การสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยา และแหล่งรังโรค ในโค กระบือ ในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส ในคนที่ตำบลดูเมือง อำเภอดูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

นางสาวเสาวพักตร์ ฮั้นจ้อย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-17-0809-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE SURVEY OF SEROLOGICAL CONDITIONS AND MAINTENANCE HOST OF LEPTOSPIROSIS IN CATTLE AROUND THE OUTBREAK AREA OF HUMAN LEPTOSPIROSIS AT KUMUANG DISTRICT, BURIRUM PROVINCE

Miss Soawapak Hinjoy

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Veterinary Public Health

Department of Veterinary Public Health

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0809-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยา และแหล่งรังโรคในโค กระบือ ในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส ในคนที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์
โดย	นางสาว เสาวพักตร์ ฮิ้นจ้อย
ภาควิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)

.....กรรมการ
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เบญจมาศ มโหสถนันท์)

.....กรรมการ
(นายสัตวแพทย์ ประวิทย์ ชุมเกษียร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสาวพักตร์ ยิ้นจ้อย : การสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยา และแหล่งรังโรคในโค กระบือ ในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส ในคนที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์. (THE SURVEY OF SEROLOGICAL CONDITIONS AND MAINTENANCE HOST OF LEPTOSPIROSIS IN CATTLE AROUND THE OUTBREAK AREA OF HUMAN LEPTOSPIROSIS AT KUMUANG DISTRICT, BURIRUM PROVINCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.น.สพ. ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน, 74 หน้า. ISBN 974-17-0809-2.

จากการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในกลุ่มชาวบ้านตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ที่ไปลอกหนองน้ำซึ่งมีการเลี้ยงโค กระบือโดยรอบ เมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2542 โดยพบว่ามีเชื้อ*Leptospira borgpetersenii* serogroup Sejroe เป็นสาเหตุสำคัญ จึงสำรวจจำนวนโคและกระบือทุกตัวที่เลี้ยงในบริเวณนั้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยาและความเป็นไปได้ของการแพร่เชื้อเลปโตสไปรามาสู่คน โดยเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในซีรั่มและเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อตรวจหาเชื้อเลปโตสไปรา ผลการศึกษาในโค 20 ตัว กระบือ 36 ตัว จากการตรวจด้วยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) เชื้อที่ตรวจพบมากสุดคือเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar tarassovi (56.25%) รองลงมาคือ sejroe (37.5%) ที่เหลือได้แก่ ballum, *L. interrogans* serovar (pomona, autumnalis strain Akiyami A, copenhageni) และ *L. biflexa* serovar andamana strain CH-11 เมื่อตรวจปัสสาวะด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อตรวจหา 16S (rRNA) gene พบว่าให้ผลบวก 9 ตัวอย่าง (16.1%) และได้ตรวจพบเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar sejroe จากปัสสาวะของโค 1 ตัว และ *L. interrogans* serovar bratislava จากปัสสาวะของกระบือ 1 ตัว ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโค กระบือเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ควรปรับวิธีการควบคุมโรคในปศุสัตว์ให้ครอบคลุมยิ่งขึ้น

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544 .....

417 55722 31 : MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORD : LEPTOSPIROSIS / SEROLOGICAL CONDITIONS / MAINTENANCE HOST / CATTLE

SOAWAPAK HINJOY: THE SURVEY OF SEROLOGICAL CONDITIONS AND MAINTENANCE HOST OF LEPTOSPIROSIS IN CATTLE AROUND THE OUTBREAK AREA OF HUMAN LEPTOSPIROSIS AT KUMUANG DISTRICT, BURIRUM PROVINCE. THESIS ADVISOR:THANIS DAMRONGWATANAPOKIN (D.V.M., Ph.D.) 74 pp. ISBN 974-17-0809-2.

A common source outbreak of human leptospirosis in Buriram province was reported on September 1999. The outbreak associated with the cleaning of an abandoned pond in Kumuang area. The major etiologic agent is *Leptospira borgpetersinii* serogroup Sejroe. A study of this outbreak is aiming at the finding of leptospirosis serological conditions and maintenance host around the outbreak area. The study involves 20 cattles and 36 swamp buffaloes. All cattles and buffaloes serum and urine samples were collected. Microscopic Agglutination Test (MAT) was used on serological conditions survey. Most commonly detected serovars were *L. borgpetersenii* serovar tarassovi (56.25%) and sejroe (37.5%), whereas ballum, *L. interrogans* serovar (pomona, autumnalis strain Akiyami A, copenhageni) and *L. biflexa* serovar andamana strain CH-11 were found at lower frequencies. Some serum samples reacted with 2 or 3 serovars. Urine samples were collected for isolation and antigen detection. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for Leptospira antigen detection. Nine cattle were positive by PCR (16.1%). The isolated leptospira strains from urine were identified as *L. borgpetersenii* serovar sejroe in cattle and *L. interrogans* serovar bratislava in buffalo. According to these results, cattle and buffalo might have been the other important maintenance hosts for human Leptospirosis infection. Therefore, the successful of Leptospirosis prevention program in human is also depending on the sucessful of prevention program in livestock.

Department ..... Veterinary Public Health ..... Student' s signature.....

Field of study..... Veterinary Public Health ..... Advisor' s signature.....

Academic year ..... 2001 .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ น.สพ. ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. น.สพ. ดร. โสมทัต วงศ์สว่าง รศ. สพ.ญ. ดร. ดวงนฤมล ประชัญคดี รศ. ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ สพ.ญ. ดร.เบญจมาศ มโหสถนันท์ ผศ. ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ ผศ. น.สพ. ดร. อลงกร อมรศิลป์ น.สพ.ประวิทย์ ชุมเกษียร น.พ.สุชาติ เจตนเสน และ น.พ.สุริยะ คูหะรัตน์ ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณอุไร โพธา น.สพ. ธราดล เหลืองทองคำ คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล คุณอดิศร สังฆะโต คุณพรทิพย์ เส็งสำเริง คุณวลาศินี รักขาว และน.สพ. วิโรจน์ แซ่โค้ว ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนการทำวิจัยมาตลอด

ขอขอบคุณ ปศุสัตว์จังหวัดบุรีรัมย์ ปศุสัตว์อำเภอคูเมือง น.สพ. วิเชียร สมใจ สพ. เสนีย์ เวทย์วิมล คุณพิมพ์ใจ นัยโกวิท คุณศุภลักษณ์ ยะแสง พ.ญ. วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคุณปวีณา กองนนท์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ นพ.ยงเจือ เหล่าศิริถาวร คุณพรรณราย สมิตสุวรรณ น.สพ. โอฬาร ต้นวีระพงษ์ศิริ น.สพ. กฤษฎศักดิ์ แสงกาศนีย์ น.สพ. ธีรศักดิ์ ชักนำ คุณมยุรี เปาประดิษฐ์ คุณอนงค์ แก้วกำเนิด และคุณสุวรรณา เทพสุนทร ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาตลอด

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบของพระคุณบิดา-มารดา ที่ให้ความสนับสนุนด้านการเงินและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

เสาวพักตร์ ฮิ้นจ้อย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูปภาพ.....ญ

