บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันโรคเลปโตสไปโรซิส ยังเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของกลุ่มประเทศในเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย การระบาดของโรคในทศวรรษที่ผ่านมาแม้ว่าอัตราป่วยและอัตราตายจะลดต่ำลง (สำนักระบาดวิทยา. 2548 : 174) แต่ก็ยังอยู่ในระดับที่เป็นปัญหาที่ต้องเฝ้าระวังและตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นในกลุ่มที่มีปัจจัยเสี่ยงเพื่อการรักษาในระยะเริ่มแรก อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญของการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสคือลักษณะอาการทางคลินิกที่ไม่จำเพาะ ไม่ชัดเจน อาการของผู้ป่วยจะคล้ายคลึงกับโรคในกลุ่ม febrile disease ได้แก่ โรคติดเชื้อริคเกตเซีย โรคไวรัสตับอักเสบบี หรือมาลาเรีย เป็นต้น (Tappero J. 1998 : 2405-592, Faine S. 1999 : 101-1) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสจึงจำเป็นต้องใช้ผลทางห้องปฏิบัติการร่วมด้วย จึงจะช่วยในการตรวจกรองผู้ป่วยเบื้องต้น ส่วนการตรวจเพื่อยืนยันผลนั้น ในปัจจุบันมีวิธีการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจและการตรวจทางน้ำเหลืองโดยวิธี MAT แต่ก็ยังมีปัญหาในด้านความยุ่งยากของการอ่านผลซึ่งต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญสูงรวมถึง ค่าใช้จ่ายในการทดสอบ และอันตรายจากการใช้แอนติเจนของเชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบวิธี MAT จึงมีผู้เสนอวิธีการตรวจอย่างรวดเร็ว (rapid diagnosis) เข้ามาใช้แทน (Smits HL. 2000 : 1272-5, Yersin C. 1999 : 38-45) โดยเปรียบเทียบกับวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งในปัจจุบันได้มีผู้พัฒนาวิธีการขึ้นหลายวิธี ได้แก่ latex agglutination, IFA, IIP, ELISA และ dot-ELISA ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาวิธี dot-ELISA ขึ้นสำหรับใช้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราเพื่อใช้ในการตรวจกรองและวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มแรก

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่า วิธีที่เหมาะสมในการเตรียมแอนติเจนคือการใช้ความร้อนเป็นเวลา 10 นาที และแช่แข็งที่ –20^{O}C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ว sonicate 20 kHz 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เป็นจำนวน 3 รอบ (ระยะเวลาโดยรวม 24 ชั่วโมง) ซึ่งสามารถเตรียมได้แอนติเจนปริมาณมากที่สุด ส่วนสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี IgM dot–ELISA ได้แก่ การใช้แอนติเจนความเข้มข้น 0.3 μg/10μl ที่สกัดจากเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc หยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ล้างด้วย PBST 3 ครั้งแล้วเติม 5% BSA เพื่อบล็อก จากนั้นเติมตัวอย่างซีรัมที่เจือจาง 1:100 จำนวน 100 μl ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แล้วบล็อกซ้ำด้วย 5% BSA จากนั้นเติมคอนจูเกตที่เจือจาง 1:1,000 จำนวน 100 μl

แล้วล้างซ้ำด้วย PBS-T โดยทุกขั้นตอน incubate 30 นาที และล้าง 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายเติม AEC substrate 100 µl นาน 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น เมื่อนำวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นมาเปรียบเทียบกับผลการวินิจฉัยทางคลินิก โดยใช้ตัวอย่างทดสอบจากผู้ป่วยและตัวอย่างควบคุมจำนวน 130 ตัวอย่าง พบว่าให้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และ ประสิทธิผลของวิธี IgM dot-ELISA เป็น 74.0, 93.7, 88.1, 85.2 และ 86.1% ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสอดคล้องของวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการวินิจฉัยทางคลินิก พบว่ามีความสอดคล้องกันในระดับ κ เท่ากับ 0.70 โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นวิธี IgM dot-ELISA จึงเป็นวิธีที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจกรองผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเบื้องต้นในภาคสนามได้

