

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ: ประเด็นข่าวในปี 2562

Laboratory Diagnosis of Leptospirosis: What's news in 2019?

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันติ มณีวัชรรังษี

ภาควิชาชีวโมเลกุลและพันธุศาสตร์โรคเขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail: santi.man@mahidol.ac.th

Citation: Maneewatcharangsri S. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis: What's news in 2019?
[Article] Leptospirosis Club of Thailand Annual Meeting 2019: Leptospirosis and Global Change.
Bureau of Communicable diseases, Department of Disease Control, MOPH. 6th June 2019.

© 2019 Santi Maneewatcharangsri. All Rights Reserved.

กลุ่ม Leptospirosis Epidemiology Reference Group (LERG) ได้กำหนดให้โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นปัญหาที่สำคัญในระดับโลก ในการควบคุมป้องกันโรคในระดับภูมิภาคนั้น นอกจากการสนับสนุนของ องค์การอนามัยโลก (WHO) ร่วมกับระดับภูมิภาค เช่น Reginal Office for South East Asia (SEARO) แก่ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แล้ว ปัจจุบัน องค์กรในระดับนานาชาติ รวมถึงสมาคมและ ชมรมโรคเลปโตสไปโรซิส เช่น Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN), International Leptospirosis Society (ILS), European Leptospirosis Society, Leptospirosis Club of Thailand ต่างให้ความสำคัญต่อการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยและการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย ซึ่งเป็นมาต การหนึ่งของการสำรวจ การป้องกันและควบคุมโรค โดยกำหนดกลยุทธ์ในศาสตร์ “One Health” เช่น การกำหนดเกณฑ์มาตรฐานเพื่อตรวจวินิจฉัย โรคเลปโตสไปโรซิส การกำหนดวิธีตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการในระยะต่างๆของโรค การสนับสนุนให้นักวิจัยผลิตชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปด้วยการสนับสนุนในระดับชาติ (Medical Hub) การรวมกลุ่มประเทศ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพื่อกำหนดทิศทางในการตรวจวินิจฉัยและการร่วมมือในการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูป (Joint policy workshop on diagnostics in Southeast Asia) เป็นต้น

มาตรการหนึ่งที่กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดเป็นแนวทางหรือมาตรการเพื่อป้องกันควบคุมโรค เลปโตสไปโรซิส ได้แก่ รู้เร็ว วินิจฉัยเร็ว รักษาและป้องกันควบคุมโรคถูกต้อง “4E2C” โดย 2E คือ ค้นหาเร็ว ด้วยการเฝ้าระวังและค้นหาปัจจัยเสี่ยงและวินิจฉัยเร็ว (early detection, early diagnosis) นำไปสู่ 2E คือ รักษาเร็วและควบคุมโรคเร็ว มุ่งเน้นเพื่อป้องกันและลด การเสียชีวิตของผู้ป่วย การตรวจหา (detection) ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรค (Diagnostics) ทางคลินิก (Clinical Diagnosis) และทางห้องปฏิบัติการ (Laboratory Diagnosis) และการสำรวจและจำแนกเชื้อและสายพันธุ์จากสัตว์พาหะ และการศึกษาความชุกทางภูมิคุ้มกันในประชากร ที่พื้นที่ระบาดหรือนอกเขตระบาด (Surveillance) โดยมีประเด็นต่างๆที่ควรทราบและน่าสนใจ เช่น

- การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ มีความสำคัญและมีความจำเป็นเพื่อการตรวจวินิจฉัย (diagnosis) และยืนยัน (confirmation) ผู้ป่วย เพื่อตรวจวิเคราะห์การแพร่กระจายของเชื้อในอวัยวะภายใน (organ involvement) และวิเคราะห์ความรุนแรง ในผู้ป่วย (severity) วิธีการตรวจวินิจฉัย เชื้อเลปโตสไปรา (identification) และวิเคราะห์จำแนกสายพันธุ์ (typing) ในสัตว์พาหะและผู้ป่วย วิธีตรวจวิเคราะห์ความชุกของระดับแอนติบอดี และความชุกของสายพันธุ์ในพื้นที่ระบาด มีความสำคัญต่องานระบาดวิทยาเพื่อสำรวจทำนาย และควบคุมโรค

- การพัฒนากระบวนการและวิธีตรวจวินิจฉัยและการใช้กลยุทธ์ที่มีอยู่ร่วมกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น
 - 1 การพัฒนาชุดตรวจไว (Rapid Diagnostic Test; RDT) ให้มีความไวสูงในการคัดกรองแอนติเจน หรือแอนติบอดีใน ผู้ป่วย ระยะ แรกเริ่ม (คลอบคุม bacteremia window) โดยต้องการการทดสอบ ประสิทธิภาพชุดตรวจในพื้นที่ใช้งานจริง
 - 2 การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยแยก (Differential diagnosis) และการพัฒนาการตรวจชนิด Multiplex testing
 - 3 การสร้าง diagnostic algorithm จากจำนวนวันตั้งแต่มีอาการด้วยวิธีการตรวจพื้นฐาน
 - 4 การใช้กลยุทธ์ร่วมกับเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น การใช้ระบบ Biosensor การส่งต่อข้อมูลจากภาคสนาม (online data transfer) โดย QR Barcodes หรือ Chips เชื่อมต่อข้อมูลจากชุดตรวจและ Smart phone เป็นต้น

บทความฉบับนี้ ผู้นิพนธ์ ได้เรียบเรียงข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวินิจฉัยเพื่อวินิจฉัยโรค การวินิจฉัยและจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา โดยนำเสนอเทคนิควิธีและกลยุทธ์ใหม่ในการแก้ปัญหา ผู้นิพนธ์ขอเสนอผลการสำรวจการใช้ชุดตรวจวินิจฉัยในปัจจุบันจากผู้ใช้งาน นำเสนอการดำเนินงานวิจัยเพื่อนำไปใช้ประโยชน์โดย เน้นที่ชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยาที่พัฒนาโดยกลุ่มวิจัยในประเทศไทย และภาพรวมงานวิจัยและพัฒนานวัตกรรมที่น่าสนใจในช่วงศตวรรษที่ 21 โดยมีเนื้อหา ดังนี้