บทที่

1 บทนำ.....1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 ลักษณะทั่วไปของโรคเลปโตสไปโรสิส.....3
2.2 อาการแสดงของโรคเลปโตสไปโรสิสในโค กระบือ.....4
2.3 การติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิส.....6
2.4 พยาธิกำเนิดของโรคเลปโตสไปโรสิส.....7
2.5 แหล่งรังโรคเลปโตสไปโรสิส.....9
2.6 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ.....12
2.7 การศึกษาองค์ความรู้ของโรคเลปโตสไปโรสิสด้านระบาดวิทยา ในต่างประเทศ.....15
2.8 การศึกษาองค์ความรู้ของโรคเลปโตสไปโรสิสด้านระบาดวิทยา ในประเทศไทย.....19
2.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....23
3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา.....24
3.1 สถานที่วิจัยและประชากรศึกษา.....24
3.2 สารเคมี.....25
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....27
3.4 วิธีการศึกษา.....29

สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

3.5 การวิเคราะห์ลักษณะสภาพการติดเชื้อและการเป็นแหล่งรังโรค.....30
ในโคและกระบือ

3.5.1 พารามิเตอร์ที่ใช้วัดลักษณะสภาพการติดเชื้อ และการเป็น.....30
แหล่งรังโรคในโค กระบือ

3.5.2 วิธีการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์.....31

3.5.3 ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล.....35

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์.....43

4 ผลการศึกษา.....44

4.1 ผลการศึกษาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของ.....45
โคและกระบือโดยวิธี MAT

4.2 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของ.....48
โคและกระบือโดยเทคนิค PCR

4.3 ผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ.....50

4.4 ผลการตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราที่.....50
ได้จากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะของโคและกระบือ

5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา.....55

รายการอ้างอิง.....63

ภาคผนวก.....68

ประวัติผู้วิจัย.....74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและตายด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสของอำเภอคูเมือง..... 24
จังหวัดบุรีรัมย์ ปี พ.ศ. 2539 – 2542

2 รายละเอียดแสดงสายพันธุ์เลปโตสไปราที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 32
กระทรวงสาธารณสุขแนะนำให้ใช้ในประเทศไทย

3 สรุปวิธีการทำ Confirmation test ในการทำ MAT.....38

4 Primer sequences ของยีนส์ที่ใช้เทคนิค PCR 39

5 ลักษณะทั่วไปของโคและกระบือในการศึกษา..... 44

6 ผลการตรวจภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราในโค กระบือ ด้วยวิธี MAT.....45

7 จำนวนสัตว์จำแนกตามระดับไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบ โดยวิธี MAT 45

8 จำนวนสัตว์จำแนกตามชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจพบจากการตรวจระดับ.....46
ภูมิคุ้มกัน โดยวิธี MAT

9 การเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ต่อการตรวจพบภูมิคุ้มกันในสัตว์..... 47

10 การเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ต่อการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะ.....49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1 พื้นที่บริเวณหนองน้ำที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส.....25
ในคน ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งมีโคและกระบือาศัยอยู่โดยรอบ
2 การเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราของซีรั่มที่ระดับ.....51
ไตเตอร์ 1:80 โดยวิธี MAT
3 การไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี MAT 51
4 ผลการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ATCC 43642..... 52
ในปัสสาวะ โดยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิสภายใต้แสง Ultra Violet
5 ผลการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะ.....53
โดยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิสภายใต้แสง Ultra Violet
6 การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด.....54
7 เชื้อเลปโตสไปราดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 15,000 เท่า.....54
หลักการของวิธี PCR ขั้นพื้นฐาน.....72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่มีอันตรายสูงโรคหนึ่ง สามารถพบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น[1] ในประเทศไทยจัดว่าโรคนี้เป็นโรคประจำถิ่น การเกิดโรคผันแปรไปตามฤดูกาล พบมากในช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว[2] สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียขนาดเล็กที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Leptospira interrogans (sensu lato)*[3] โรคนี้เป็นโรคที่มีความซับซ้อน เพราะภายหลังที่เชื้อเลปโตสไปราเข้าสู่ร่างกายจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันและสามารถกำจัดเชื้อออกจากอวัยวะต่างๆได้ ยกเว้นที่ไต เชื้อจะอยู่ในบริเวณท่อหน่วยไต (proximal convoluted tubules) และถูกขับออกพร้อมกับปัสสาวะของสัตว์ (leptospiruria) ตลอดเวลาที่มีเชื้อนี้อยู่ สัตว์เหล่านี้จึงเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ (maintenance host) เชื้อที่ถูกขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะจะมีชีวิตอยู่ในน้ำ หรือดินที่เปียกชื้นได้เป็นเวลานานหลายวันจนถึงหลายเดือน ดังนั้นแหล่งน้ำจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปรา นอกจากนี้สภาพแวดล้อมเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เอื้ออำนวยทำให้เกิดการระบาดของโรค โดยเฉพาะภาวะน้ำท่วม หรือภายหลังฝนตกหนัก[3]

มนุษย์จะติดเชื้อเลปโตสไปราจากการสัมผัสโดยตรงกับปัสสาวะของสัตว์ หรือการบริโภคน้ำ อาหาร ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ เชื้อจะไชเข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังตามรอยแผล รอยขีดข่วน ผิวหนังที่เปียกชุ่มซึ่งเกิดจากการที่ไปทำกิจกรรมในน้ำเป็นเวลานาน หรือเข้าทางเยื่อบุของปาก ตา จมูก อาการที่พบในคนมีตั้งแต่ไม่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต[4] ในขณะที่สัตว์ส่วนใหญ่มักจะไม่แสดงอาการของโรคนี้อย่างเด่นชัด บุคคลทั่วไปหรือเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์จึงไม่ตระหนักและเห็นความสำคัญของสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคในโค กระบือ สุกร สุนัข ที่เลี้ยงปล่อยตามธรรมชาติ และสามารถแพร่เชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ เป็นผลให้เกิดการกระจายของโรคอย่างกว้างขวางในฝูงปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และมนุษย์[5]

ถึงแม้ว่า การติดเชื้อเลปโตสไปราในสัตว์จะไม่แสดงอาการเจ็บป่วยให้เห็นอย่างเด่นชัด แต่ความสำคัญอยู่ที่การก่อความสูญเสียทางด้านผลผลิตและรายได้ของเกษตรกรและผู้เลี้ยงสัตว์ กระทรวงเกษตรของประเทศสหรัฐอเมริกาประมาณการความเสียหายจากปัญหาการติดเชื้อ เลปโตสไปราในปศุสัตว์ เป็นมูลค่า 11,228,200 เหรียญสหรัฐต่อปี เกิดจากการที่สัตว์แท้งลูก โดยฝูงสัตว์หนึ่งฝูงมีอัตราการแท้งเกิดขึ้นประมาณ 25-30%[3] นอกจากนั้นยังพบว่ามีรกค้าง ผสมติดยาก ปริมาณการผลิตน้ำนมลดลงซึ่งส่งผลกระทบต่อการซื้อขายน้ำนมดิบ ในฝูงสัตว์ที่มีการระบาดของโรคจะทำให้เกิดการแท้งลูกเป็นจำนวนมาก จำนวนลูกต่อครอกลด อัตราการตายแรกคลอดสูง

หรือลูกสัตว์ที่เกิดใหม่จะมีสภาพอ่อนแอ ถ้าโรคนี้เคยเกิดขึ้นในสัตว์ฝูงใดก็มักจะเกิดการระบาดขึ้นอีกในสัตว์ฝูงนั้นเป็นระลอกภายใน 2 ปี[6]

ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา ประเทศไทยมีการระบาดของโรคนี้มากขึ้นถึงขั้นที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับประเทศ ขณะนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงสาเหตุการระบาดของโรค[2] การควบคุมและการป้องกันโรคให้มีประสิทธิภาพนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยหาข้อเท็จจริงในด้านระบาดวิทยาของโรคให้กระจ่างชัดและลึกซึ้ง โดยครอบคลุมถึงชนิดของเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคทั้งคนและสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาร่วมมือไปพร้อม ๆ กันระหว่างแพทย์และสัตวแพทย์ ทางการแพทย์อาจจะศึกษาอาการแสดงของโรคในคน เชื้อก่อโรค ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคในคน ส่วนในทางสัตวแพทย์ควรจะดำเนินการเก็บวัสดุตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของสัตว์ เพื่อนำซีรั่ม (serum) มาตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคและเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะ พร้อมกับให้การรักษาสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค เพื่อที่จะควบคุมมิให้มีการแพร่กระจายของโรคกว้างขวางขึ้น อันเป็นจุดมุ่งหมายหลักของการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาขยายผลไปสู่พื้นที่อื่นๆ ที่มีปัญหาการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทยได้ และนำไปสู่การลดอุบัติการณ์ของการเกิดโรคในคนด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของโรคเลปโตสไปโรสิส

โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์สู่คน (zoonotic disease) ที่รู้จักกันมากว่า 100 ปี[7] มีการกระจายทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน มีสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงหลายชนิดเป็นแหล่งรังโรค[1] เชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อให้เกิดโรคมี 6 สปีชีส์ ประกอบด้วยเชื้อ *Leptospira interrogans, Leptospira kirschneri, Leptospira noguchii, Leptospira borgpetersenii, Leptospira santarosai* และ *Leptospira weilii* พบว่าเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคเหล่านี้มีมากกว่า 230 ชนิด[3] เชื้อมีรูปร่างเป็นแท่งเกลียวสว่าน วนทางขวาจำนวนมากกว่า 18 เกลียวต่อตัว มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 ไมครอน ยาว 6-12 ไมครอน โดยทั่วไปปลายทั้ง 2 ด้าน หรือด้านใดด้านหนึ่งมีการโค้งงอลักษณะคล้ายตะขอ ย้อมติดสีกรัมลบจาง ๆ เคลื่อนไหวรวดเร็วโดยการหมุนตัว สามารถตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope)[8]

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ ได้แก่ สภาพความเป็นกรด - ด่าง ที่ pH 6.35 - 7.96 อุณหภูมิ 27 - 32 องศาเซลเซียส มีก๊าซออกซิเจนพอเพียง และความชื้นที่พอเหมาะซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการคงอยู่ของเชื้อ โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีร่มเงา เช่น ดู คลอง ลำธาร แอ่งน้ำ ดินโคลน บริเวณน้ำท่วมขัง ซึ่งเป็นน้ำนิ่งหรือไหลช้าๆ เคยมีรายงานว่า เชื้ออยู่บนผิวน้ำได้เป็นเวลานานกว่า 60 วัน เชื้อสามารถอยู่รอดได้นาน 183 วันในดินที่อุ้มน้ำ และเชื้ออยู่ได้นานกว่า 180 วันในดินที่เปียกชุ่มด้วยปัสสาวะ แต่โดยเฉลี่ยแล้วเชื้ออยู่ในดินที่ค่อนข้างชื้นได้นานประมาณ 42 วัน ดังนั้นพื้นที่ที่มีฝนตกชุกและอุณหภูมิร้อนชื้นจึงเหมาะสมต่อการคงอยู่ของเชื้อในสิ่งแวดล้อม เชื้อสามารถอยู่รอดได้เพียง 12 ชั่วโมงในอุจจาระหรือสิ่งปฏิกูลของสัตว์ เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยเชื้อจึงทนอยู่ได้ไม่นานนัก แต่ถ้าอุจจาระหรือปัสสาวะถูกเจือจางด้วยน้ำ เชื้อจะมีชีวิตนานขึ้นประมาณ 7-10 วัน[3] เคยมีรายงานการติดต่อของเชื้อเลปโตสไปราผ่านทางการสืบพันธุ์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากน้ำเชื้อของตัวผู้ และเชื้อเลปโตสไปราสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานประมาณ 1 เดือนในน้ำเชื้อที่ผสมตัวทำละลายแล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ –90 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับในน้ำนมก็ตรวจพบเชื้อได้แต่ไม่มีความสำคัญต่อการแพร่เชื้อมากนัก เพราะเชื้อจะตายภายใน 2-3 ชั่วโมงในน้ำนมที่ไม่ได้รับการเจือจาง[9] การติดต่อทางอ้อมส่วนใหญ่ติดจากสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะสัตว์ที่ติดเชื้อ โดยมีแหล่งน้ำเป็นปัจจัยสำคัญในการแพร่กระจายของเชื้อ[10]

เชื้อเลปโตสไปราไม่ทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ pH ต่ำกว่า 6.5 หรือสูงกว่า 8.4 ซึ่งปัสสาวะของสัตว์ที่มีสภาพเป็นกรดจะทำให้เชื้อที่ถูกขับออกมาตายภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง และเชื้อจะตายได้ง่ายในสภาพที่มีความแห้งแล้ง ความร้อนและแสงแดด พบว่าเชื้อจะอยู่ได้ประมาณ 2.5 ชั่วโมงในดินที่แห้ง นอกจากนั้นแล้วสารเคมีประเภทคลอรีนหรือไอโอดีนที่ความเข้มข้น 0.7 ppm จะสามารถทำลายเชื้อภายในเวลา 10 นาที หรือสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 2.2 % จะทำลายเชื้อภายในเวลา 18-20 ชั่วโมง[3]

2.2 อาการแสดงของโรคเลปโตสไปโรสิสในโค กระบือ

โค กระบือจะตอบสนองต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราโดยแสดงอาการต่าง ๆ ได้ดังนี้

2.2.1 อาการรุนแรงเฉียบพลัน (peracute)

มีไข้สูงอุณหภูมิประมาณ 104 – 107 องศาฟาเรนไฮท์ เกิดภาวะไตวายอย่างเฉียบพลันในลูกโค อัตราตายสูงถึง 80%

2.2.2 อาการกึ่งเฉียบพลัน (acute หรือ subacute)

มีอาการไข้ ซึม ไม่กินอาหาร เลือดคั่งตามเยื่อบุตา ปื้นเลือดออกตามผิวหนัง ปัสสาวะเป็นเลือด ตัวเหลือง ตาเหลือง โลหิตจาง อวัยวะภายในร่างกาย เช่น ม้าม ไต ต่อมน้ำเหลืองมีขนาดใหญ่ พบภาวะไตอักเสบ ปอดบวม ลำไส้อักเสบ เต้านมอักเสบชนิดไม่มีอาการร้อน บวม แดง แต่เต้านมมีลักษณะนิ่มแบนทั้ง 4 เต้า (flabber udder) หยุดการให้นมทันทีประมาณ 7-14 วัน (Milk Drop Mastitis Syndrome) และถ้าไม่ได้รับการรักษาใด ๆ น้ำนมจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นภายใน 14 วัน[11] นอกจากนั้นแล้ว น้ำนมจะมีลักษณะผิดปกติเป็นก้อนเลือด สีเหลืองเข้มหรือสีแดง ส่วนการแท้งลูกมักจะเกิดขึ้นในช่วง 3 เดือนสุดท้ายของการตั้งครรภ์ พบว่าเชื้อ *L. interrogans* serovar pomona เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแท้งลูกภายใน 1-4 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ ขณะที่เชื้อ *L. interrogans* serovar hardjo ทำให้เกิดแท้งลูกภายใน 6-12 สัปดาห์ภายหลังการติดเชื้อ บริเวณเกาะทาสเมเนีย (Tasmania) ซึ่งอยู่ทางตอนใต้ของประเทศออสเตรเลีย มีรายงานว่าฝูงสัตว์หนึ่งฝูงจะมีการแท้งเกิดขึ้นประมาณ 10% ของทุกปี และไม่ทราบถึงสาเหตุสำคัญที่ทำให้สัตว์แท้ง ต่อมาในพ.ศ. 2513 พบว่าเชื้อ pomona และเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar tarassovi คือเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้แม่โคกว่า 200 ตัวเกิดการแท้งลูก มีอัตราการตายแรกคลอดสูง ลูกสัตว์เกิดใหม่มีสภาพอ่อนแอ ลูกสัตว์บางตัวมีอาการทางระบบประสาท เนื่องจากสมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ อัตราตายประมาณ 5 %[12]

