

การศึกษาหาความจำเพาะและปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปรา
เพื่อการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคฉี่หนู (เลปโตสไปโรซิส)

นางยุวพร สากลวาริ

ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์)

สาขาวิชาหลักวิทยาศาสตร์ภูมิคุ้มกันและชีววิทยาระดับโมเลกุล

คณะกรรมการควบคุมสารนิพนธ์: ศ. ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา รศ. ดร. ประมวญ เทพชัยศรี

ดร. พชรินทร์ แสงจารีก ดร. ผ่องศรี ทองทวี

บทคัดย่อ

โรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis) มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียชื่อ *Leptospira* spp. ซึ่งโรคนี้ถูกจัดว่าเป็นโรคที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่ (re-emerging infectious disease) ของประเทศไทยและประเทศอื่นๆที่อยู่ในภูมิภาคร้อนและชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น ชาวนา เจ้าหน้าที่โรงงานฆ่าสัตว์ สัตวแพทย์ หรือผู้ที่มีกิจกรรมที่ทำให้ต้องสัมผัสกับสัตว์พาหะ สัตว์เป็นโรค หรือ ดิน หรือ น้ำ ที่มีเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic *Leptospira* spp.) ปนเปื้อน เมื่อติดเชื้อ ผู้ติดเชื้อส่วนหนึ่งอาจไม่มีอาการป่วยใดๆ หรือมีอาการเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ผู้ติดเชื้ออีกจำนวนหนึ่งมีอาการป่วยที่เฉียบพลัน (acute) และรุนแรง (severe) ซึ่งหากวินิจฉัยผิดพลาด หรือ รักษาไม่ทันท่วงทีและถูกต้องก็จะเสียชีวิตได้ในอัตราตายที่ค่อนข้างสูง การรักษาโรค leptospirosis ในระยะเฉียบพลันมักใช้ยาปฏิชีวนะและรักษาประคับประคองตามอาการ (supportive treatment) ผู้ป่วยบางรายอาจต้องได้รับการรักษาในหน่วยผู้ป่วยวิกฤติเพราะอาจเกิดอวัยวะวาย เช่น ไตวาย ตับวาย เกิดสมองอักเสบ และ/หรือมีเลือดออกจากอวัยวะภายในต่างๆ เช่น ปอด รวมทั้งมีอาการอื่นๆอีกด้วย อย่างไรก็ตามการรักษาดูแลด้วยยาปฏิชีวนะในระยะ acute ที่ผู้ป่วยมีเชื้อ *Leptospira* spp. อยู่ในกระแสโลหิต (leptospiemia) และอวัยวะต่างๆจำนวนมาก อาจมีผลข้างเคียงที่เรียกว่า “ปฏิกิริยาจาริช-เฮิร์ซไฮเมอร์ (Jarisch-Herxheimer reaction; JHR)” ซึ่งเป็นผลจากการที่ยาปฏิชีวนะทำให้เชื้อ *Leptospira* spp. แยกและปล่อยสารพิษต่างๆออกมาในร่างกายของผู้ป่วยพร้อมๆกันในปริมาณมากซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงอยู่แล้วมีอาการป่วยมากขึ้นจนอาจเสียชีวิต ยิ่งกว่านั้นการรักษาดูแลด้วยยาปฏิชีวนะอาจไม่ได้ผลหากการรักษาล่าช้าในระยะที่เลยจากระยะเฉียบพลันไปแล้ว เพราะเชื้อ *Leptospira* spp. ไปหลบอยู่ตามอวัยวะต่างๆที่ยาปฏิชีวนะเข้าไปไม่ถึง เช่น ที่ไต สมอง