โรคเลปโตสไปโรซิส: ระบาดวิทยาและผลกระทบ

โรคเลปโตสไปโรซิส (ฉี่หนู) เป็นโรคติดเชื้อจากสัตว์สู่คนที่ถูกมองข้าม (neglected zoonosis) พบถึงระบาดในแถบภูมิภาคร้อนและชื้น เช่น เอเชียใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกาตะวันตก อเมริกากลาง อเมริกาใต้ และแอฟริกา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศกำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา พื้นที่ชนบท ชุมชนแออัดในเมือง ในกลุ่มประชากรที่ยากจน อ่อนแอ ด้อยโอกาส และ เสี่ยงต่อการติดเชื้อ (Adler and de la Pena Moctezuma, 2010) มีผลกระทบโดยตรงทางสาธารณสุข พบผู้ป่วยทั่วโลกเฉลี่ย 1.03 ล้านคนและเสียชีวิตโดยเฉลี่ย 58,900 คนต่อปี ส่งผลกระทบด้านเศรษฐกิจโดยคิดเป็นภาวะ การสูญเสียด้านสุขภาพ หรือช่องว่างสุขภาพใน หน่วยปีสุขภาวะที่สูญเสีย (Disability-Adjusted Life Year: DALY) จากประชากรทั่วโลกคิดเป็น 2.90 ล้าน DALYs (Costa et al., 2015; Torgerson et al., 2015)

รายงานการการเฝ้าระวังและการติดตามการระบาดโรคแบบเรียลไทม์ด้วยเทคโนโลยีดิจิทัล HealthMaP Software Tool application ตั้งแต่วันที่ 27 เมษายน ถึง 27 ตุลาคม พ.ศ. 2561 มีสถิติการเกิดโรคและการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 104 ครั้ง กระจายทั่วโลก เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา กลุ่มประเทศอเมริกาใต้ เช่น

ปวยร์โตรีโก โบลิเวีย บราซิล และฝรั่งเศส ออสเตรเลีย เยอรมัน อินเดีย ศรีลังกา จีน ออสเตรเลีย ประเทศไทยและ
ฟิลิปปินส์ เป็นต้น (<http://www.healthmap.org/en/> Accessed 31 January 2019).

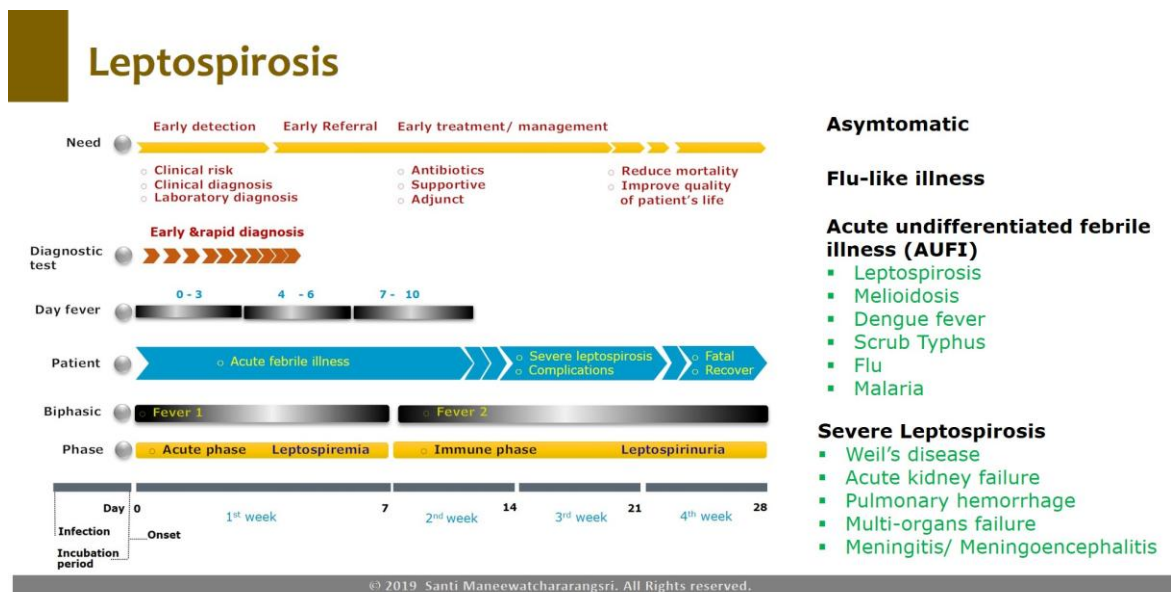
ประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบอุบัติการณ์โรคอย่างต่อเนื่อง
เชื้อโรคนี้อยู่ในสิ่งแวดล้อม ที่มีการเปลี่ยนแปลง และยังไม่สามารถลดอุบัติการณ์โรคเป็นศูนย์ (zero
leptospirosis case and stop outbreak) ได้ จากรายงานการสอบสวนโรค พบสาเหตุ การตายมาจากผู้ป่วยมาพบ
แพทย์ช้า ได้รับ การตรวจวินิจฉัยช้า และผิดพลาดเนื่องจาก ลักษณะอาการของผู้ป่วย ในระยะแรกของการติดเชื้อมี
อาการไม่จำเพาะและคล้ายกับโรคติดเชื้ออื่นๆ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติการระบาดของโรค นี้ในช่วงระยะเวลา 20
ปีที่ผ่านมา อัตราป่วยและอัตราตายมีแนวโน้มลดลงและ เพิ่มขึ้นไม่คงที่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 ที่ผ่านมา ในปี พ.ศ.
2561 (1 มกราคม 2561 -17 ธันวาคม 2561) มีรายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 2,733 ราย คิดเป็นอัตรา
ป่วย 4.18 รายต่อแสนประชากร อัตราตายที่ 0.05 รายต่อแสนประชากร ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีสัญชาติไทย พม่า ลาว และ
กัมพูชา เป็นต้น และพบในอาชีพ เกษตรกร เป็นส่วนใหญ่ ผลกระทบในมนุษย์ เช่น จำนวนผู้ป่วย อัตราการป่วยตาย
ผลกระทบในสัตว์ ได้แก่ สุขภาพสัตว์ ซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื่องในด้านเศรษฐกิจ โรคนี้จัดเป็นโรคสัตว์สู่คนที่มีแบบแผน
ทางระบาดวิทยา (epidemiological pattern) ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อาชีพ สภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ
ภัยพิบัติทางน้ำ กีฬาทางน้ำ และ human-animal-ecosystem เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ: ความสำคัญและประโยชน์

ชุดตรวจสำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย (*In-Vitro* Diagnostics; IVD) ถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันการติด
เชื้อหรือหายจากการติดเชื้อ รวมถึงการติดเชื้อก่อนหน้านี้ เช่นระดับแอนติบอดีที่ยังมีอยู่ คัดกรองการติดเชื้อในผู้ป่วย
ไม่แสดงอาการ เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อประโยชน์โดยตรงต่อผู้ป่วยในการรักษาและการจัดการผู้ป่วยทางคลินิก (treatment
and clinical management) เพื่อให้การรักษาที่จำเพาะต่อโรค ทันท่วงที และป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนของ
โรคและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ ชุดตรวจวินิจฉัย ยังถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการเฝ้าระวัง และการศึกษาทาง
ระบาดวิทยา (surveillance and epidemiological study) และการระบาดของโรค การประเมินภาระโรค
(Burden of Disease) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังใช้เป็นเครื่องมือชี้วัดภาวะโรค ใช้ในการวัดสถานะสุขภาพที่สามารถสื่อได้
ทั้งการตายและความพิการ /ความเจ็บป่วย เรื้อรังที่แสดงด้วยจำนวนปีสมรรถนะที่ปรับด้วยความพิการ (DALYs) การ
ประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมโรค รวมถึงการควบคุมโรค ได้แก่ การตรวจสอบการกำจัดโรค การตรวจหาดัชนีชี้
วัดทางชีวภาพเพื่อวินิจฉัยโรค การดื้อยาปฏิชีวนะ เป็นต้น

ประโยชน์และความสำคัญของการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการมีหลายด้าน การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในระยะแรกเริ่มมีความสำคัญเพื่อ ให้อำนาจการรักษาที่แม่นยำและจำเพาะต่อโรค เนื่องจากการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะให้ผลดีในระยะแรกเริ่มของโรค ที่ผ่านมา การตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาด (misdiagnosis) อาจพบได้บ่อยครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยไข้เฉียบพลันไม่ทราบสาเหตุจาก การติดเชื้อที่เกี่ยวข้อ เช่น ไข้มาลาเรียและไข้เลือดออก เป็นต้น การตรวจวินิจฉัยที่ไม่แม่นยำและช้า นั้น มีผลต่ออาการทางคลินิก ที่รุนแรง (poor clinical outcome) ในทางกลับกัน ผลการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำและไว จะมีประโยชน์ในการรักษา การ ดูแลผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและป้องกันภาวะแทรกซ้อน อีกทั้งการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำ ไว ราคาถูก จะช่วยตอบสนองความต้องการของผู้ใช้งานและสถานพยาบาลในการเพิ่มระบบคัดกรองผู้ป่วยให้สามารถตรวจจับโรคได้ทันเวลา และมีความไวสูง

วิธีการตรวจวินิจฉัยและกลยุทธ์ สำหรับตรวจในระยะเริ่มแรกและการยืนยันโรค เช่น กลยุทธ์ในการตรวจวินิจฉัย ที่เป็นมาตรฐานกลาง เป็นสิ่งที่ บุคลากรที่เกี่ยวข้อง ควรร่วมกันพัฒนาโดยเฉพาะ การสร้าง diagnostic algorithm จากจำนวนวันตั้งแต่มีอาการด้วยวิธีการตรวจพื้นฐาน ได้แก่ เทคนิควิธี conventional ELISA, RDT, PCR และ Real-time PCR, MAT, Culture เพื่อตอบโจทย์การตรวจวินิจฉัยในผู้ป่วย และตอบโจทย์ด้านระบาดวิทยา



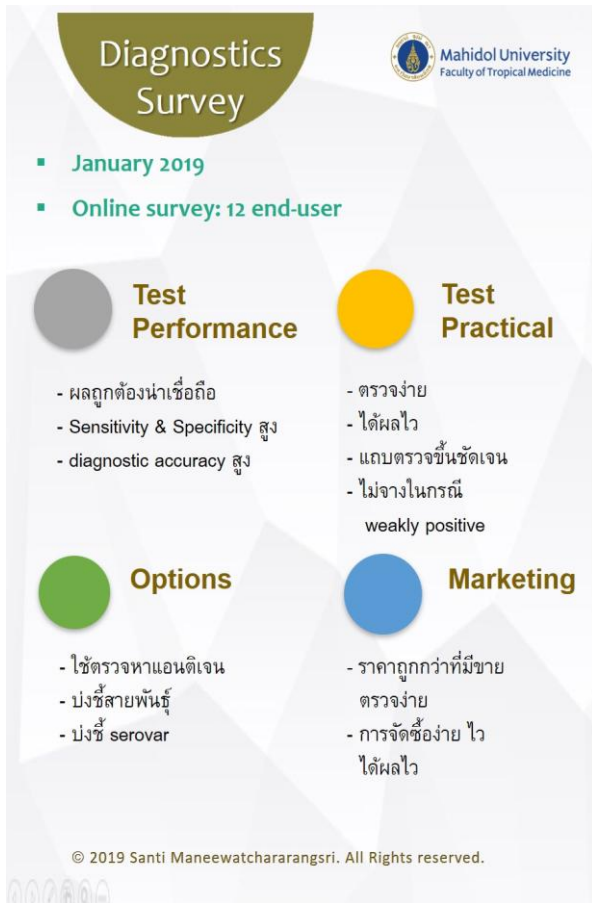
การตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคมาตรฐาน (Gold standard)

องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนดให้การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราและการตรวจหาระดับแอนติบอดีไตเตอร์ด้วยวิธีแมท (microscopic agglutination test; MAT) เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ในระยะมีไข้เฉียบพลันอาจทำการเพาะแยกเชื้อได้จากเลือดหรือปัสสาวะซึ่งเป็นระยะที่พบเชื้อในกระแสโลหิต แต่วิธีนี้มีความไวต่ำ ต้องทำในห้องปฏิบัติการพิเศษและใช้เวลานาน ปัจจุบันมีการพัฒนาสูตรน้ำยาและอาหารเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ การเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง และเพื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ จากหลายกลุ่มวิจัย เช่น การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ LVW agar เพื่อใช้เพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากสิ่งส่งตรวจได้ไว และใช้ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ และใช้เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้องได้ยาวนาน (Wuthiekanun *et al.*, 2012)

การตรวจวินิจฉัยในระยะเริ่มแรกทำได้ยาก เนื่องจาก ปริมาณเชื้อในกระแสโลหิตมีจำนวนน้อย ระดับแอนติบอดีไตเตอร์ต่อเชื้อต่ำ การเพาะแยกเชื้อ (Culture) และการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Susceptibility testing) เป็นไปด้วยความยุ่งยากและช้า และการตรวจวิเคราะห์แอนติเจนมีอุปสรรคจากความผันแปรของแอนติเจน (antigenic variation) การเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัย ทำได้หลายวิธี เช่น การทำให้เชื้อในตัวอย่างเข้มข้นขึ้นด้วยการปั่นเหวี่ยง การประยุกต์ใช้แอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราที่ ได้ตรึงกับอนุภาคแม่เหล็กเคลือบด้วยสารเดกแทรน (anti-LipL32 specific monoclonal antibodies conjugated dextran-coated iron oxide magnetic nanoparticles) (Kityapan *et al.*, 2015) เพื่อรวบรวมเชื้อในสิ่งส่งตรวจ เป็นการเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัย

ประเด็นชุดตรวจวินิจฉัยจากความต้องการของผู้ใช้งาน

สันติ มณีวัชรรังษี (2562) ทำการสำรวจการใช้ชุดตรวจวินิจฉัยสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสและความต้องการจากผู้ใช้งาน (Customers and their perceived needs) จากสถานพยาบาลและหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องในประเทศไทย จำนวน 12 แห่ง โดยสำรวจวิธีตรวจและการใช้งานชุดตรวจวินิจฉัยสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส และสอบถามความคิดเห็นถึงคุณลักษณะและคุณสมบัติของชุดตรวจที่ผู้ใช้งานต้องการ เมื่อเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2562 โดยผลการสำรวจเบื้องต้น มีดังนี้ ผู้ที่ตอบแบบสอบถาม ประกอบด้วย บุคลากรทางการแพทย์จากห้องปฏิบัติการอ้างอิง (8.33%) โรงพยาบาลสังกัดมหาวิทยาลัย (25%) รพศ. รพท. รพช.(41.67%) และไม่ระบุ (25%) การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส สทางห้องปฏิบัติการ ยังคงใช้วิธีมาตรฐาน ได้แก่ เทคนิค MAT test (8.33%) การเพาะแยกเชื้อ (33.33%) วิธีทางโมเลกุล (25%) วิธี conventional IgM/IgG antibody ELISA พบร้อยละ 16.67 จำแนกได้เป็นการใช้ชุดตรวจ IgM- และ IgG antibody ELISA ร้อยละ 16.67 และ 8.33 ตามลำดับ การใช้ชุดตรวจไว (Rapid test) พบร้อยละ 33.33 ของวิธีตรวจวินิจฉัย ซึ่งพบการใช้งานชุดตรวจ IgM Lateral flow ICT เท่านั้น



ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปและการวิจัยพัฒนา เพื่อคุณภาพและความพอใจ

ชุดทดสอบวินิจฉัย IVD ในอุดมคติ ต้องมีความเที่ยงตรงแม่นยำสูง (accurate) ทดสอบได้ง่าย (simple) และไว (rapid) ตรวจได้ในพื้นที่ (point of care) กลุ่มประชากรมีกำลังจ่ายได้ไม่แพง (affordable) และใช้ตรวจวินิจฉัยในระยะแรกเริ่มได้ (early diagnosis) โดยปัจจัยที่มีผลในการพัฒนาชุดตรวจที่เหมาะสมในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ คุณลักษณะของกลุ่มประชากรของแต่ละพื้นที่ เชื้อที่ทำให้เกิดโรค ความชุกของโรค (prevalence) การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อและโฮสต์ รวมถึงวิธีการทดสอบ เช่น ชนิดของชุดทดสอบ การเลือกใช้อันติเจนธรรมชาติ (native) หรือโปรตีนรีคอมบิแนนท์ (recombinant protein) แอนติบอดี การทดสอบด้วยมือหรืออัตโนมัติ รวมถึงทักษะของผู้ทดสอบ