2.2.3 อาการเรื้อรัง (chronic)

สัตว์จะมีความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ (reproductive disorder) อัตราการผสมติดต่ำ ความสมบูรณ์พันธุ์ลดน้อยลงเนื่องมาจากขบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ลดลง มีการแท้งลูกเกิดขึ้นเป็นประจำ รกค้าง อัตราการตายแรกคลอดสูง จำนวนลูกต่อครอกลด การให้ผลผลิตน้ำนมลดลงเรื่อย ๆ จนหมดระยะให้นม ส่งผลให้ลูกสัตว์เกิดใหม่ได้รับปริมาณน้ำนมไม่เพียงพอ ร่างกายจึงมีน้ำหนักลดลง อ่อนแอ และไวต่อการติดเชื้อฉวยโอกาส

2.2.4 ไม่แสดงอาการ (subclinical)

พบได้บ่อยที่สุดในโค กระบือ ซึ่งสัตว์มีสภาพปกติไม่แสดงอาการใด ๆ แต่จะมีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ที่ไต และถูกขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะซึ่งเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญสำหรับการแพร่กระจายไปสู่คนและสัตว์อื่น[9] ฝูงสัตว์บางฝูงอาจเคยได้รับเชื้ออยู่ก่อนแล้ว โดยที่สัตว์ในฝูงนั้นไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่ในเวลาต่อมา ถ้าสภาพแวดล้อมเกิดการเปลี่ยนแปลง และส่งผลให้สัตว์เกิดความเครียด ก็จะทำให้สัตว์แสดงอาการป่วยอย่างรุนแรงขึ้นได้ (latent infection)[12]

เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน จึงขอกล่าวโดยย่อถึงลักษณะอาการของการเกิดโรคในคนที่มักพบมีลักษณะประปราย (sporadic cases) โดยมีแหล่งน้ำเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่กระจายโรค ผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงเป็นผู้ที่ทำงานสัมผัสกับน้ำ เช่น เกษตรกร หรือประชาชนที่เดินลุยน้ำ เชื้อเลปโตสไปราสามารถก่อให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ตั้งแต่ไม่มีอาการ หรือมีอาการน้อย โดยจะมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ไม่มีอาการแทรกซ้อนทางตับ ไต และจะหายไปภายใน 1-2 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าจะไม่ได้รับการรักษาก็ตาม แต่บางรายจะมีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต โดยจะมีอาการที่สำคัญคือไข้สูงเฉียบพลัน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง โดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อ่อนเพลีย หนาวสั่น ปวดข้อ บางรายมีผื่นคล้ายหัด ตาเหลือง มีเลือดออก เช่น เลือดกำเดาไหล มีรอยเป็นจ้ำเลือดตามผิวหนัง เลือดออกใต้เยื่อบุตา ปัสสาวะเป็นเลือด ไอมีเลือดปนเสมหะ อาจจะอาเจียนเป็นเลือด หรือถ่ายอุจจาระปนเลือด ปัสสาวะน้อย เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ตับอักเสบ ผู้ป่วยมักเสียชีวิตจากอาการไตวาย[1] แม้ว่าโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคที่มีแนวโน้มจะมีการระบาดของโรคในคนมากขึ้น แต่ในประเทศไทยยังไม่ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับสัตว์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคนเท่าที่ควร โดยเฉพาะโค กระบือที่มักจะไม่แสดงอาการป่วยของโรคเลปโตสไปโรสิสให้เห็น ทำให้สัตวแพทย์หรือเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ขาดความรู้ ความเข้าใจไม่เกิดความตระหนักหรือเห็นความสำคัญเกี่ยวกับโรคนี้ สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค เช่น โค กระบือ สุกร สุนัข ยังคงเลี้ยงดูตามปกติในระบบนิเวศน์ จึงมีการแพร่เชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อมอื่นได้

2.3 การติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิส

การติดเชื้อระหว่างสัตว์ด้วยกัน และระหว่างสัตว์สู่คน สามารถติดต่อได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ได้แก่

2.3.1 การสัมผัสสัตว์ที่ติดเชื้อ เช่น การสัมผัสกับรก ตัวอ่อนที่แท้ง อวัยวะของสัตว์ที่ติดเชื้อ หรือปัสสาวะของสัตว์ที่มีการปนเปื้อนเชื้อ

2.3.2 การหายใจ เกิดจากการที่สัตว์ปล่อยปัสสาวะลงบนพื้นผิวที่แข็ง เช่น พื้นคอนกรีต ทำให้เกิดละอองปัสสาวะฟุ้งกระจายไปในอากาศเป็นระยะทางหลายเมตร ไปยังคอกเลี้ยงสัตว์ใกล้เคียง การติดเชื้อจึงเกิดจากการสูดหายใจเอาละอองปัสสาวะเข้าไป พบได้บ่อยในฟาร์มเลี้ยงโค

2.3.3 การรับประทานเครื่องในหรือเนื้อสัตว์ที่ถูกฆ่าตายในช่วงที่มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในกระแสเลือด (leptospiraemia) และไม่ปรุงให้สุกก่อนรับประทาน อาจพบการติดเชื้อลักษณะนี้ในสัตว์กินเนื้อ เช่น สุนัขป่า เสือ สิงโต การติดเชื้อเลปโตสไปราโดยการกินนั้นอาจเกิดขึ้นได้ในสุกร แต่จะไม่พบในโค หรือกระบือ เนื่องมาจากธรรมชาติในการกินอาหารที่แตกต่างกัน

2.3.4 การติดเชื้อผ่านทางรกแล้วแพร่กระจายเข้าไปสู่ตัวอ่อนในครรภ์ พบได้ใน โค กระบือ สุกร และคน

2.3.5 การสัมผัสน้ำที่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะสัตว์ที่ติดเชื้อ เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายผ่านทางบาดแผลที่ผิวหนัง หรือผิวหนังอ่อนนุ่มเป็นผลจากการแช่น้ำหรือโคลนติดต่อกันเป็นเวลานานๆ และผ่านทางเยื่อบุผนังปาก ตา จมูก โดยส่วนใหญ่เป็นแหล่งน้ำที่ใช้สำหรับอุปโภคหรือบริโภค

2.3.6 การติดเชื้อผ่านทางแมลง เกิดจากการที่แมลงไปตอมปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อหรือบาดแผลของสัตว์มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในกระแสเลือด จากนั้นแมลงได้บินไปตอมตามเยื่อบุตา จมูก หรือบาดแผลที่ผิวหนังของสัตว์อื่น ทำให้สัตว์เกิดการติดเชื้อ นอกจากนั้นเคยมีรายงานการติดเชื้อเลปโตสไปราผ่านทางเห็บที่ประเทศนิวซีแลนด์ ใน พ.ศ. 2515 พบว่า โคติดเชื้อ *L. interrogans* serovar grippotyphosa และสุนัขติดเชื้อ *L. interrogans* serovar canicola จากการดูดเลือดของเห็บชนิด *Dermacentor marginatus* ในโค และเห็บชนิด *Rhipicephalus sanguineu* ในสุนัข