อภิปรายผล

วิธี IgM dot-ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราที่พัฒนาขึ้น พบว่าให้ค่าความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิผลของวิธีทดสอบเป็น 74.0, 93.7, 88.1, 85.2 และ 86.1% ตามลำดับ โดยมีผลบวกปลอม 5 ตัวอย่าง จากกลุ่มผู้ป่วยโรคอื่นๆ 4 ตัวอย่าง (ไวรัสตับอักเสบบีและซี 3 ตัวอย่าง, hCG 1 ตัวอย่าง) และกลุ่มผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด 1 ตัวอย่าง ส่วนผลลบปลอมมี 13 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 130 ตัวอย่าง ซึ่งในส่วนของผลบวกปลอมเมื่อพิจารณาจากขั้นตอนของการทดสอบหาสภาวะเหมาะสมพบว่ามีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ประกอบด้วย

1. การเลือกสายพันธุ์ (serovar) ของเชื้อเลปโตสไปรา เพื่อใช้เตรียมแอนติเจน

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยเลือกใช้เชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคแต่สามารถทดสอบให้ปฏิกิริยาข้ามกลุ่มภายในสกุลเดียวกัน (genus specific) กับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ก่อโรค ซึ่งมีความสะดวกในการนำมาทดสอบ จากนั้นเมื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี IgM dot-ELISA พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้ออื่นซึ่งมีลักษณะทางกายภาพเป็นแบคทีเรียชนิดเกลียว (spirochete) เหมือนกันได้แก่ เชื้อก่อโรคซิฟิลิส ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทดสอบกับซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกกับการตรวจ VDRL และ TPHA จำนวน 4 ตัวอย่าง และให้ผลลบทั้งหมด ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในโรคซิฟิลิสมีรายงานการศึกษาจาก Appassakij และคณะ (Appassakij H. 1995 : 340-3) ซึ่งทดสอบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสโดยใช้หลักการ IFA ในขณะที่การศึกษาของ Zochowski WJ และคณะ (Zochowski WJ. 2001 : 25-30) ซึ่งตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM โดยวิธี ELISA พบว่าให้ผลบวกปลอมในกลุ่มของผู้ป่วยซิฟิลิส Toxoplasma Epstein-Barr virus (EBV) ไวรัสตับอักเสบเอ และผู้ที่ให้ผล rheumatoid factor เป็นบวก ส่วนการ

ศึกษาของคณะผู้วิจัยซึ่งใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบดังกล่าวมาศึกษาพบว่าไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับการทดสอบ IgM dot-ELISA แต่ให้ผลบวกปลอมกับการทดสอบไวรัสตับอักเสบซีและไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งอยู่ในกลุ่มไวรัสตับอักเสบเหมือนกัน ในขณะที่ธารารัชต์ ธารากุล (ธารารัชต์ ธารากุล. 2545) ได้ศึกษาการเตรียมแอนติเจนและพบว่าแอนติเจนที่ใช้ทดสอบควรเป็นแอนติเจนที่จำเพาะในเชื้อตัวนั้น แล้วยังควรเป็นแอนติเจนที่มีอยู่ในเชื้อนั้นทุกสายพันธุ์ (representative) เพื่อให้สามารถวินิจฉัยได้ไม่ผิดพลาด เพราะเชื้อต่างสายพันธุ์อาจจะมีแอนติเจนบางอย่างที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้แอนติเจนชนิดเดียวที่พบในเชื้อทุกสายพันธุ์ หรือใช้แอนติเจนหลายชนิดจากเชื้อหลายสายพันธุ์ประกอบกันในชุดตรวจวินิจฉัย ซึ่งแอนติเจนแต่ละชนิดอาจพบเฉพาะในบางสายพันธุ์ได้ เมื่อนำเอาแอนติเจนเหล่านี้มาใช้ร่วมกันจะทำให้สามารถครอบคลุมลักษณะของแอนติเจนทุกสายพันธุ์ สำหรับในการศึกษานี้ ผู้วิจัยใช้เชื้อ *Leptospira biflexa* serovar patoc ซึ่งสะดวกในแง่ของการเตรียมเป็นแอนติเจนและสามารถให้ผลการทดสอบได้ดีเช่นเดียวกัน