บทความฉบับนี้ ขอยกตัวอย่างพัฒนาการการใช้แอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะในสิ่งส่งตรวจ ชุดตรวจวินิจฉัยสำเร็จรูปด้วยเทคนิคอิมมูโนออสโตรกราฟีสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสในตลาดโลกส่วนใหญ่ใช้แอนติเจนธรรมชาติจากเชื้อเลปโตสไปราทั้งตัว (whole *Leptospira*) หรือโปรตีนเมมเบรนสกัดจากตัวเชื้อเลปโตสไปรา สายพันธุ์เดียวหรือจากสายพันธุ์ไม่ก่อโรคเพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะ ซึ่งมีข้อดีคือความไม่เสถียรและส่วนประกอบที่หลากหลายของแอนติเจนที่ใช้ทำให้หลุมทดสอบแต่ละหลุมขาดความคงที่ (unreliability) นอกจากนี้ การทดสอบด้วยการใช้แอนติเจนธรรมชาติมักให้ความไวที่ร้อยละ 20-65 ในสัปดาห์แรก และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70 ในสัปดาห์ที่สอง การทดสอบที่ตรวจหาไอจีเอ็ม ความไวจะลดลงในสัปดาห์ที่สาม

การพัฒนาเพื่อแก้ข้อดี เริ่มจากการคัดเลือกโปรตีนผิว นอกที่นิยมใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย และเป็นเป้าหมายของการรักษา และโปรตีนอื่นๆ เพื่อนำไป ประเมินความเหมาะสมเป็นแอนติเจนเพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะจากสิ่งส่งตรวจ ใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยต่อไป เช่น การทดสอบสมมุติฐานโปรตีนเด่นและอนุรักษ์ในระดับจีโนมหรือเฉพาะกลุ่มก่อโรค เพื่อคัดเลือกโปรตีนที่จำเพาะต่อโรคเลปโตสไปโรซิส การจำแนกเปปไทด์เด่นของไอจี

เอ็ม แล และไอจี จี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ (ความไว) ของชุดตรวจวินิจฉัย (Pissawong *et al.*, 2018; Maneewatcharangsri *et al.*, 2019)

มีรายงานการวิจัยการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยชนิดอิลูซาด้วยโปรตีนซีครีโตมรวม (whole secretome) ในน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปราโดยนำไปเป็นแอนติเจนของปฏิกิริยาอิลูซา (Maneewatcharangsri *et al.*, 2017) การนำโปรตีนรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เป็นแอนติเจนเด่น (immunodominant IgM/IgG) เป็นโปรตีนอนุรักษิในระดับจีโนมเลปโตสไปราหรือสายพันธุ์ก่อโรค ใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจอิลูซา เช่น LipL32, LipL41, Loa22, LigA และ C-terminal LigA, และ Groel (C-terminally deleted, Groel Δ 525-549) (Srimanote *et al.*, 2008; Chalayon *et al.*, 2011; Maneewatcharangsri *et al.*, 2019)

มีรายงาน การ พัฒนาชุดตรวจ แอนติบอดี ชนิดไว โดยใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่เป็นแอนติเจนเด่น (immunodominant *Leptospira* immunoglobulin-like recombinant proteins) ในรูปแบบ immunochromatographic lateral flow dual path platform (DPP, Chembio Diagnostic Systems, Inc.) เพื่อใช้ตรวจวินิจฉัย severe acute clinical leptospirosis อย่างไรก็ตาม โปรตีนเหล่านี้ยังคงให้ผลปฏิกิริยาข้าม (cross-reactivity) ต่อการติดเชื้อในผู้ป่วยไข้เฉียบพลันไม่ทราบสาเหตุที่ป่วยเป็นโรคไข้รากสาดใหญ่ ไข้เลือดออก ไข้มาลาเรีย ไข้หวัดใหญ่ และไข้เมลิออยด์ เป็นต้น และยังคงต้องปรับมาตรฐานค่าจุดตัดในการแยก ผลบวกและผลลบด้วยตัวอย่างในพื้นที่จริง

สถานการณ์การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย

บทความนี้ ผู้นิพนธ์ขอให้ข้อมูลเบื้องต้นงานวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยสำหรับโรคเลปโตสไปโรสิสเพื่อวินิจฉัยโรค จากกลุ่มนักวิจัยในประเทศไทย และความเป็นได้เมื่อนักวิจัยไทยเป็นผู้ประกอบการ

การสนับสนุนจากภาครัฐในการดำเนินการให้ไทยเป็น ศูนย์กลาง บริการสุขภาพนานาชาติตามแผน พัฒนาประเทศไทยให้เป็นศูนย์กลางสุขภาพนานาชาติ (Medical Hub) ในปี พ.ศ. 2559 – 2568 เพื่อรองรับการรักษาผู้ป่วยในประเทศ ผู้ป่วยต่างชาติ และนักท่องเที่ยว บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการลงทุนอุตสาหกรรมด้านสุขภาพ สะท้อนได้จาก GDP ด้านรายจ่ายสุขภาพของประเทศไทยที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี 2558 อัตราการป่วยและอัตราการตายรวมถึงการสนับสนุนให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางบริการสุขภาพ นานาชาติ (Medical Hub) เพื่อรองรับการรักษาผู้ป่วยในประเทศ ผู้ป่วยต่างชาติ และนักท่องเที่ยว บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ในการลงทุนอุตสาหกรรมด้านสุขภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อผลิตชุดตรวจสำหรับการวินิจฉัยภายนอกร่างกาย (IVD) เพื่อลดการนำเข้าและมีใช้อย่างเพียงพอในอนาคต

ประเทศไทยมีการผลิตและ จำหน่ายชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา สำหรับโรคเลปโตสไปโรสิส โดยกลุ่มนักวิจัยไทยที่พัฒนามาจากงานวิจัยเพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากหน่วยงานราชการและจากสถาบันอุดมศึกษา อาทิ เช่น