2.3.7 การผสมพันธุ์ ในกรณีที่เป็นการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ การติดเชื้อเกิดจากการสัมผัสกับปัสสาวะที่ปนเปื้อนเชื้อซึ่งยังคั่งค้างอยู่ในระบบสืบพันธุ์ โดยเชื้อจะผ่านเข้ามาทางเยื่อเมือกของระบบสืบพันธุ์ (genital mucosa) ส่วนในกรณีที่เป็นการผสมเทียม สัตว์จะได้รับเชื้อจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่ติดเชื้อ[11]

2.3.8 การติดเชื้อผ่านทางน้ำนม เคยมีรายงานในฟาร์มของประเทศนิวซีแลนด์ที่มีการเลี้ยงทั้งโคและสุกรร่วมกัน พบว่ามีความสัมพันธ์ในการติดเชื้อ pomona ระหว่างโคและสุกร โดยมีสาเหตุจากการนำน้ำนมของโคที่มีเชื้อไปผ่านกรรมวิธีแยกครีม (skim milk) แล้วนำไปเลี้ยงสุกร จึงทำให้สุกรติดเชื้อเลปโตสไปราจากโค [13]

ดังนั้นการติดเชื้อเลปโตสไปราสามารถติดต่อได้หลาย ๆ ทาง เป็นผลให้เกิดการกระจายของโรคอย่างกว้างขวางทั่วไปในฝูงปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และคน สาเหตุส่วนใหญ่ของการติดเชื้อทั้งในสัตว์และในคน เกิดจากการสัมผัสทั้งทางตรงและทางอ้อมกับแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ [11]

2.4 พยาธิกำเนิดของโรคเลปโตสไปโรสิส

หลังจากที่เชื้อเข้าไปทางบาดแผลหรือเยื่อบุผนังแล้ว เชื้อจะเข้าไปในกระแสเลือดจนถึงอวัยวะภายในและพบการแบ่งตัวครั้งแรกในตับ ลำดับต่อมาจะเป็นอวัยวะพวกม้าม ไต ลำไส้ เยื่อหุ้มสมอง ปอด หัวใจ ตา มีระยะฟักตัวของโรคตั้งแต่ 2-30 วัน (โดยเฉลี่ย 10-12 วัน)[14] อาการแสดงแบบเฉียบพลันจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและปริมาณสารพิษของเชื้อเลปโตสไปรา (leptospiral toxin) ทั้งชนิดเอ็นโดท็อกซิน (endotoxin) ที่ผลิตฮีโมลัยซิน (hemolysin) ทำให้เกิดโลหิตจาง และไซโตท็อกซิน (cytotoxin) ทำให้ออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อน้อยลง ซึ่งส่งผลกระทบต่อการเสื่อมสลายของอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะตับ ม้าม สมอง และระบบไหลเวียนโลหิต[15] โดยจะพบปื้นเลือดออกตามเยื่อบุตา เยื่อหุ้มสมอง หรือผิวหนัง รวมทั้งสภาพเต้านมอักเสบแบบที่ไม่พบอาการร้อน บวมแดง สารพิษจะไปทำลายหน่วยไต (glomerulus) และเส้นเลือดฝอยรอบ ๆ หน่วยไต (peritubular capillaries) เกิดสภาพปัสสาวะเป็นเลือด มีการเสื่อมสลายของไต (nephrosis) และภาวะมีสารยูเรียในเลือด (uremia)[6] ในรายที่รุนแรงจนถึงกับเสียชีวิตอย่างรวดเร็ว เป็นผลจากภาวะที่ตับหรือไตล้มเหลวเนื่องจากสารพิษ (toxemia)[16] ถ้าสัตว์กำลังตั้งครรภ์ สารพิษจะทำให้ตัวอ่อนในครรภ์เสียชีวิต ระยะที่พบเชื้อในกระแสเลือดนี้อาจมีอาการไข้สูงหรือไม่แสดงอาการของโรคก็ได้ ขึ้นกับชนิดและปริมาณของเชื้อที่ร่างกายได้รับ ช่วงระยะเวลาที่กล่าวมานี้จะใช้เวลาตั้งแต่ไม่กี่ชั่วโมงจนถึง 7 วัน โดยที่เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนสูงสุดภายใน 2-4 วัน ในระยะนี้จึงสามารถเพาะแยกเชื้อจากเลือด น้ำไขสันหลัง และอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย (interstitial tissue) ได้[3]

เริ่มตรวจพบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิด IgM Antibody ได้ในวันที่ 5-10 หลังจากติดเชื้อ แต่ในบางครั้งอาจจะปรากฏภูมิคุ้มกันล่าช้านานถึง 21 วัน[15] ซึ่งช่วงนี้เชื้อส่วนใหญ่

จะถูกกำจัดออกไปจากกระแสเลือด และอวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกายแล้ว [14] จะตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 – 4 หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง แต่ก็ยังสามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันชนิด IgG Antibody ได้นานเป็นปี[17] ในช่วงที่สัตว์แท้งลูกจะมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นสูงสุด จากการทดลองฉีดเชื้อเลปโตสไปราในสัตว์ทดลองเพื่อตรวจระดับภูมิคุ้มกัน พบว่าร่างกายของสัตว์เริ่มมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในวันที่ 9 หลังจากฉีดเชื้อ โดยมีระดับภูมิคุ้มกันขึ้นสูงสุดในวันที่ 23 และตรวจพบอย่างต่อเนื่องอีก 52 วัน[6] ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อจะมีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดเท่านั้นซึ่งไม่มีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อต่างชนิด[14] แม่โคที่เคยติดเชื้อเลปโตสไปราจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค และถ่ายทอดภูมิคุ้มกันสู่ลูกโคทางน้ำนมเหลือง ซึ่งภูมิคุ้มกันนี้จะมีประสิทธิภาพนานประมาณ 3-4 เดือน สำหรับป้องกันลูกโคต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดนั้น[12] ส่วนการติดเชื้อผ่านทางรกในโคหรือกระบือ พบว่าถ้าตัวอ่อนฝังตัวที่ผนังมดลูกเป็นเวลานานกว่า 132 วันแล้ว ตัวอ่อนจะไม่เสียชีวิต จึงไม่เกิดการแท้ง หรือตายแรกคลอด โดยที่ลูกสัตว์จะสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ และเมื่อลูกสัตว์เกิดมาก็จะมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราทันที (immune tolerance)[9] ดังนั้นในฝูงสัตว์ใดที่เคยเกิดการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสจะมีลูกสัตว์เกิดใหม่ได้รับน้ำนมเหลืองที่มีภูมิคุ้มกันต่อโรค และลูกสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราตั้งแต่กำเนิดอยู่ในฝูง ต่อมาถ้าสัตว์ฝูงนั้นมีการติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดเดียวกับที่เคยติดมาแล้วในอดีต ลูกสัตว์และสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันอยู่แล้วจะไม่แสดงอาการของโรคให้ปรากฏ (self limiting) ถ้าต่อไปมีลูกสัตว์รุ่นใหม่เกิดขึ้นมา ลูกสัตว์รุ่นใหม่นั้นจะไม่เคยได้รับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราเลย จะทำให้ลูกสัตว์รุ่นใหม่นี้ไวต่อการติดเชื้อ แสดงอาการของโรครุนแรงมีอัตราตายสูง และเกิดการระบาดของโรคในที่สุด ดังนั้นจึงมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นระลอกในฝูงสัตว์ทุก 2-3 ปี[6]