ลูกตา เป็นต้น นอกจากนี้ผู้ป่วยส่วนหนึ่งอาจแพ้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะกลุ่มเพนิซิลลินซึ่งเป็น drug of choice และไม่สามารถใช้ยาดังกล่าวรักษาได้ เชื่อกันว่าภูมิคุ้มกันโรค leptospirosis เกิดจาก แอนติบอดีและเป็นภูมิคุ้มกันที่มีความเฉพาะมาก กล่าวคือผู้ติดเชื้อกลุ่มใดหรือซีโรวารใด เมื่อหายป่วยแล้วก็จะมีภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อเชื้อกลุ่มนั้นหรือซีโรวารนั้นและอาจติดเชื้อกลุ่มอื่นหรือซีโรวารอื่นได้ใหม่อีก วัคซีนป้องกันโรค leptospirosis ในปัจจุบันมีเฉพาะสำหรับใช้ในสัตว์ เช่น สุัข วัว-ควาย แต่ป้องกันได้เฉพาะเชื้อที่ตรงหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่ใช้เตรียมวัคซีนเท่านั้น วัคซีนสำหรับป้องกันโรคนี้นั้นสำหรับคนและสัตว์อื่น ๆ ยังไม่มี รวมทั้งวัคซีนที่มีกักกักทำให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ในสัตว์ที่ได้รับการฉีดวัคซีนอีกด้วย ณ ปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษา completely sequenced ของ Genome ของเชื้อ *Leptospira interrogans* ซีโรวาร Lai และ Copenhageni กับ *Leptospira borgpetersenii* ซีโรวาร Hardjo ซึ่งการศึกษาและการนำ whole-genome (*in silico*) มาใช้วิเคราะห์และค้นหาวัคซีนที่จะสามารถป้องกันโรคนี้นั้นที่เกิดจากเชื้อก่อโรคข้ามสายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามการใช้วิธี reverse vaccinology อาจจะสามารถและสามารถทำการศึกษาได้คราวละหลายตัว แทน genes วัคซีน หรือ โปรตีนวัคซีนซึ่งภูมิคุ้มกันที่ได้จากการกระตุ้นด้วยวัคซีนดังกล่าวยังไม่มากพอที่จะยอมรับได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวัคซีนต้นแบบสำหรับป้องกันโรค leptospirosis ที่มีความสามารถในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์ด้วยการศึกษาหาความจำเพาะของเชื้อเลปโตสไปราโดยผู้วิจัยได้ผลิตเซลล์ไฮบริโดมาจากหนูไม่ซี (murine hybridomas) ซึ่งหลังโมโนโคลนาลแอนติบอดี (murine monoclonal antibody) เฉพาะต่อเชื้อ *Leptospira* spp. สายพันธุ์ก่อโรค ด้วยเทคนิคไฮบริโดมา (hybridoma technology)

ส่วนการศึกษาหาปัจจัยก่อความรุนแรงของเชื้อ *Leptospira* ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิค two dimensional electrophoresis (2DE)-based-proteomics และ 2DE-immunomics ร่วมกับ bioinformatics เพื่อศึกษาหาโปรตีนของเชื้อ pathogenic *Leptospira* spp. (proteomes), immunomes, โปรตีนที่มีเฉพาะใน pathogenic *Leptospira* spp. และ *in vivo* expressed *Leptospira* antigens และได้คัดเลือก OmpL1 ที่เป็น immunogenic proteins ของ pathogenic *Leptospira* spp. เพื่อใช้เป็น candidate สำหรับเตรียม prototype leptospirosis vaccine คือ ompL1 โดยได้ amplify ompL1 gene จาก genomic DNA ของ *Leptospira interrogans*, serogroup Icterohaemorrhagiae, serovar Copenhageni จากนั้นได้ใช้ recombinant plasmid ที่ carry *Leptospira* spp. ompL1 genes ในการ immunize หนู hamsters โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อตัวละสามโดส เว้นระยะเวลาห่างแต่ละโดส 14 วัน และใช้ empty plasmid และ phosphate buffered saline (PBS) เป็นวัคซีนหลอก (placebos) จากนั้นได้ challenged หนู hamsters ด้วย *Leptospira interrogans*, serogroup Pomona, serovar Pomona ซึ่ง

เป็น human clinical primary isolate (heterologous challenge) พบว่า 33% ของหนู hamsters ที่ได้รับ leptospirosis DNA vaccine ไม่ตายเมื่อได้รับเชื้อ *Leptospira* spp. จำนวนมากถึง 10 LD50 ส่วนหนู hamsters ที่ได้รับ empty plasmid DNA และ PBS ตายทั้งหมดเมื่อได้รับเชื้อ *Leptospira* spp. ผลจากการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า DNA vaccine ที่สร้างจาก ompL1 genes สามารถป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira* spp. ต่างสายพันธุ์ได้ และมีศักยภาพที่ควรพัฒนาเพื่อนำไปใช้ป้องกันโรค leptospirosis ต่อไป

คำสำคัญ: โรคนี้หนู เลปโตสไปโรซิส วัคซีน ป้องกันโรค โปรตีนโอมิกซ์ อิมมูโนโมดูล
314 หน้า

สำนักหอสมุด