้วหรือเจ้าหน้าที่ในภาควิชา/คณะ
- ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือ/อุปกรณ์ต่างๆ หรือช่วย operate เครื่องมือในบางครั้งแก่นักวิจัย
- ให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ ในงานวิจัยแก่นักวิจัย และนักศึกษาทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- เสนอแนะการจัดซื้อตำราหรือวารสารวิชาการที่เหมาะสมแก่การเรียนการสอน/การวิจัยของคณะฯ และอื่น ๆ
- ตอบคำถามและให้ข้อมูลใน questionnaires ต่าง ๆ เพื่อการบริหารงาน การพัฒนาหน่วยงานและการวิจัยแก่หน่วยงานต่างๆ นักวิจัยและนักศึกษา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ
- เป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย อาทิ:
 - โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสของโคมนในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน” รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิชัย โรจนเสถียร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เป็นหัวหน้าโครงการ
 - โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาประสิทธิภาพของยาปฏิชีวนะต่างๆ ในการกำจัดสภาวะรังโรคเลปโตสไปโรซิสในโค” สถาบันสุขภาพสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
 - โครงการวิจัยเรื่อง “Recombinant *Gnathostoma spinigerum* specific antigen” นายแพทย์พิชาติ อุปราญเคราะห์ เป็นหัวหน้าโครงการ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในการปรึกษาหารือเรื่อง “โรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส [Leptospirosis])” ให้คำปรึกษาหารือเรื่อง “การศึกษาวิจัยการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสและโรคสครับไทฟัสทางอาการ ทางห้องปฏิบัติการในคนและสัตว์รังโรค”

□ ประเมิน manuscripts ที่ขอลงตีพิมพ์ในวารสารต่างๆ อาทิ Sciences Asia, Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology, International Journal for Parasitology, Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health

15. งานในลักษณะอื่น ๆ

1. เป็นประธานกรรมการคัดเลือกนักศึกษาผู้รับทุน “รางวัลนักศึกษาแพทย์ดีเด่นกองทุนนายแพทย์ทรงกิจ อติวานิชยพงศ์” คำสั่งคณะแพทย์โรงพยาบาลรามารับดี ที่ 298/2544
2. เป็นผู้แทนสภามหาวิทยาลัยในกรรมการสรรหาผู้อำนวยการสถาบันวิจัยภาษาและวัฒนธรรมเพื่อพัฒนาชนบท
3. เป็นคณะกรรมการกลุ่มสภาวิชาการ/ตำแหน่งทางวิชาการ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. เป็นกรรมการประเมินผลการปฏิบัติงานของข้าราชการและลูกจ้างของคณะเวชศาสตร์เขตร้อน
5. เป็นกรรมการสรรหาหัวหน้าภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล ในฐานะผู้ทรงคุณวุฒิที่ภาควิชาฯเสนอ คำสั่งมหาวิทยาลัยที่ 2156/2544 ลงวันที่ 20 ธันวาคม 2544
6. เป็นกรรมการเตรียมการด้านการบริหารวิชาการและกรรมการด้านบริหารงานบุคคล เพื่อเตรียมการออกนอกระบบราชการของมหาวิทยาลัยมหิดล
7. เป็นกรรมการสรรหาผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล
8. เป็นผู้แทนคณาจารย์ในคณะกรรมการพิจารณาตำแหน่งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยมหิดล
9. เป็นกรรมการ ก.พ. เพื่อสอบคัดเลือกนักเรียนทุนเพื่อศึกษาต่อ ณ ต่างประเทศ เป็นต้น

16. กิจกรรมเพื่อสังคม

1. ได้รับเชิญให้ร่วมเป็นเกียรติในกิจกรรมต่าง ๆ ของคณะฯ คณะอื่น ๆ มหาวิทยาลัยและสถาบันอื่น ๆ ซึ่งได้กระทำโดยสม่ำเสมอเพื่อสร้างความสัมพันธ์อันดี
2. สนับสนุนกิจกรรมของหน่วยงานต่าง ๆ เช่น การร่วมเสนอชื่อผู้สมควรได้รับรางวัล นักวิจัยดีเด่นแห่งชาติ ผู้สมควรได้รับรางวัลมูลนิธิโรเทม ผู้สมควรได้รับรางวัลนักวิทยาศาสตร์รุ่นใหม่ เสนอชื่อ New Member of the Royal Academy of Sciences of Thailand เป็นต้น
3. เป็นสมาชิกสมาคมวิชาชีพต่าง ๆ เช่น
 - เป็นกรรมการบริหารสมาชิกผู้ก่อตั้งบัณฑิตสภาวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย สมาคมโรคภูมิแพ้และอิมมูนวิทยาแห่งประเทศไทย