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ผลิตและจำหน่ายชุดทดสอบขั้นสูงโรคสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยวิธีภูมิคุ้มกันวิทยา ได้แก่ ชุดตรวจ Leptospirosis IFA ชุดตรวจไวเพื่อตรวจหาแอนติบอดี *Leptospira* IgM และ IgG ชุดตรวจไวด้วยเทคนิค Latex โดยมีความไวร้อยละ 92-100 และค่าความจำเพาะที่ร้อยละ 95-98.7

กลุ่มวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้พัฒนา นวัตกรรมต้นแบบ ชุดตรวจไวด้วยเทคนิค Lateral flow ICT เพื่อตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อสาร LPS ที่สกัดจากเชื้อเลปโตสไปรา 6 ซีโรวาร ได้แก่ Autumnalis, Bratislava, Canicola, Pomona, Sejroe และ Shermani (Lep-kit) และพัฒนายกระดับเทคโนโลยี โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพในภาคสนามแล้ว ได้เป็น ผลิตภัณฑ์ชุดตรวจโรคฉี่หนูแบบทัน การณ์ ซึ่งเป็นชุดตรวจ IgM และชุด IgG lateral-flow immunochromatographic assay (Doungchawee *et al.*, 2017)

กลุ่มวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล มีงานวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์โมโนโคลนาลแอนติบอดีและโพลีโคลนาลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์เพื่อนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจ วินิจฉัย เช่น ชุด ตรวจ ไวด้วยเทคนิค Latex agglutination, recombinant protein-based immunochromatography ชุดตรวจไวด้วยเทคนิค Lateral flow ICT เพื่อตรวจวินิจฉัยแอนติบอดีในผู้ป่วย AUI และใช้เป็น multi-disease diagnosis นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยาด้วยเทคนิค dot blot ELISA เพื่อตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะด้วยโมโนโคลนาลจำเพาะ

กลุ่มวิจัยจากคณะเวชศาสตร์เขตร้อนและหน่วยวิจัย โรคเขตร้อน มหิดล-อ็อกซ์ฟอร์ด และคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มีงานวิจัยพื้นฐานเพื่อค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม และงานวิจัยและพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยแอนติบอดี ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาด้วยแอนติเจนในรูปแบบต่างๆ เช่น การใช้โปรตีน ทั้งตัว (whole cell) การใช้โปรตีนซีรีโตมรวม (whole secretome) การผลิตและใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ที่เป็นแอนติเจนเด่น (immunodominant IgM/IgG) เช่น LipL32, LipL41, Loa22, C-terminal LigA, และ Groel (C-terminally deleted, Groel Δ 525-549) รวมถึงการใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์ท่อนสั้น (recombinant protein truncations) และการใช้โปรตีนรีคอมบิแนนท์หลายชนิด (multiple recombinant proteins antigen) เป็นแอนติเจนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการวินิจฉัย

ปัจจุบัน ต้นแบบนวัตกรรมชุดตรวจ rGroel antigen based IgM ELISA เพื่อใช้ตรวจคัดกรองแอนติบอดีชนิดไอจีเอ็มจำเพาะต่อโปรตีน จีอาร์โออีแอลด้วยเทคนิคอิลูซา ถูกพัฒนาขึ้นเป็นการปรับปรุงชุด ตรวจในเรื่องความคงที่ของแอนติเจน แตกต่างจากชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้โปรตีนธรรมชาติซึ่งมีข้อดีจากความไม่เสถียรของแอนติเจน และความไม่คงที่ของหลุมทดสอบและให้ความไวต่ำในสัปดาห์แรก และอยู่ในขั้นตอนการยกระดับเทคโนโลยีในระดับภาคสนาม และต้นแบบนวัตกรรมจะถูกนำไปใช้ในการพัฒนา rGroel antigen based IgM Lateral Flow ICT สำหรับใช้เป็น Point-of-Care Diagnostics

กลุ่มวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีงานวิจัยพื้นฐานเพื่อค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม และการผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีและโพลีโคลนาลแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ เพื่อนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น Immunochromatography, Lateral Flow ICT, nanoparticle-based Lateral Flow เป็นต้น เพื่อตรวจหาแอนติเจน (antigen detection) ในระยะแรกเริ่ม

กลุ่มวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น มีงานวิจัยพื้นฐานเพื่อค้นหาแอนติเจนที่เหมาะสม และการผลิตโมโนโคลนาลแอนติบอดีและโพลีโคลนาลแอนติบอดีจำเพาะ ต่อเชื้อเลปโตสไปรา การผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์ และการผลิตเครื่องมือสำหรับการพัฒนาการตรวจวินิจฉัย การพัฒนาวัคซีน เป็นต้น

ประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ ลาว พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย สิงคโปร์ เป็นต้น ต่างให้ความสำคัญและร่วมกันกำหนดทิศทางและเทคโนโลยีการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคในอนาคต และมีการรวมกลุ่ม (cross-sectors) จากภาครัฐและเอกชนซึ่งประกอบด้วยภาคีสมาชิกจากนักวิชาการ แพทย์ บริษัท ยาและเวชภัณฑ์ เป็นต้น ซึ่งดำเนินงานโดย Academy of Medical Sciences (AMS) National Academy of Science and Technology, Philippines (NAST PHL) ASEAN Network for Drugs, Diagnostics, Vaccines and Traditional Medicine Innovation (ASEAN-NDI) นอกจากนี้ ยังได้ร่วมกันอภิปรายถึง คุณลักษณะและคุณสมบัติของชุดตรวจวินิจฉัยที่ต้องการเพื่อให้ทันต่อการเปลี่ยนแปลงในศตวรรษที่ 21 ซึ่งการใช้เทคโนโลยีขั้นสูง อาทิ เช่น DNA sequencing และ Next Generation Sequencing รวมถึงการพัฒนานวัตกรรมร่วมสมัยระหว่างชุดตรวจที่ใช้ในปัจจุบันให้ทันสมัยด้วยเทคโนโลยี เป็นประเด็นข่าวที่น่าสนใจและตอบโจทย์ของการตรวจวินิจฉัยเชื้อเลปโตสไปราและโรคเลปโตสไปโรซิส

