

**APPLICATION OF RECOMBINANT OUTER MEMBRANE
PROTEIN IN SERODIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2008**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การผลิตและใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส
(APPLICATION OF RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN IN
SERODIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS)

ณัฐวุฒิ วงษ์ดีไทย 4737014 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชาริรัตน์ กะลัมพะเหติ, Ph.D. (Microbiology), พงนิย์ ศรี
มาโนชญ์, Ph.D. (Molecular Microbiology), วาริ ว่องโชติกุล, Ph.D. (Microbiology),
นิตยา อินทราวัฒนา, Ph.D. (Medical Technology)

บทคัดย่อ

ความไวในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสนั้น มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการตรวจวินิจฉัยโรค LA0730 และ LigA โปรตีน ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้จะนำมาทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนว่ามีลักษณะเหมือนกับโปรตีนจากเชื้อเลปโตสไปราในธรรมชาติหรือไม่ โปรตีนทั้งสองชนิดถูกนำไปฉีดในหนูสำหรับการสร้างแอนติบอดี แอนติบอดีที่ได้จะถูกทดสอบกับโปรตีนจากเชื้อด้วยวิธี Western blot พบว่าซีรัมหนูที่จำเพาะกับ LA0730 และ LigA ไม่ทำปฏิกิริยากับโปรตีนสกัดจากเชื้อเลปโตสไปรา รีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ถูกนำไปทดสอบกับซีรัมคนไข้ ผลปรากฏว่า สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ LigA โปรตีนได้ในซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส แต่แอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยากับ LA0730 เลย ดังนั้น รีคอมบิแนนท์ LigA โปรตีน จึงถูกนำไปใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส โดยใช้ซีรัมจากผู้ป่วยโดยโรคที่ทำให้เกิดไข้สูง และคนปกติเป็นกลุ่มเปรียบเทียบโดยวิธี ELISA ผลการศึกษาพบว่า ค่าความไวในการตรวจหาแอนติบอดีในระยะ acute phase ชนิด IgM และ IgG เท่ากับ 70% และ 73% ตามลำดับ และค่าความไวจะสูงขึ้นเป็น 82% เมื่อผลบวกของ IgM และ IgG ถูกนำมารวมกัน สำหรับระยะ convalescence phase ค่าความไวให้ที่ 59% และ 68% สำหรับ IgM และ IgG ตามลำดับ และสูงขึ้นเป็น 77% เมื่อผลถูกนำมารวมกัน นอกจากนี้ค่าความจำเพาะของวิธีนี้ยังสูงถึง 94% สำหรับ IgM และ 98% สำหรับ IgG เป็นที่น่าสนใจว่า วิธี ELISA นี้สามารถตรวจพบผลบวกในกลุ่มที่มีผล MAT เป็นลบ โดยพบผู้ป่วยระยะ acute phase ให้ผลบวก 62% และผู้ป่วยระยะ convalescence phase ให้ผลบวก 72% ดังนั้นวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อ LigA โปรตีนโดยวิธี ELISA นั้นสามารถนำมาพัฒนาเพื่อการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อได้.

**APPLICATION OF RECOMBINANT OUTER MEMBRANE PROTEIN IN
SERODIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS**

NATTAVUT WONGDEETHAI 4737014 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D. (Microbiology),
POTJANEE SRIMANOTE, Ph.D. (Molecular Microbiology), VAREE
WONGCHOTIGUL, Ph.D. (Microbiology), NITAYA INDRAWATTANA, Ph.D.
(Medical Technology)

ABSTRACT

The rapid diagnosis of leptospirosis is extremely important, and the standard diagnosis of leptospirosis was based on serological testing. Leptospiral recombinant lipoproteins LA0730 and LigA were selected to investigate their serodiagnostic application. Mice were immunized with the recombinant proteins and the specific antibodies obtained were reacted with leptospiral whole-cell antigen. By Western blot technique, mice anti LigA and anti LA0730 reacted with leptospiral cell lysate. By the same technique, rLigA protein reacted with leptospirosis patient sera, while rLA0730 protein did not. Therefore, immunogenic rLigA was used as an ELISA antigen for detecting IgM and IgG in leptospirosis patient sera. Sera of other febrile illnesses and healthy individuals were included as controls. The sensitivity of IgM- and IgG-based ELISA during the acute phase of illness was 70 and 73%, respectively. When the positive results from IgM- and IgG-based ELISA were combined, sensitivity increased to 82%. For convalescent sera, 59 and 68% were positive for IgM- and IgG-based ELISA, respectively; thus, sensitivity also increased (to 77%) using combined ELISA. The specificity of rLigA-based ELISA was 94 and 98% for IgM and IgG ELISA, respectively. Interestingly, when the results from rLigA-based-IgM and IgG-ELISA were combined, 62% of acute phase sera, and 72% of convalescence-phase sera from MAT-negative leptospirosis were diagnosed positive. Therefore, rLigA-based serology has a high potential for the early diagnosis of leptospirosis.

KEY WORDS: *LEPTOSPIRA*/ LEPTOSPIROSIS/ RECOMBINANT PROTEIN/
ELISA/ WESTERN BLOT/ LA0730/ LigA/ IgM/ IgG

139 pp.