- สมาคมสัตวแพทย์แห่งประเทศไทย
- สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
- Malaysian Association of Tropical Medicine and Parasitology
- สมาคม Thai-Australian Association
- สมาคมอายุรศาสตร์เขตร้อน และปรสิตวิทยาแห่งประเทศไทย
- สมาคมนักเรียนทุนรัฐบาลไทย
- สมาคมศิษย์เก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- Federation of Allergy and Immunology
- กรรมการบริหารสมาคมศิษย์เก่าสายปัญญาในพระบรมราชินูปถัมภ์ และอื่นๆ

17. กิจกรรมเพื่อการพัฒนาตนเอง

ติดตามความก้าวหน้าของวิทยาการและพัฒนาตนเองโดยเข้าร่วมฝึกอบรม เข้าร่วมประชุมวิชาการ และเข้าฟังการบรรยายทางวิชาการต่างๆ เช่น เข้าร่วมประชุมวิชาการทั้งระดับชาติและนานาชาติ เข้าร่วมสัมมนาวิชาการ

18. กิจกรรมเกียรติยศ

1. ได้รับรางวัล Asian Innovation Award จาก Asian Brain Power, Far-Eastern Economic Review เมื่อธันวาคม 2544
2. ได้รับรางวัลสัตวแพทย์ดีเด่นประจำปี 2544 จากสมาคมสัตวแพทย์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ เมื่อธันวาคม 2544
3. เป็นที่ปรึกษาฝ่ายวิชาการ ฯพณฯ รัฐมนตรีช่วยว่าการกระทรวงสาธารณสุข นายแพทย์สุรพงษ์ สืบวงศ์ลี พ.ศ. 2544-2545
4. เป็นที่ปรึกษา ประธานที่ประชุมประธานสภาอาจารย์ มหาวิทยาลัยทั่วประเทศ (ปอมท.) ระหว่างวันที่ 19 ส.ค. 2544 ถึง 14 ก.ค. 2545 ประกาศ ปอมท. ลงวันที่ 19 สิงหาคม 2544
5. เป็นคณะกรรมการที่ปรึกษาสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข คำสั่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 167/2544
6. เป็นคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิการให้ทุนพัฒนาการวิจัย คณะแพทยศิริราชพยาบาล คำสั่งที่ 814/2544
7. เป็นที่ปรึกษาสมาคมวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลองแห่งประเทศไทย
8. ได้รับการทาบทามให้เป็นอธิการบดีมหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ได้รับการทาบทามให้เป็นคณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เป็นต้น

9. เป็นเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 2543 – 2546
10. ได้รับเชิญให้เป็นผู้กำหนดนโยบายการวิจัยแห่งชาติ ฉบับที่ 6 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
11. เป็นผู้ทรงคุณวุฒิของหน่วยงานต่าง ๆ เช่น สกว. สวทช. กรมปศุสัตว์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมควบคุมโรคติดต่อ เป็นต้น
12. ได้รับรางวัลอาจารย์ดีเด่นแห่งชาติ ปอมท. เมื่อ 31 กรกฎาคม 2545 จาก ฯพณฯ นายกรัฐมนตรี
13. ได้รับรางวัล “สตรีไทยในงานวิทยาศาสตร์ที่โลกชื่นชม” จากบริษัท ลอรีอัล และองค์การยูเนสโก เมื่อ พฤศจิกายน 2545
14. ได้รับการแต่งตั้งจาก ฯพณฯ นายกรัฐมนตรีให้เป็นกรรมการสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ และอื่นๆ

Appendix

1. Test Kits for detection of pathogenic *Leptospira* antigen in Urine

The diagnostic test kits, namely Lepto-Dot, for detection of *Leptospira* antigenuria was provided by Science Development and Management Ltd. (SDM), Thailand.

General description of the test kits

A. Starter kit

Each starter kit contains :

- A.1 Slot-blot device
- A.2 Suction pump
- A.3 Water trapping flasks
- A.4 Rubber bungs and vacuum tubing (A.4)
- A.5 Plastic boxes ; Test (T) box (A.5.1) and Control (C) box (A.5.2)
- A.6 Antibody conjugate (0.3 ml)
- A.7 Enzyme conjugate (0.3 ml)
- A.8 Substrate (40 ml)

B. Test kit

Each test kit contains :