| กลยุทธ์ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการและคุณลักษณะของชุดตรวจวินิจฉัยที่ต้องการ | | | | |
|--|--|--|---|---|
| ปัญหา | ข้อเสนอแนะ | งานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรม | คุณลักษณะชุดตรวจ | ความต้องการจากผู้ใช้งาน |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ เครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยในเวชปฏิบัติมีไม่เพียงพอ ○ การวินิจฉัยที่ผิดพลาดในกลุ่มผู้ป่วยไข้เฉียบพลันไม่ทราบสาเหตุ ○ เครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยมีข้อจำกัดในการศึกษาระบาดวิทยา (incidence, prevalence) | <ul style="list-style-type: none"> ○ ชุดตรวจสำเร็จรูปควรทำการประเมินในภาคสนามก่อนในพื้นที่ใช้งานก่อนนำไปใช้จริง ○ เลือกใช้การตรวจวินิจฉัยให้เหมาะสม เช่น การตรวจแอนติเจน แอนติบอดี การเพิ่มสารพันธุกรรมหรือเทคโนโลยีสมัยใหม่ | <ul style="list-style-type: none"> ○ การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยในระยะแรกเริ่ม (early diagnosis) ได้แก่ conventional immunoassay และ nucleic acid amplification-based technique ○ การพัฒนาชุดตรวจชนิดไว (Rapid diagnostic tests) เพื่อใช้เป็น early diagnosis และ point-of-care ○ การพัฒนาเทคนิควิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ | <ul style="list-style-type: none"> ○ Test Accuracy ○ Multiplexing ○ Rapid (<30 min) ○ Simple ○ Robust ○ Cost ○ Portable ○ Connectivity | <ul style="list-style-type: none"> ○ ผลการทดสอบถูกต้อง ○ มีค่า diagnostic accuracy สูง ○ ตรวจง่าย ได้ผลไวและชัดเจน ○ ราคา |

วิธีตรวจวินิจฉัยทางโมเลกุล (Molecular Diagnosis) และเทคโนโลยีสมัยใหม่

วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล (โมเลกุล) และเทคโนโลยีสมัยใหม่ เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคด้วยการ ตรวจหาสารพันธุกรรม การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อก่อโรคจากสิ่งส่งตรวจ เช่น เลือด ซีรัม น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ และชิ้นเนื้อ เป็นต้น การเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในระยะเวลาแรกเริ่ม ติดเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ real-time PCR ช่วยตรวจวินิจฉัยในระยะแรกเริ่มในวันที่ 1-4 และใช้ประเมินผลการรักษา เช่น การตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อภายหลังการให้ยาปฏิชีวนะ 24-48 ชั่วโมง การตรวจวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ที่ใช้รักษาในระดับบุคคล [Companion diagnostic (CDx)] การนำเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) มาใช้แทน PCR ในภาคสนาม มีข้อเด่น อาทิเช่น ปฏิบัติง่าย ใช้อุณหภูมิเดียว ใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค PCR เหมาะแก่ห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ภาคสนาม และในประเทศไทยกลุ่ม LIMCs มีรายงานวิจัยการ นำเทคนิค Next generation sequencing (NGS) ใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัย neuroleptospirosis

การศึกษาทางระบาดวิทยา ภาคสนาม เช่น การสำรวจหาความชุก ของระดับภูมิคุ้มกันต่อโรค (seroprevalence) ในกลุ่มประชากรและในปศุสัตว์ในพื้นที่เสี่ยง เช่น ข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุขได้รวบรวมพื้นที่เสี่ยง (อำเภอเสี่ยง) ที่พบอัตราป่วยสูงสุด 12 ลำดับแรกของประเทศ (ปี 2555-2559) ได้แก่ ระนอง (กระบี่) ศรีสะเกษ (อุษาคเนย์ ขุนหาญ ภูสิงห์) พังงา สุรินทร์ (เมืองสุรินทร์ รัตนบุรี ศรีณรงค์ บัวเขต) เลย กาฬสินธุ์ (กมลาไสย) นครศรีธรรมราช (เมืองนครศรีฯ เขียวใหญ่) พัทลุง ยโสธร บุรีรัมย์ (ละหารทราย) มหาสารคาม (วาปีปทุม) และยะลา ต้องการวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ใช้งานได้ไวในภาคสนาม เช่น ชุดตรวจ วาดคัดกรองชนิดไว (RTD) การใช้ RDT และเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น การใช้ระบบ Biosensor การส่งต่อข้อมูลจากภาคสนาม (online data transfer) โดย QR Barcodes หรือ Chips เชื่อมต่อข้อมูลจากชุดตรวจและ Smart phone

มีการนำวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลและ เทคโนโลยีสมัยใหม่ ไปใช้ในการสำรวจสายพันธุ์ในพื้นที่ระบาด และตรวจวิเคราะห์เชื้อเลปโตสไปรา เช่น เทคนิค DNA sequencing โดยใช้ platform เช่น HiSeq2500-Highoutput, MiSeq, PacBioRSII เป็นต้น การวิเคราะห์และจำแนกสายพันธุ์ (typing) จาก sequence เช่น เทคนิค multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) เพื่อจำแนกเชื้อกลุ่มก่อโรคในระดับซีโรวาร์ (Srimanote *et al.*, 2011) เทคนิค multi-locus sequence typing (MLST) เพื่อจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ และใช้ศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างสัตว์ พาหะและโฮสต์ (Thaipadungpanit *et al.*, 2007; Boonsilp *et al.*, 2013)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยการประยุกต์ใช้เทคนิค matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) ร่วมกับระบบ machine learning เพื่อตรวจวิเคราะห์และจำแนกเชื้อเลปโตสไปรา กลุ่มก่อโรคในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ ได้แก่ *L. interrogans*, *L. kirschneri* และ *L. borgpetersenii* โดยนำ whole protein mass spectra จากเชื้อที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ (clinical isolates) และจากปัสสาวะที่มีเชื้อเลปโตสไปรา (10^8 cfu/ml) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล *Leptospira* spp. Mass spectra database ที่สร้างขึ้น (Sonthayanon *et al.*, 2019)

