14 FEB 2003

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF SIMPLE IMMUNOASSAYS FOR HUMAN LEPTOSPIROSIS USING ENDEMIC LEPTOSPIRAL ANTIGENS

SUKANYA DEEPRADIT

With compliments
of
.....บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.....

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

TH
S948d
2002
c.2

ISBN 974-04-2588-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

4237211 PHPH/M : MAJOR: INFECTIOUS DISEASE; M.Sc. (PUBLIC HEALTH)
KEY WORDS : LEPTOSPIROSIS/ MICROSCOPIC AGGLUTINATION TEST/ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/DOT-ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/LEPTOSTRIP

SUKANYA DEEPRADIT: DEVELOPMENT OF SIMPLE IMMUNOASSAYS FOR HUMAN LEPTOSPIROSIS USING ENDEMIC LEPTOSPIRA ANTIGENS. THESIS ADVISORS: UNCHALEE TANSUPHASIRI, M.Sc. (Microbiol.), DUANGPORN PHULSUKSOMBATI, M.Sc. WARALUK TANGKANAKUL, M.P.H. 135 p. ISBN 974-04-2588-7

Two simple enzyme immunoassays, the conventional microtiter plate and the dot-ELISA assays, were developed for the detection of specific IgM antibodies using pool sonicated antigen prepared from three of the most reactive serovars of Leptospira associated with disease in Thailand. Both IgM ELISA assays for serological diagnosis of acute leptospirosis were evaluated and compared with the standard microscopic agglutination test (MAT). The MAT technique was performed with a total of 343 serum samples obtained from patients with leptospirosis and from a control group both of whom lived in both endemic and nonendemic areas. A battery of 16 pathogenic serovars of *L. interrogans* were used as antigens in the MAT assay.

The result of MAT at serum titers ≥ 1:400 showed that three pathogenic serovars of leptospira were among the most commonly reacted to with 96 serum samples of patients with leptospirosis. These serovars were bratislava (71.9%), sejroe (63.5%) and pyrogenes (36.4%); and they were selected for preparation of pool sonicated antigen of both IgM ELISA testings. The optimal condition for both IgM ELISA testings was determined by the checkerboard titrations against known positive and negative standard sera. The microtiter plate of IgM ELISA, performed with sera at 1:80 dilution using the cutoff OD of 0.60 demonstrated sensitivity, specificity, and efficiency of 87.5, 97.6, and 94.8%, respectively. The same values for IgM dot-ELISA performed with sera at 1:160 dilution were 98.9, 93.9, and 95.3%, respectively. Both ELISA methods showed results with statistically significant differences from MAT ($p<0.05$). The agreement rate of IgM dot-ELISA compared with IgM ELISA was 0.93 by Kappa analysis. Both assays offered relatively high negative predictive values (95.3% - 99.6%), thus making the assays ideally suited for rapid screening. For application of the IgM dot-ELISA to rapid screening test, the antigen dotted on NC membrane was prepared as a leptostrip and a stability test was performed after storage at 4°C and -20°C at different times. The results showed a good performance of leptostrip at both storage temperatures for up to one year.

Of both immunoassays, the IgM dot-ELISA showed excellent sensitivity and specificity with significant difference from the conventional microtiter plate ELISA ($p<0.05$). In addition, the IgM dot-ELISA had some advantages over the conventional microtiter plate; it is simple, inexpensive, rapid, and easy to perform with visual reading of the results that do not require special equipment, and performance of the assay in a form of "leptostrip" is suitable for few specimens. Therefore the IgM dot-ELISA may be used at the peripheral level as an alternative method for laboratory screening during the acute phase of human leptospirosis.