ถึงแม้ว่าร่างกายจะมีการสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งช่วยกำจัดเชื้อเลปโตสไปราออกจากอวัยวะอื่น ๆ ได้ แต่ยกเว้นที่บริเวณไต เนื่องมาจากในช่วงเวลาก่อนที่ร่างกายจะเริ่มสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาเชื้อเลปโตสไปราได้เคลื่อนย้ายเข้าไปอยู่ในไตตรงบริเวณตอนต้นของท่อหน่วยไต ซึ่งเป็นบริเวณที่ภูมิคุ้มกันหรือเซลล์เก็บกินไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ เชื้อจะอยู่เป็นกลุ่มก้อน (colonized) โดยเกาะยึดติดกับเซลล์เยื่อบุผนังของไต (epithelial cell) เมื่อตรวจดูทางจุลพยาธิวิทยาอาจพบเซลล์เยื่อบุผนังของไตมีลักษณะที่ราบแบนขึ้น ในกรณีที่กลุ่มก้อนของเชื้อเลปโตสไปรามีขนาดใหญ่มากทำให้เกิดการขัดขวางที่บริเวณท่อหน่วยไต ซึ่งมีความรุนแรงจนทำให้เกิดเนื้อตายที่ท่อหน่วยไต (tubular necrosis)ได้ แต่ในความเป็นจริงนั้นการเกิดพยาธิสภาพในลักษณะที่กล่าวมาพบได้น้อย เพราะเชื้อเลปโตสไปราบางส่วนจะถูกขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะ จึงกล่าวได้ว่า เป็นระยะที่เชื้อเลปโตสไปราเปลี่ยนสภาพจากการเป็นปรสิตภายในร่างกาย กลายเป็นปรสิตที่อยู่ภายนอกร่างกาย

ซึ่งมีความสำคัญในแง่ระบาดวิทยาเป็นอย่างมาก เพราะปัสสาวะที่มีเชื้ออาจปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของโรคเลปโตสไปโรสิสต่อไป

หลังจากที่เชื้อเลปโตสไปราเข้ามาอยู่ในร่างกายได้ประมาณ 9 วัน จะเริ่มตรวจพบเชื้อในปัสสาวะ โดยเชื้อที่ถูกขับออกมามีจำนวนตั้งแต่ 10,000 จนถึง 1,000,000 ตัว ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร[16] บางครั้งเชื้อจะถูกขับออกมาในปัสสาวะได้เป็นเวลานานหลายเดือน ขึ้นอยู่กับการที่สัตว์ได้รับเชื้อเลปโตสไปราชนิดใด

จากการที่เชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนที่อวัยวะภายในร่างกายหลายแห่ง รวมทั้งในไตดังที่กล่าวมาแล้วนั้น พบว่าในระบบสืบพันธุ์ก็มีความสำคัญไม่น้อยไปกว่ากัน เชื้อเลปโตสไปรา เช่น *L. interrogans* serovar (autumnalis, grippotyphosa, icterrohaemorrhagiae และ pomona) จะเข้าไปในรกและตัวอ่อนที่อยู่ในครรภ์ มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในตัวอ่อนเป็นเหตุให้ตัวอ่อนเสียชีวิตแล้วเกิดการแท้งในที่สุด ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบเชื้อจากตัวอ่อนที่เสียชีวิตได้ หรือเกิดจากการที่เชื้อเข้าไปอยู่ในมดลูกแล้วสร้างสารพิษ ก็มีผลต่อการแท้งได้เช่นกัน นอกจากนั้นแล้วเชื้อเลปโตสไปราจะถูกขับออกมาทางระบบสืบพันธุ์ภายหลังจากการแท้งหรือการคลอดลูก[6]

2.5 แหล่งรังโรคเลปโตสไปโรสิส

หลังจากที่สัตว์ติดเชื้อ สัตว์แต่ละตัวอาจจะแสดงอาการของโรคหรือไม่แสดงอาการก็ได้ แต่สัตว์ทุกตัวที่ติดเชื้อมักจะขับเชื้อออกมาทางปัสสาวะ ซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเป็นช่วงระยะเวลาสั้นหรือยาวต่างกันไปตามชนิดของเชื้อที่สัตว์ได้รับเข้าไปในร่างกาย ดังนั้นช่วงระยะเวลาของการขับเชื้อออกมาทางปัสสาวะจะทำให้สัตว์กลายเป็นแหล่งรังโรคที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.5.1 สัตว์สามารถติดเชื้อเลปโตสไปราได้หลายชนิด แต่ในความเป็นจริงแล้วเชื้อเลปโตสไปราแต่ละชนิดจะพัฒนาสภาพการอยู่อาศัยในสัตว์แต่ละประเภทได้แตกต่างกัน ซึ่งการพัฒนาในลักษณะนี้จะมีรูปแบบที่ค่อนข้างจำเพาะระหว่างชนิดของเชื้อเลปโตสไปรากับประเภทของสัตว์ [18] ถ้าในสัตว์ฝูงใดได้รับเชื้อเลปโตสไปราที่มีความจำเพาะต่อกัน ก็จะพบการระบาดของเชื้อชนิดนั้นเกิดขึ้นในฝูงเป็นประจำ (endemic) และคงอยู่ในสัตว์ชนิดนั้นได้เป็นเวลานาน ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคจะอยู่ในระดับต่ำ มีความชุกของการเกิดโรคสูง การขับเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกโดยผ่านทางปัสสาวะหรือทางระบบสืบพันธุ์ จะต่อเนื่องหลายเดือนจนถึงเป็นปี หรือเกือบตลอดช่วงชีวิตของสัตว์ ถือได้ว่าสัตว์ชนิดนั้นเป็นสัตว์แหล่งรังโรค (maintenance host) ซึ่งมีความสำคัญในทางระบาดวิทยาเป็นอย่างมาก สัตว์มีแนวโน้มที่จะแสดงอาการของโรคแบบเรื้อรังมากกว่าแสดงอาการเฉียบพลัน ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมากและยากต่อการวินิจฉัย

เช่น หนูเป็นแหล่งรังโรคสำคัญของเชื้อ icterrohaemorrhagiae และ grippotyphosa ในสุกรคือเชื้อ pomona และ *L. interrogans* serovar bratislava ในโค กระบือ คือเชื้อ *Leptospira borgpetersenii* serogroup Sejroe ในสุนัขคือเชื้อ canicola เป็นต้น[11]

2.5.2 สัตว์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปราบางชนิดโดยบังเอิญ (accidental host) จะขับเชื้อออกมาในช่วงเวลาสั้น ๆ ประมาณ 1-4 สัปดาห์ จึงไม่เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญแต่อย่างใด[19] และไม่มีความสำคัญในทางระบาดวิทยา ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคจะอยู่ในระดับสูง มีความชุกของการเกิดโรคต่ำ แต่จะแสดงอาการของโรครุนแรง มักเกิดการระบาดของโรคแบบประปรายภายในฝูงสัตว์ ตัวอย่างเช่น การเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคนก็ไม่พบหลักฐานใดที่แสดงได้ว่ามนุษย์เป็นแหล่งรังโรค หรือในฝูงโคที่มีการติดเชื้อ icterohaemorrhagiae ก็ไม่มีความสำคัญในแง่ของการเป็นแหล่งรังโรค[11]