| สรุปการพัฒนาเทคนิค วิธีการตรวจวินิจฉัย และเทคโนโลยีสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิสสำหรับศตวรรษที่ 21 | |
|--|---|
| เทคโนโลยี | การประยุกต์ใช้ |
| <u>การบูรณาการวิธีตรวจวินิจฉัย</u> | |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Gold standard: Culture, MAT ○ conventional ELISA, RDT, PCR และ qPCR | <ul style="list-style-type: none"> ○ Early leptospirosis diagnosis ○ Differential diagnosis in AUFI patients ○ Multi-disease diagnosis ○ Multiplex testing |
| <hr/> | |
| <u>นวัตกรรม RDT เช่น RDT ที่มี disruptive innovation เช่น</u> | |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Biosensors ○ Mobile device & wearables ○ Mobile health platforms ○ Artificial Intelligence (AI) ○ Digital Biomarker ○ Internet of Things (IoT) ○ Other tools, i.e., QR barcodes, Chips, Portable battery-driven | <ul style="list-style-type: none"> ○ Diagnostic device ○ New generation POC; i.e., Smart & Connected POC ○ Field site, LIMCs ○ Early warning system (EWS) ○ Epidemiological study |
| <hr/> | |
| <u>การพัฒนาวิธีการตรวจและการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ</u> | |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Nucleic amplification; i.e., PCR, qPCR ○ DNA sequencing and analysis ○ Next generation sequencing (NGS) ○ Molecular Biology ○ Bioinformatics ○ Mass spectrometry ○ การทำให้ตัวอย่างมีเชื้อเข้มข้น เช่น immunomagnetic separation | <ul style="list-style-type: none"> ○ Molecular Diagnosis ○ Companion diagnostic (CDx) ○ Identification and classification of <i>Leptospira</i> spp. ○ Taxonomy ○ Epidemiological study |

เอกสารอ้างอิง

- Adler B, de la Pena-Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140: 287-296.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG, et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1): e1954..
- Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(5): 289-297.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(9): e0003898.
- Doungchawee G, Sutdan D, Niwatayakul K, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic assay to detect serum anti-leptospiral lipopolysaccharide IgM in acute leptospirosis. *Scientific Reports.* 2017; 2017; 7:2309.
- HealthMap Team: HealthMap Global Health, Local Knowledge. Available from: <http://www.healthmap.org/en/> [Accessed 31 January 2019.]
- Joint policy workshop on diagnostics in Southeast Asia. Academy of Medical Sciences, National Academy of Science and technology, Philippines, and ASEAN Network for Drugs, Diagnostics, Vaccines and Traditional medicine Innovation. October 23-24, 2018, Tagaytay City, Philippines.
- Kityapan M, Thawornkuno C, Maneewatcharangsri S, Boonyuen U, Chaicumpa W. Production of *Leptospira* LipL32 specific-monoclonal antibodies conjugated to dextran-coated iron oxide magnetic nanoparticles. 34th The national graduate research conference 2015 (Proceeding)
- Maneewatcharangsri S, Doungchawee G, Kalambaheti T, Vathanatham P, Soonthornvorasiri N, and Luvira V. Diagnostic evaluation of recombinant GroEL antigen-based IgM antibody ELISA for human leptospirosis serodiagnosis. To be published in *The Journal of Science and Technology.* (in press) 2019.
- Maneewatcharangsri S, Reamtong O, Kalambaheti T, Pumirat P, Vanaporn M, Limmathurosakul D, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for human leptospirosis serodiagnosis using *Leptospira* secretome antigen. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2018; 48(3):576-584.
- Pereira MM, Schneider MC, Munoz-Zanzi C, Costa F, Benschop J, Hartskeerl R et al. A road map for

- leptospirosis research and health policies based on country needs in Latin America. *Rev panam Salud Publica*. 2017;41:e131.
- Pissawong T, Maneewatchararangsri S, Ritthisunthorn N, Soonthornworasiri N, Reamtong O, Adisakwattana P, et al. Immunodominance of LipL3293-272 peptides revealed by leptospirosis sera and therapeutic monoclonal antibodies. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018; 48(3): 576-584.
- Schreier S, Doungchawee G, Chadsuthi S, Triampo D, and Triampo W. Leptospirosis research: fast, easy and reliable enumeration of mobile leptospires. *Biol Res*. 2009; 42(1):5-12.
- Sonthayanon P, Jaresitthikunchai J, Mangmee S, Thiangtrongjit T, Wuthiekanun V, Amornchai P, et al. Whole cell matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification of *Leptospira* spp. in Thailand and Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(4):e0007232.
- Srimanote P, Klaysing B, Tongtawe P, Khantislthiporn O, Pootong A, Tapchaisri P, et al. Molecular typing of *Leptospira* clinical isolates in Thailand using multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Thammasat Int Sc Tech*. 2011;16: 59-67.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1: e56.
- The third Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN) meeting report. WHO, PAHO and the Health and Climate Foundation. 2013.
- Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global burden of leptospirosis: estimated in terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10): e0004122.
- World Health Organization (WHO). Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance, and control. 2003.
- Workshop on Leptospirosis prevention and Control & Global Leptospirosis Environmental Action Network Meeting. 2017.
- Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, et al. Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LWV agar. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012;57: 297-302.