- B.1 Monoclonal antibodies, 100 ml
- B.2 Blocking Solution, 100 ml
- B.3 Washing buffer A (100 ml of stock solution). Working solution of washing buffer A is prepared by mixing 100 ml of the stock solution provided In the test kit with 2.4 litres of distilled water. This diluted buffer A should be kept in a tightly sealed container at room temperature for future use.
- B.4 Washing buffer B, 100 ml
- B.5 Control pieces, 20 pieces contained in a small plastic vial with cap
- B.6 Nitrocellulose membrane (NC); 80 x 100 mm, 2 pieces
- B.7 Filter paper; 80 X 110 mm, 2 pieces
- B.8 Work sheet

* Note : Always store the following reagents/materials at 4°C : A.6, A.7, A.8, B.1, B.2, B.4, B.5 and B.6

2. Specimen

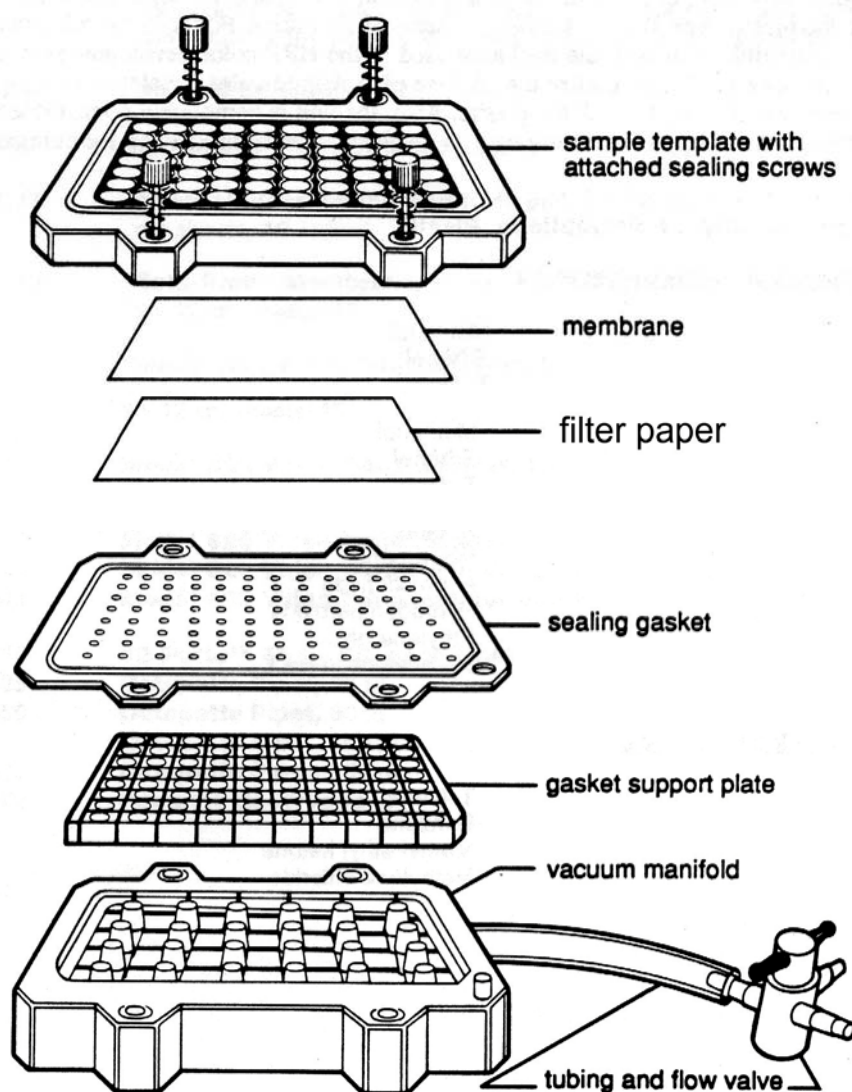
- 2.1 Fresh urine samples, urine stored at 4°C not over than 24 hours or urine stored at -20°C (to wait till the sample is dissolved).
- 2.2 Aliquot individually 1.5 ml of samples to 4 Eppendorf and mark appropriately. Six ml of urine samples was centrifuged at 12,000 × g for 10 min at room temperature; 5.5 ml of the supernatant was discarded. Boil at 100°C in the water bath for 20 minutes.

