บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้ฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทยในปัจจุบัน จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข พบว่า อัตราป่วยของประชากรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างมากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 เป็นต้นมา โดยอัตราป่วยจากเดิมอยู่ในช่วง 0.07-0.5 ต่อแสนประชากร ได้เพิ่มขึ้นเป็น 3.84, 3.57 และ 9.87 ในปี พ.ศ. 2540-2542 ตามลำดับ และอัตราป่วยตายในปี พ.ศ. 2542 พบว่ามีมากถึงร้อยละ 4.38 (สำนักระบาดวิทยา, 2548) จะเห็นได้ว่าผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวมีมากถึงครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยทั้งหมด ดังนั้นการตรวจกรองผู้ป่วยด้วยวิธีการที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วจะช่วยให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงทีซึ่งจะทำให้อัตราการเสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวลดน้อยลงได้

สำหรับวิธีการตรวจกรองผู้ป่วยโรคดังกล่าวจะใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีการตรวจกรอง (screening test) โดยทั่วไปจะใช้หลักการการเกาะกลุ่ม (agglutination) ได้แก่ latex agglutination (Ramadass P. 1999 : 137-40, ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2545 : 893-903), microcapsule agglutination (Suputtamongkol Y. 1998) หรือหลักการอื่นๆได้แก่ ELISA (Terpsta WJ. 1985 : 377-85), chemiluminescent (Waitkins SA. 1986 : 353-6) และ immunochromatography (Hatta M. 2000 : 515-20) เป็นต้น แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีความไวและความจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งจะต้องส่งตรวจซ้ำเพื่อป้องกันผลลบปลอม ในรายที่น่าสงสัย ซึ่งตามรูปแบบแนวทางการตรวจวินิจฉัยที่จัดทำโดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543) ได้กำหนดให้ส่งตรวจซ้ำด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA) ทั้งนี้เพราะวิธีนี้มีความไวสูงแต่ก็ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาและค่าบำรุงรักษาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผล การตรวจโดยวิธีนี้จึงมีเฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เช่น โรงพยาบาลประจำจังหวัด โรงพยาบาลศูนย์หรือเฉพาะที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เท่านั้น

ดังนั้น เมื่อมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสในพื้นที่ทุรกันดาร และมีความจำเป็นสำหรับการตรวจกรองเพื่อการรักษาเบื้องต้นก่อนที่จะรอผลการตรวจยืนยันอีกครั้งหนึ่ง วิธีการตรวจกรองที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในภาคสนามจึงมีความสำคัญในการช่วยแพทย์ในการรักษา ได้มีผู้นำ หลักการต่างๆมากมายเพื่อนำมาใช้ในการตรวจกรองสำหรับภาคสนาม ได้แก่ หลักการเกาะกลุ่มแต่พบว่าหลักการดังกล่าวถึงแม้ว่าจะสะดวก รวดเร็วและง่ายในการอ่านผล แต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องของความไวในการตรวจซึ่งเป็นหัวใจของหลักการตรวจกรอง หลักการ immunochromatography ซึ่งเป็นหลักการที่มีการพัฒนาในระดับสูง สามารถผลิตเป็น test kit เพื่อจำหน่าย แต่ก็ยังมีปัญหาในเรื่องความไวและราคาที่ค่อนข้างสูง ในขณะที่มีผู้พัฒนาวิธีการ ELISA ซึ่งเป็นหลักการที่มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูงมาประยุกต์ใช้ในภาคสนามในลักษณะของ immunoblot หรือ dot-ELISA โดยการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่ง Petchclai B และคณะได้ศึกษาโดยใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา serovar bataviae ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (Petchclai B. 1991 : 672-75) ต่อมาได้มีการพัฒนาความไวและความจำเพาะในการตรวจให้สูงมากขึ้นมาโดยตลอด เช่นในปี ค.ศ. 1995 Ribeiro และคณะ ได้พัฒนาวิธี dot-ELISA ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้แอนติเจนชนิด proteinase-K resistant antigen (PK-dot ELISA) ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็น 92.1 และ 97.5% ตามลำดับ (Ribeiro MA. 1995 : 452-6) ส่วน Bajani และคณะในปี ค.ศ. 2003 ศึกษาวิธีดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับหลักการอื่นได้แก่ IHA, ELISA และ IgM dot-ELISA dipstick test พบว่าความไวและความจำเพาะของวิธี IgM dot-ELISA dipstick เป็น 95.5 และ 98.8% ซึ่งสูงกว่าหลักการอื่น อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวก็ยังเป็น test kit ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงในปัจจุบัน (Bajani MD. 2003 : 803-9)

จากสภาพปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเลปโตสไปราโดยหลักการ dot-ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ทั้งนี้เนื่องจาก IgM จะปรากฏให้สามารถตรวจพบได้ในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อและช่วยให้สามารถแยกผู้ป่วยออกจากกลุ่มผู้ที่เคยติดเชื้อแต่หายแล้วโดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในเขตชุกชุมโรค (endemic area) ได้ และหลักการดังกล่าวนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการตรวจกรองภาคสนามได้เป็นอย่างดีเนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆตลอดทุกขั้นตอนในการทดสอบ และไม่ต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผล โดยจะเลือกใช้เชื้อ *Leptospra biflexa* serovar patoc ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรคแต่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่างสายพันธุ์ (genus specific) ของปฏิกิริยาการทดสอบแอนติบอดีในกลุ่มเชื้อเลปโตสไปรามาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับการทดสอบในครั้งนี้ และปรับปรุงวิธีการตรวจให้สะดวกมากขึ้นสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่การนำปั๊มสุญญากาศและไมโครเพลทมาใช้ใส่แผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสสำหรับใช้ในขั้นตอนต่างๆของวิธี ELISA

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1 เพื่อพัฒนาวิธี dot-ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา

2 ศึกษาความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบและประสิทธิภาพของการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อ เลปโตสไปราโดยวิธี dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้น จากตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและซีรัมควบคุม

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจ leptospiral antibody ชนิด IgM โดยใช้ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและซีรัมควบคุม สำหรับทดสอบความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิผลของวิธีทดสอบ โดยตัวอย่างซีรัม แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

1. ซีรัมของผู้ที่ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจากการวินิจฉัยทางคลินิก

2. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการตรวจในโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรซิส ได้แก่ ผู้ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ AFP, rheumatoid factor, ANA, anti HIV และโรคไข้เลือดออก เป็นต้น

3. ซีรัมจากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีอาการของโรค

4. ซีรัมจากผู้ที่มีสุขภาพดี และไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด รวมทั้งไม่มีประวัติของการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมาก่อน

กลุ่มที่ 2-4 เป็นซีรัมที่ให้ผลลบต่อการตรวจ leptospiral antibody โดยวิธี microscopic agglutination test (MAT)

สมมติฐานการวิจัย

การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างจากผลการวินิจฉัยทางคลินิก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยหลักการ dot-ELISA

2. สามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในภาคสนามสำหรับการตรวจกรองผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสระยะเริ่มแรกในภาคสนามได้