©Copyright by Mahidol University

4237211 PHPH /M : สาขาวิชาเอก : โรคติดเชื้อ : วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์)

สุกันยา ดีประดิษฐ์ : การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางอิมมูโนวิทยาอย่างง่ายโดยใช้แอนติเจนจากเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อการระบาด (DEVELOPMENT OF SIMPLE IMMUNOASSAYS FOR HUMAN LEPTOSPIROSIS USING ENDEMIC LEPTOSPIRAL ANTIGENS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อัญชลี ตัณฑ์ศุภศิริ, M.Sc., ดวงพร พูลสุขสมบัติ M.Sc., วราลักษณ์ ตังคณะกุล M.P.H. 135 หน้า. ISBN, 974-04-2588-7

การตรวจวินิจฉัยทางอิมมูโนวิทยาอย่างง่าย 2 วิธี คือ microtiter plate ELISA และ dot-ELISA ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหา IgM แอนติบอดี โดยใช้แอนติเจนจากเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคมากสุด 3 อันดับ การตรวจวินิจฉัยทั้ง 2 วิธีนี้ได้ประเมินผลเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน MAT โดยการตรวจหาปฏิกิริยาการจับกลุ่มด้วยวิธี MAT กับตัวอย่างซีรั่มทั้งหมด 343 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากกลุ่มผู้ที่ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส และกลุ่มผู้ไม่เป็นโรคซึ่งอยู่ทั้งในและนอกพื้นที่ระบาด โดยใช้เชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด 16 สายพันธุ์

ผลการทดสอบที่ไตเตอร์ $\geq$ 1:400 พบว่ามีซีรั่มผู้ป่วย 96 ราย ทำปฏิกิริยาจับกลุ่มต่อเชื้อมากที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ bratislava, sejroe, pyrogenes คิดเป็นร้อยละ 71.9, 63.5, 36.4 ตามลำดับ จึงได้นำเชื้อทั้งสามมาทำเป็น pool sonicated antigen เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี ELISA ทั้งสองวิธี การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยวิธีทั้งสอง ได้ทำ checkerboard titration ต่อซีรั่มบวกและซีรั่มลบมาตรฐาน การทดสอบด้วยวิธี Conventional IgM ELISA เมื่อเจือจางซีรั่มที่ 1:80 แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงโดยใช้ค่าจุดตัดความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เท่ากับ 0.60 ผลการทดสอบให้ค่า ความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ คิดเป็นร้อยละ 87.5, 97.6 และ 94.8 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบด้วยวิธี IgM dot-ELISA เมื่อเจือจางซีรั่มที่ 1:160 ให้ค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ คิดเป็นร้อยละ 98.9, 93.9, และ 95.3 ตามลำดับ วิธี IgM ELISA ทั้งสองวิธี มีความแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน MAT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และความสอดคล้องระหว่างวิธี Conventional IgM ELISA กับ IgM dot-ELISA ที่วิเคราะห์โดยสถิติแคปปา เท่ากับ 0.93 วิธีทั้งสองยังให้ค่าทำนายผลลบที่สูง คือร้อยละ 95.3-99.6 จึงเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรอง ดังนั้นเพื่อพัฒนาวิธี IgM dot-ELISA ให้มีความรวดเร็วในการตรวจคัดกรอง จึงนำแอนติเจนมาเตรียมเป็นแผ่นตรวจวินิจฉัยแบบแท่งจุ่ม (leptostrip) และทดสอบประสิทธิภาพเมื่อแยกเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ –20 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆ กัน ผลการทดสอบพบว่าแผ่นตรวจวินิจฉัยนี้ สามารถให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและยังคงประสิทธิภาพของปฏิกิริยาได้เป็นอย่างดีเมื่อครบเวลา 1 ปี

วิธี IgM dot-ELISA มีความไวและความจำเพาะสูงซึ่งแตกต่างจากวิธี microtiter plate ELISA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และยังมีข้อดีที่เหนือกว่า โดยมีขั้นตอนการตรวจที่ง่าย ราคาถูก รวดเร็ว การแปลผลที่ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และแผ่นแบบแท่งจุ่มยังเหมาะกับการตรวจซีรั่มจำนวนน้อย ดังนั้นวิธี IgM dot-ELISA อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจวินิจฉัยระดับชุมชน เพื่อคัดกรองผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสได้

Copyright by Mahidol University