3. Procedure of the test

- 3.1 One NC sheet can be used for 48 urine samples by dividing the NC into two portions, i.e. Test NC (T1-T48) and Control NC (C1-C48), as shown below:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1	T2	T3	T4	T5	T6	C1	C2	C3	C4	C5	C6
B	T7	T8	T9	T10	T11	T12	C7	C8	C9	C10	C11	C12
C	T13	T14	T15	T16	T17	T18	C13	C14	C15	C16	C17	C18
D	T19	T20	T21	T22	T23	T24	C19	C20	C21	C22	C23	C24
E	T25	T26	T27	T28	T29	T30	C25	C26	C27	C28	C29	C30
F	T31	T32	T33	T34	T35	T36	C31	C32	C33	C34	C35	C36
G	T37	T38	T39	T40	T41	T42	C37	C38	C39	C40	C41	C42
H	T43	T44	T45	T46	T47	T48	C43	C44	C45	C46	C47	C48

Place filter paper (B.7) on the sealed gasket of the Slot-blot device (A.1). Place the NC on top, then cover with upper plate of the Slot-blot device and assemble slightly screws. Connect the device to the suction pump (A.2) which was linked with water trapping flasks (A.3) by vacuum tubing (A.4)



- 3.3 Open suction pump and use automatic pipette and tip pipette 200 μ l of urine sample and dot onto the plate of Slot-blot device correlating to the work sheet, i.e. urine sample no. 1 = T1. Dot the same specimen onto the C1 to make duplicate. Dot specimens no. 2 and so on onto the second and respective

holes of Slot-blot device. Use 1 pipette tip for 1 urine sample only. When finished, screw off the plate, mark the corner of right low paper and place Test NC and Control NC into the T box (A.7). Allow air-dry (about 5 minutes).

- 3.4 Place a control piece (B.5) into T box. Pour adequate volume of blocking solution (B.2) to cover the two NC pieces and the control piece. Leave the box at room temperature for 10 minutes with occasional rocking then discard the blocking solution.
- 3.5 Wash the NC pieces and control piece three times with diluted washing buffer A (B.3).
- 3.6 Place Control NC (C1-C48) into C box (A.5.2) while keeping Test NC and control piece in T box.
- 3.7 Pour MAb (B.1) to cover the Test NC and the control piece in the T box; pour washing buffer A into C box to cover the Control NC. Leave the two boxes at room temperature for 30 minutes with occasional shaking. Discard the MAb from the T box.

T1	T2	T3	T4	T5	T6
T7	T8	T9	T10	T11	T12
T13	T14	T15	T16	T17	T18
T19	T20	T21	T22	T23	T24
T25	T26	T27	T28	T29	T30
T31	T32	T33	T34	T35	T36
T37	T38	T39	T40	T41	T42
T43	T44	T45	T46	T47	T48

C1	C2	C3	C4	C5	C6
C7	C8	C9	C10	C11	C12
C13	C14	C15	C16	C17	C18
C19	C20	C21	C22	C23	C24
C25	C26	C27	C28	C29	C30
C31	C32	C33	C34	C35	C36
C37	C38	C39	C40	C41	C42
C43	C44	C45	C46	C47	C48

- 3.8 Wash Test NC and control piece in the T box 2-3 times with washing buffer A.
- 3.9 Dilute antibody conjugate (A.6) 1:2,000 with washing buffer A. Discard washing buffer A from both boxes and pour the diluted antibody conjugate to the two boxes. Leave the boxes at room temperature for 20 minutes with occasional shaking. Discard the conjugate and wash the membranes in the two boxes 2-3 times with washing buffer A.

- 3.10 Dilute enzyme conjugate (A.7) 1:2,000 with washing buffer A. Pour the diluted enzyme conjugate to the two reaction boxes to cover the NC. Leave at room temperature with occasional rocking for 20 minutes. Discard the conjugate and wash the NC 2-3 times with washing buffer A. **Wash all membranes in the two boxes 2 times with washing buffer B (B.4).**
- 3.11 Dilute substrate (A.8) 1:2 with washing buffer B. Pour the diluted substrate into the two boxes after discarding the washing buffer B. Cover both boxes with aluminium foil or keep the boxes in the dark for 5 minutes. Observe the control piece. The positive control on the control piece should develop a purplish-blue spot while the negative control shows a clear area. Discard the substrate solution from the two boxes and wash all membranes with distilled water.
- 3.12 Place the membranes on a filter paper and let air-dry. Read the results on the Test NC; any spot which contains *Leptospira* should appear as a purplish-blue spot on the Test NC distinguishable from the same on the Control NC which should reveal either clear area or spot of other "non-specific" color.

Note: Wash the plastic boxes thoroughly after use. Also, always use the same boxes as "Test" and "Control" boxes; as MAb might stick to the box and alternate use might give positive reaction to the "C" NC renders indistinguishable results between the "T" NC and the "C" NC in subsequent test. The forceps used with MAb must be thoroughly wash before using the same for the "C" series.

(ลงนาม)

(ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา)

เมธีวิจัยอาวุโส รุ่นที่ 5 (2543-2546)

ผู้รายงาน

วันที่ 14 สิงหาคม พ.ศ. 2546