ในสัตว์ตัวหนึ่งอาจจะเป็นได้ทั้ง Maintenance host และ Accidental host ขึ้นอยู่กับว่าสัตว์ตัวนั้นติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดใด เนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดจะเลือกพัฒนาสภาพความคงอยู่ในตัวสัตว์ที่ค่อนข้างจำเพาะต่อสัตว์ประเภทใดประเภทหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นถ้าสัตว์ได้รับเชื้อเลปโตสไปราที่มีความจำเพาะต่อสัตว์ตัวนั้นแล้ว ก็จะทำให้ตัวสัตว์นั้นมีเชื้ออยู่ที่ไตได้เป็นเวลานานและสามารถขับเชื้อออกมาทางปัสสาวะได้ตลอดเวลา แต่ในเวลาต่อมาสัตว์ตัวเดียวกันนี้ก็สามารถรับเชื้อเลปโตสไปราชนิดบังเอิญซึ่งไม่มีความจำเพาะต่อตัวสัตว์ก็เป็นได้ ดังเช่น ในกรณีของหนูที่เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อ icterohaemorrhagiae ถ้าในสิ่งแวดล้อมรอบ ๆ บริเวณที่เลี้ยงโคกระบือ มีหนูอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โคและกระบือเหล่านี้ก็สามารถติดเชื้อชนิดนี้ได้ แต่โคกระบือจะขับเชื้อเลปโตสไปราชนิดนี้ออกมากับปัสสาวะในช่วงระยะเวลาสั้นๆ[14] ดังนั้นผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจากซีรั่มของสัตว์ อาจจะพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราหลายชนิด เพราะสัตว์ได้รับเชื้อใดเชื้อหนึ่งมาก่อนแล้วจึงค่อยติดเชื้ออีกชนิดตามมา อาจก่อให้เกิดความสับสนขึ้นได้[20]

นอกจากชนิดของเชื้อที่มีผลต่อการเป็นแหล่งรังโรคในสัตว์แล้ว ยังมีอีกหลายปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ ประเภทของสัตว์ เช่นสัตว์กินเนื้อ (carnivors) ที่มีปัสสาวะค่อนข้างเป็นกรดก็จะเป็นผลให้เชื้อที่ถูกขับออกมาพร้อมกับปัสสาวะนั้นตายในช่วงเวลาสั้น ๆ จึงไม่มีบทบาทสำคัญในการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส แต่ถ้าสัตว์ตัวนั้นขับปัสสาวะลงไปในโคลน ดินที่เปียกชื้นอย่างทันทีทันใด จะทำให้เชื้อเลปโตสไปรามีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนานขึ้น ส่วนในกรณีของสัตว์กินพืช (herbivores) ซึ่งมีปัสสาวะค่อนข้างเป็นกลางจนถึงด่างอ่อน จะทำให้เชื้อเลปโตสไปราที่ถูกขับออกมาพร้อมกันนั้นมีชีวิตอยู่ได้ยาวนานมากกว่าเดิม ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่มีผลต่อการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสในคน คือความเป็นไปได้ในการที่คนจะได้รับ

เชื้อเลปโตสไปราจากสัตว์แบบทางตรงหรือทางอ้อม ถ้าสัตว์มีสภาพความเป็นอยู่อย่างใกล้ชิดกับคน เช่น อาศัยอยู่ในบ้าน คอกเลี้ยงสัตว์ หรือทุ่งนา ก็มีโอกาสที่จะเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของการระบาด ส่วนสัตว์ป่าที่มีความเป็นอยู่ห่างไกลจากมนุษย์ ก็มีโอกาสน้อยมากที่จะเป็นแหล่งสำคัญของการระบาดโรคเลปโตสไปโรสิส [19] โดยส่วนใหญ่แล้วการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนที่มีการระบาดชนิดที่มีแหล่งโรคร่วมกัน (common source) เช่น คนในชุมชนช่วยกันขุดลอก คู คลอง หรือการตั้งค่ายพักแรม มักมีแหล่งติดโรคมาจากแหล่งน้ำขนาดใหญ่ที่มีการเลี้ยงปศุสัตว์ เช่นโค กระบือ สุกร อยู่ในบริเวณใกล้เคียง โดยเป็นบริเวณที่มีการถ่ายเทของเสียที่ไม่ถูกต้องตามหลักสุขาภิบาลการเลี้ยงดูสัตว์ ส่งผลให้ปัสสาวะที่มีเชื้อเลปโตสไปราเกิดการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ[5]

โดยปกติแล้วโอกาสที่คนจะรับเชื้อจากการสัมผัสกับปัสสาวะที่ปนเปื้อนเชื้อโดยตรงเป็นไปได้ยาก ส่วนใหญ่แล้วจะสัมผัสเชื้อทางอ้อม[21] โดยการลงไปสัมผัสกับแหล่งน้ำ ดิน โคลน[19] หรือการทำกิจกรรมของเกษตรกรในพื้นที่นั้นๆ แล้วบังเอิญไปได้รับเชื้อเลปโตสไปรา[6] ประกอบกับลักษณะการเลี้ยงและพฤติกรรมของโค กระบือ ที่มีการใช้แหล่งน้ำธรรมชาติร่วมกันกับคน ดังนั้นโค กระบือ จึงเป็นสัตว์ที่มีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายโรคมาสู่คน เนื่องจากปัสสาวะแต่ละครั้งที่ขับออกมามีปริมาณมาก เป็นผลให้ขับเชื้อออกมาในปริมาณที่มากด้วยเช่นกัน [19]

จากการที่โค กระบือมักจะไม่แสดงอาการของโรคให้ปรากฏ ดังนั้นผลการตรวจทางซีโรโลยีเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอที่จะชี้ชัดได้ว่าสัตว์ตัวนั้นเป็นแหล่งรังโรคหรือไม่ เช่น ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการให้ผลลบ (แสดงว่าไม่มีการติดเชื้อ) แต่ในความเป็นจริงแล้ว สัตว์กำลังอยู่ในภาวะที่มีการปล่อยเชื้อในปัสสาวะ ดังนั้นสิ่งที่จะชี้ชัดได้อย่างแท้จริงคือการที่จะต้องตรวจหาเชื้อในปัสสาวะด้วย โดยการเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะหรือนำตะกอนของปัสสาวะฉีดเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลอง เคยมีรายงานว่า โคสามารถขับเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar hardjobovis ได้เป็นเวลาตั้งแต่ 1 ปีจนถึง 2 ปี และขับเชื้อออกมาครั้งละเป็นจำนวนมาก ประมาณ 1 ล้านตัวต่อน้ำปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร[19] นอกจากนั้นแล้วเชื้อยังถูกขับออกมาจากระบบสืบพันธุ์ภายหลังการแท้งเป็นเวลานานหลายสัปดาห์จนถึงหนึ่งเดือน[13] ที่กล่าวมานั้นจึงเป็นเหตุผลสนับสนุนที่ทำให้โค กระบือเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของทั้งคนและสัตว์ [19]

2.6 การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซีส สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี ดังต่อไปนี้คือ

2.6.1 การตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา

เริ่มตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 5 หลังจากแสดงอาการป่วย และจะพบสูงสุดประมาณสัปดาห์ที่ 4 การที่จะตัดสินว่าค่าไตเตอร์ที่ระดับใด ถึงจะแสดงได้ว่าสัตว์ตัวนั้นให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ ควรจะมีเกณฑ์ตัดสินที่แตกต่างกันไปตามความชุกของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในแต่ละประเทศ ถ้าสัตว์กำลังติดเชื้อหมายถึงการมีระดับภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่าภายหลังการตรวจครั้งแรก โดยมีระยะเวลาห่างกัน 10-14 วัน[6]

