



30 JUL 1992

PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI : IMMUNOLOGICAL STUDIES WITH SPECIAL
APPLICATION FOR THE DIAGNOSIS OF MELIOIDOSIS

อภินันท์นาถการ

จาก

หัตถยา วุทธิพงษ์วารากิด

HUTTAYA WUTTIPONGWARAGID

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

Copyright by Mahidol University

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1992

19174

ชื่อวิทยานิพนธ์	<u>Pseudomonas pseudomallei</u> : การศึกษาทางด้าน อิมมูโนวิทยาเพื่อการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคเมลิออยโดสิส
ผู้วิจัย	หัตถยา วุฒินงศ์วรกิจ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	สฤติย์ ลีรสิงห์ D.M.D., Ph.D. สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน ปร.ค. คันสนีย์ ไชยโรจน์ Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	๑ พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๓๕

บทคัดย่อ

เมลิออยโดสิส เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ Pseudomonas (Ps) pseudomallei ผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อาการของโรคมิได้หลายแบบ นับตั้งแต่ไม่มีอาการ จนถึงมีอาการรุนแรงเฉียบพลันที่มีอัตราการตายสูงถึง ๘๐ ถึง ๙๐ เปอร์เซ็นต์ในกรณีที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง ผู้ป่วยอาจแสดงอาการคล้ายคลึงกับโรคอื่นได้ ทำให้แพทย์ไม่สามารถวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น การวินิจฉัยจึงต้องใช้วิธีการทางห้องปฏิบัติการเข้าช่วย ซึ่งสามารถจะทำได้โดยการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย และการตรวจทางอิมมูโนวิทยา ในปัจจุบัน การวินิจฉัยโรคโดยการแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจนั้นเป็นวิธีเดียวที่ให้การวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง แต่เสียเวลาค่อนข้างมาก ดังนั้น จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีการทางอิมมูโนวิทยาเพื่อการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาระดับแอนติบอดี แต่วิธีดังกล่าวมีปัญหาในด้านการแปลผลโดยเฉพาะในเขตท้องที่ที่มีการระบาดของโรค เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่จะมีระดับแอนติบอดีอยู่แล้วในระดับหนึ่ง ดังนั้น จึงได้มีความพยายามตรวจหาแอนติเจนในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยแทนการตรวจหาระดับแอนติบอดี เนื่องจากวิธีการตรวจหาแอนติเจน นอกจากจะเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำแล้ว ยังเป็นการบ่งถึงสภาวะการติดเชื้อของผู้ป่วยอย่างแท้จริง (Active infection) ในระยะ ๒-๓ ปีที่ผ่านมา ได้มีผู้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนแล้ว ๒ กลุ่ม แต่กระทั้งขณะนี้ ยังไม่มีกลุ่มใดรายงานผลการทดสอบจริงกับซีรัมของผู้ป่วย

การศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาด้านอิมมูโนวิทยา เพื่อการพัฒนาวิธีการที่เคยมีผู้รายงานแล้ว เพื่อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และคิดค้นวิธีการใหม่ที่ง่ายสะดวกรวดเร็วกว่า ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ได้จริงกับห้องปฏิบัติการในเขตท้องที่ที่มีการระบาดของ และการศึกษาหาแอนติเจนที่มีความจำเพาะซึ่งสามารถจะนำไปใช้พัฒนาวิธีการวินิจฉัยให้ดีขึ้นในอนาคต ในการตรวจหาแอนติเจนในซีรัมผู้ป่วยนั้น ได้นำซีรัมของกระต่ายและหนูที่ได้ถูกกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ได้จากการสกัดเชื้อ *Ps.pseudomallei* ด้วย Veronal buffer แล้วตกตะกอนด้วย Trichloroacetic acid ซึ่งได้เคยผ่านการทดสอบความสามารถในการเป็น immunogen และความจำเพาะแล้วจากการศึกษาของรัชนี อัจฉริ แอนติบอดีที่เตรียมได้จากกระต่ายและหนูดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ทำ ELISA (B-SA ELISA) และพบว่าวิธีนี้สามารถใช้ตรวจแอนติเจนในสภาพสารละลายได้โดยมีความไวถึง ๒.๕ ng/ml แต่เมื่อนำวิธีดังกล่าวมาตรวจสอบจริงกับซีรัมของผู้ป่วย พบว่าผลที่ได้เป็นลบทั้งสิ้น ทั้งนี้ ผลของการตรวจสอบอาจได้รับการรบกวนจาก Immune complexes ซึ่งอาจมีอยู่ในซีรัมของผู้ป่วยแล้วในขณะเจาะเลือด นอกจากนี้ ยังได้มีการตรวจหาค่าประกอบของแอนติเจนของ *Ps.pseudomallei* ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดีอย่างจำเพาะในคน เพื่อนำความรู้นี้ไปใช้ในการพัฒนาต่อไปในอนาคต การศึกษาดังกล่าว เริ่มจากการนำสารละลายของการแตกตัวของเชื้อ *Ps.pseudomallei* มาทำ Western blotting โดยให้ทำปฏิกิริยากับซีรัมของผู้ป่วย จากผลการทดสอบพบว่าแอนติเจนดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนัก ๑๘.๕ และ ๒๐.๕ KD สำหรับการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยนั้น พบว่าความไวของวิธี Indirect hemagglutination (IHA), IgM ELISA, IgG ELISA และ Latex agglutination (LT) เท่ากับ ๘๖.๓, ๖๔.๕, ๘๓.๕ และ ๘๖.๓ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีความจำเพาะเท่ากับ ๕๑.๒, ๕๒, ๕๔.๔ และ ๘๕.๖ เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ วิธีเหล่านี้มีความสัมพันธ์ทางสถิติของวิธี IHA กับวิธี IgM, IgG และ LT เท่ากับ ๐.๖๒๕๓, ๐.๖๒๖๖ และ ๐.๗๑๓๖ ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบผลทั้งหมด พบว่าวิธี LT ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายกว่าและรวดเร็วกว่า สามารถนำมาใช้แทน IHA ได้ในการวินิจฉัยผู้ป่วยเมลิออยโดสิส นอกจากนี้ยังพบว่า IHA ให้การวินิจฉัยผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน ได้ผลใกล้เคียงกับ IgG ELISA และให้ผลดีกว่า IgM ELISA ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีนักวิจัยหลายท่านได้พัฒนาขึ้นมา ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของผู้อื่น ซึ่งอาจเกิดได้จากเหตุผลหลายอย่าง เป็นต้นว่า ความแตกต่างของกลุ่มซีรัม ระยะเวลาของการเก็บซีรัม หรือเนื่อง