สำหรับในส่วนของการเตรียมแอนติเจน เนื่องจากมีรายงานการวิจัยการเตรียม crude antigen ซึ่งสามารถเตรียมได้สะดวกสำหรับในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยการศึกษาของ Nakarin J และคณะ (Nakarin J. 2004: 1218-1224) ได้ศึกษาวิธีการเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar bataviae โดยพบว่า วิธี sonicate จะให้ผลดีที่สุดทั้งในด้านความไวและความจำเพาะสำหรับการตรวจกรองเพื่อหาแอนติบอดีชนิด IgM ในซีรัมผู้ป่วยเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ซึ่งผู้วิจัยก็ได้ทดสอบด้วยวิธีการต่างๆเช่นกัน และพบว่าการนำวิธี sonicate มาใช้ร่วมกับการใช้ความร้อน (heat) และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{O}C ยังสามารถสกัดแอนติเจนได้ปริมาณสูงกว่าวิธีอื่นอีกด้วย

2. การใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสเป็น solid phase สำหรับการทดสอบ

จากการศึกษาของศราวุธ และคณะ ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG ด้วยวิธี dot ELISA ซึ่งคณะผู้วิจัยได้เลือกใช้กระดาษไนโตรเซลลูโลสหลายชนิดและพบว่าการใช้กระดาษแต่ละชนิดที่แตกต่างกันมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาบนกระดาษ (ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2548 : 225-32) ซึ่ง นภาธร บานชื่น (นภาธร บานชื่น. 2536) ได้ศึกษาวัสดุสำหรับยึดติดแอนติเจนหรือแอนติบอดี พบว่าถ้าแอนติเจนหรือแอนติบอดีจับกับวัสดุได้ไม่ดีพอ จะมีผลทำให้การทดสอบมีความไวลดลงและพบได้บ่อยว่าเป็นสาเหตุให้การทดสอบนั้นมี background สูงขึ้น ในกรณีที่การจับของแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับวัสดุนั้นเกิดขึ้นอย่างไม่สม่ำเสมอ จะเป็นเหตุให้ reproducibility ของการทดสอบลดลง ซึ่งจะทำให้ความน่าเชื่อถือของการทดสอบนั้นลดลงด้วยเช่นกัน

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีการทดสอบ (การบล็อค การเจือจางซีรัม และขั้นตอนปฏิกิริยาการทดสอบ)

จากการศึกษาของ ศราวุธ และคณะ (ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2548 : 225-32) พบว่าการใช้ skim milk มีปัญหาของปฏิกิริยาข้ามกลุ่มเกิดขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ BSA จึงเลือกใช้ BSA สำหรับการทดสอบในปฏิกิริยานี้และพบว่าไม่มีปัญหาของ background เกิดขึ้น ในส่วนของการเจือจางซีรัม ผู้วิจัยได้เลือกระดับไตเตอร์ของการทดสอบเป็น 1:100 และ 1:200 โดยใช้ระดับจุดตัดผลบวกที่ต่ำที่สุด (1:100) เป็นระดับการทดสอบ เช่นเดียวกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราของผู้วิจัยอื่นที่ใช้ไตเตอร์ตั้งต้นในระดับเดียวกัน (Appassakij H. 1995 : 340-3) นอกจากนี้ในส่วนของการใช้กลุ่มตัวอย่างซึ่งผู้วิจัยได้แบ่งตัวอย่างควบคุม (control) เป็นสามกลุ่มคือกลุ่มตัวอย่างผู้ป่วยด้วยโรคอื่นๆ เพื่อศึกษาในส่วนของปฏิกิริยาข้ามกลุ่มระหว่างผู้ป่วยโรคอื่นๆและโรคเลปโตสไปโรซิส กลุ่มผู้มีสุขภาพดีที่ตรวจสุขภาพประจำปี และกลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการและอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด โดยเลือกใช้ตัวอย่างส่วนใหญ่จากกลุ่มผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดค่อนข้างสูง ดังที่มีรายงานการศึกษาของ Sejva J และคณะ(Sejva J. 2005: 289-95) ประกอบด้วยจังหวัดสกลนครและมหาสารคามจำนวน 14 ตัวอย่างจาก 24 ตัวอย่างทดสอบในกลุ่ม endemic area ทั้งหมดคิดเป็น 58.3% และไม่พบผลบวกปลอมเกิดขึ้นใน 14 ตัวอย่างดังกล่าว ส่วนการใช้คอนจูเกตและสับสเตรทในปฏิกิริยา dot-ELISA มีรายงานของ Zochowski WJ และคณะ (Zochowski WJ. 2001 : 25-30) ซึ่งได้ประเมินชุดทดสอบโดยหลักการ ELISA สองแบบที่ใช้คอนจูเกตและสับเสตรทต่างระบบกัน (ชุดแรกเป็น HRP และ TMB ชุดที่สองเป็น ALP และ pNP; *p*-nitrophenyl phosphate) จากสองบริษัท และพบว่าแบบที่ใช้คอนจูเกตซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP จะให้ผลที่มีความจำเพาะสูงกว่าแต่ความไวต่ำกว่าเล็กน้อย ในกลุ่ม endemic area นี้มีให้ผลบวกปลอม 1 ตัวอย่างจากผู้ที่อยู่ในพื้นที่จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกันกับที่เคยให้ผลบวกในการทดสอบหาแอนติบอดีชนิด IgG ของศราวุธและคณะ (ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2548 : 225-32) แต่ต่างกันที่ผลบวกปลอมในการวิจัยครั้งนี้เป็นผลบวกอ่อน (weakly positive) ซึ่งจากการศึกษาของ da Silva MV และคณะ (Silva MV. 1997 : 650-5) พบว่าระดับของแอนติบอดีชนิด IgM สามารถปรากฏในกระแสเลือดได้นานถึง 10 เดือน และมีรายงานว่าในบางกลุ่มจะมีระดับแอนติบอดีปรากฏได้เกินกว่า 1 ปีขึ้นไปอีกด้วย ในขณะที่ K. natrajaseenivasan ได้ศึกษาระดับแอนติบอดีของโรค Leptospirosis ระยะ acute phase และ convalescence phase พบว่าปริมาณของ IgM จะเพิ่มขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ convalescence แต่ปริมาณของ IgG จะลดลง (Natarajaseenivasan K. 2004 : 193-7) ซึ่งตัวอย่างนี้อาจจะเป็นตัวอย่างของผู้ที่เคยป่วยหรือติดเชื้อเลปโตสไปโรซิสมาเป็นเวลานานทำให้ระดับแอนติบอดีชนิด IgM ลดต่ำลงแต่ยังอยู่ในระดับที่สามารถตรวจพบได้ สำหรับตัวอย่างในการศึกษานี้เก็บตัวอย่างจากผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่

มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส (endemic area) และมาตรวจสุขภาพทั่วไปที่โรงพยาบาลประจำจังหวัดโดยไม่มีอาการของโรคเลปโตสไปโรซิส แต่เนื่องจากไม่ได้สัมภาษณ์โดยตรงทำให้ขาดข้อมูลเชิงประวัติสำหรับนำมาประกอบการอธิบายผลในครั้งนี้