จากความแตกต่างของแอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้คำอธิบายที่เหมาะสมว่าความแตกต่างดังกล่าวเกิดขึ้นได้อย่างไร.



of serum antibody including indirect hemagglutination (IHA), complement fixation (CF), indirect fluorescent (IFA), indirect ELISA and most recently gold blotting. These techniques are of limited value particularly because of the high background antibody titer among healthy individuals in the endemic area of infection. More recently, a detection of Ps.pseudomallei antigens has also been attempted, particularly for the diagnosis of acute septicemic melioidosis. There have been two reports describing techniques for the detection of a small quantity of Ps.pseudomallei antigens in the patient sera. However, neither of these has been tested on clinical specimens. In order to develop simple and rapid serological tests that can overcome the problems previously encountered in the early diagnosis of acute septicemic melioidosis, in the present study, a number of previously described serological tests were refined and new test was developed. The polyclonal antibodies to Ps.pseudomallei antigen (prepared by extracting the bacteria with veronal buffer and followed by precipitation with trichloroacetic acid) was used for detecting the Ps.pseudomallei antigen in patient sera by biotin-streptavidin ELISA (B-SA ELISA). Its minimal sensitivity limit was as low as 2.5 ng/ml. However, this system failed to give a positive reaction with 31 sera from septicemic patients. Therefore, if the antigen was present in any of the specimens, it must be present at a concentration below 2.5 ng/ml. The failure to detect free antigen in the serum may also be due to interference by circulating immune complexes. Determination of the specific immunoreactive component(s) in the whole cell lysate of Ps.pseudomallei was evaluated by Western blotting and IgG immunoenzymatic reaction using patient sera. The components with

immunodiagnostic potential have molecular weight of 18.5 and 20.5 KD. The BP.PP_k and other Ps.pseudomallei antigens (culture filtrates) were also used for the detection of antibodies to Ps. pseudomallei antigens by various serological tests including indirect hemagglutination, IgM ELISA, IgG ELISA and latex agglutination (LT). The sensitivity of IHA, IgM ELISA, IgG ELISA and LT were 86.7, 64.5, 83.9 and 86.7 % respectively. The specificity of these techniques were 91.2, 92, 94.4 and 89.6% respectively. IHA agreed well with every method with correlation coefficients of 0.6293, 0.6266 and 0.7136 respectively. Comparing with the IHA, the LT was more simple to perform and the results could be more readily obtained. Consequently, the LT can be used instead of the more widely used IHA , particularly for epidemiological surveys. In contrast to the results from previous study , the sensitivity of IHA determined in the present study is similar to the IgG ELISA but better than the IgM ELISA for the diagnosis of acute septicemic melioidosis. It is possible that this is related to the fact that at the time of blood collection for serological study, the immune response has already switched from IgM to IgG antibody production or that the current illness may represent a secondary immune response in these patients. It should be kept in mind also the difference in the nature of the antigens used by different groups may contribute to such a discrepancy results.