สำหรับในส่วนของผลลบปลอมจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม acute phase sera จำนวน 5 ตัวอย่าง และ convalescence phase sera จำนวน 8 ตัวอย่าง ศันสนีย์และคณะ (ศันสนีย์ ตันติ์จธัม. 2549 : 18-28) ได้นำมาทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง พบว่าให้ผลลบจำนวน 6 ตัวอย่างและให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ต่ำ (1:100, 1:200) จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงถึงปัญหาในด้านความไวของวิธีการทดสอบ อย่างไรก็ตามจากแนวทางการชันสูตรโรคของกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ต้องตรวจยืนยันผลทางห้องปฏิบัติการร่วมกับลักษณะอาการทางคลินิกอยู่แล้ว โดยผลการตรวจกรองครั้งแรกเมื่อให้ผลลบและมีลักษณะอาการทางคลินิกที่น่าสงสัย จะต้องตรวจยืนยันผลด้วยหลักการที่มีความจำเพาะสูงกว่าต่อไป

สำหรับวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่ใช้ sonicated antigen ของเชื้อเลปโตสไปราในการเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อและแยกชนิดของแอนติบอดีออกโดยใช้คอนจูเกตที่เป็นชนิด anti human IgM ซึ่งมีปัญหาในเรื่องของการทำให้เกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะและการบดบัง (masking) IgM ในการจับกับแอนติเจนจากแอนติบอดีชนิดอื่นในซีรัม มีผู้นำวิธีการ IgM capture ELISA ที่ใช้แอนติบอดีต่อ IgM มาเคลือบบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสแทนแอนติเจนและพบว่ามีความไว ความจำเพาะค่อนข้างสูง ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยไข้เลือดออก (Lam SK. 1998 : 75-81, Cuzzubo AJ. 2000 : 135-44) หรือไข้ไทฟอยด์ (Ong LY. 1989 : 195-8) ซึ่งถึงแม้ว่าวิธีดังกล่าวจะมีความไวและความจำเพาะสูง แต่ก็มีข้อจำกัดในด้านของค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นจากสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

อย่างไรก็ตามวิธี IgM dot-ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นเพียงการศึกษานำร่องเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาวิธีดังกล่าวไปสู่การสร้างชุดตรวจสำเร็จรูป (test kit) ต่อไปในอนาคต ซึ่งจะต้องมีการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องในด้านต่างๆต่อไป

ข้อเสนอแนะ

วิธี IgM dot-ELISA เป็นวิธีที่มีข้อดีหลายประการที่เหมาะสำหรับการนำไปใช้ตรวจกรองโรคในระยะเริ่มแรก (early detection) เนื่องจากเป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่งปรากฏขึ้นก่อนเมื่อมีการติดเชื้อ นอกจากนี้วิธีดังกล่าวยังทำได้สะดวกทั้งในด้านของการทดสอบและการ

อ่านผล ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์พิเศษที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของผู้วิจัยพบว่ายังมีปัญหาในเรื่องของความไวในการตรวจที่ยังไม่สูงพอ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากแอนติเจนที่เตรียมใช้ในงานวิจัยนี้เป็นแอนติเจนชนิดหยาบ (crude antigen) แต่ก็เป็นแอนติเจนที่สามารถเตรียมขึ้นใช้เองได้ในห้องปฏิบัติการที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อทั่วไปอยู่แล้ว จึงควรที่จะต้องพัฒนาวิธีการเตรียมแอนติเจนให้ได้เป็นแอนติเจนบริสุทธิ์ (purified antigen) ซึ่งจะต้องใช้วัสดุอุปกรณ์และเทคโนโลยีเพิ่มเติมมากขึ้น นอกจากนี้จากหลักการดังกล่าวน่าจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยอย่างรวดเร็ว (rapid test) ด้วยหลักการของปฏิกิริยาการติดฉลากอื่น ๆ ที่ใช้พื้นผิวยึดเกาะ (solid phase) บนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกัน เช่น หลักการ immunochromatography เป็นต้น

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學