โดยปกติแล้วการเพาะแยกเชื้อ (culture isolation) ถือได้ว่าเป็นมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการวินิจฉัยโรคทางจุลชีววิทยา แต่เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปราเป็นเชื้อที่เพาะแยกได้ยากกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ทั้งนี้ต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ ซึ่งมีวิธีการเตรียมที่ยุ่งยาก ราคาแพงและใช้เวลานาน ดังนั้นจึงถือเอาการทดสอบโดยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันในซีรั่ม วิธี MAT สามารถตรวจหาแยกชนิดสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุก่อโรคได้ และเป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส[22]

การตรวจสอบทางซีโรโลยีเป็นการตรวจแบ็องต้นเพื่อให้เห็นภาพโดยรวม (screening test)ว่าในสัตว์ฝูงนั้นมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราเป็นอย่างไร มีเชื้อชนิดใดเป็นสาเหตุหลัก ถ้าพบว่าในฝูงสัตว์น่าจะเกิดปัญหาของโรคเลปโตสไปโรสิส ควรทำการตรวจสอบเป็นประจำในลำดับต่อไปให้พิจารณาการตรวจแยกเชื้อในเลือดและปัสสาวะของสัตว์ที่คาดว่าเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส[6]

2.6.2 การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในเลือด ปัสสาวะ หรือเนื้อเยื่อต่างๆ

การตรวจเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราเป็นวิธียืนยันที่แน่นอนว่าสัตว์มีการติดเชื้อหรือไม่ และนับว่าเป็นวิธีมาตรฐานควรทำควบคู่ไปกับการตรวจวินิจฉัยทางซีโรโลยี สิ่งสำคัญสำหรับการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา ได้แก่ ประการที่หนึ่ง อาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปรา ประการที่สอง การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นนอกจากจะใช้ยา 5 – Fluorouracil แล้วยังต้องอาศัยวิธีการที่ปราศจากเชื้อ (aseptic technique) เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นให้เหลือน้อยที่สุด ดังนั้นจึงต้องเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เร็วที่สุดเท่าที่จะกระทำได้

ปกติแล้วการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในเลือดของสัตว์ที่เพิ่งจะเริ่มแสดงอาการป่วย ค่อนข้างจะทำได้ยาก เพราะจำนวนของเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดยังมีอยู่ในระดับต่ำ (ประมาณ 20,000 เซลล์ต่อปริมาณเลือด 1 มิลลิลิตร) แต่ถ้าปล่อยให้เชื้อแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น คือประมาณวันที่ 3 หลังจากเริ่มแสดงอาการ จำนวนเชื้อในกระแสเลือดจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้น (ประมาณ 200,000 เซลล์ต่อปริมาณเลือด 1 มิลลิลิตร) จะทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อมากขึ้น การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหาเชื้อโดยตรงนั้น จะต้องกระทำภายในระยะเวลา 7 วันหลังเริ่มแสดงอาการ เพราะเป็นช่วงเวลาที่มีเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในกระแสเลือด ซึ่งในระยะนี้อาจตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ในน้ำนม[6] ตัวอ่อนที่แท้งก็สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ แต่ในทางปฏิบัติกระทำได้ยากเพราะตัวอ่อนจะเกิดการเน่าเปื่อย (autolysis) ก่อนที่จะตรวจพบเชื้อ [9]

โดยทั่วไปวิธีการเพาะแยกเชื้อ สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้โดยเฉพาะที่ไต แต่ไม่สามารถทำได้ในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิต ดังนั้นการเก็บปัสสาวะเพื่อเป็นตัวอย่างส่งตรวจจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด ควรเก็บหลังจากสัตว์แสดงอาการของโรคมากว่า 1 สัปดาห์ เพราะสัตว์จะขับเชื้อออกมาทางปัสสาวะภายหลังการติดเชื้อตั้งแต่ 10 วันขึ้นไป และต่อเนื่องไปอีกหลายสัปดาห์จนถึงหลายเดือน แล้วแต่ว่าสัตว์จะติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดใด และควรเก็บจากน้ำปัสสาวะที่ไหลออกมาในช่วงกลาง อาจจะใช้ยาขับปัสสาวะ เช่น Furosemide ช่วยในการเร่งการขับปัสสาวะด้วยก็ได้ แต่ต้องใช้อย่างระมัดระวัง[16] ควรทำให้ปัสสาวะเจือจางก่อนนำไปเพาะเชื้อ เคยมีการศึกษาพบว่าการเจือจางปัสสาวะก่อนเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น พบว่าเชื้อจะมีโอกาสรอดชีวิตมากขึ้น ทำให้ตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้มากกว่าปัสสาวะที่ไม่ได้เจือจาง และยังลดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นด้วย ส่วนการฉีดตะกอนปัสสาวะเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลองประมาณ 1-2 มิลลิลิตร เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อ โดยเฝ้าสังเกตอาการของสัตว์ทดลองตลอด 21 วัน และเก็บเลือดจากหัวใจเมื่อร่างกายของสัตว์ทดลองมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น หรือเก็บเลือดในวันที่ 5 , 8 , 10 และ 14 วัน ภายหลังการฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นนำเลือดที่ได้จากสัตว์ทดลองทำการเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธีทางซีโรโลยี สัตว์ทดลองที่ไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราในเกือบทุกชนิด คือหนูแฮมสเตอร์ (hamster) หรือหนูตะเภา (guinea pig) ที่หย่านมแล้ว ด้วยเหตุผลนี้จึงนิยมใช้สัตว์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ในการแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของสัตว์ที่สงสัยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิส หรือในแหล่งน้ำที่คาดว่าเป็นแหล่งแพร่โรคที่สำคัญ[3] ส่วนการเพาะเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ควรจะกระทำทันทีหลังการเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ถึงจะมีโอกาสเพาะแยกเชื้อได้สำเร็จ[23]

การวินิจฉัยโรคติดเชื้อทั้งหลาย นอกจากแพทย์อาศัยผลการตรวจลักษณะอาการทางคลินิกแล้ว ยังต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติเวชศาสตร์ชันสูตรร่วมพิจารณาด้วย ในการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะ (specific antigens) หรือ haptens ที่เป็นผลิตผลจากยีนของเชื้อโรคนั้น ๆ ต้องมีจำนวนพอเพียงในการสร้างปริมาณสารเป้าหมายที่สามารถตรวจได้ภายใต้ความไวของวิธีการตรวจที่เลือกใช้ และในบางครั้งปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เก็บมีไม่เพียงพอที่จะตรวจพบการติดเชื้อได้ การนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาใช้จะสามารถช่วยแก้ปัญหาและอุปสรรคดังกล่าว เนื่องจากการใช้เทคนิค PCR เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรม ซึ่งอาจจะเป็น ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ(RNA) ของจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นแนวทางใหม่ของการวินิจฉัยโรคติดเชื้อ สามารถใช้ตรวจจุลินทรีย์ก่อโรคทุกชนิดที่เคยมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีโนมไว้แล้ว ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ใช้เป็นประโยชน์สำหรับการออกแบบ primers ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อโรคที่สนใจ ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีโนมเหล่านี้ สามารถค้นหาได้จากเอกสารตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารต่าง ๆ หรือจาก Nucleotide database ซึ่งเป็นฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ที่เก็บรวบรวมทุกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีผู้รายงานไว้เช่น GenBank (National Center for Biotechnology Information, USA) , EMBL (European Molecular Biology Laboratory) และ DDBJ (DNA Database of Japan) จะต้องทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในกรณีเชื้อโรคที่สนใจมีหลายพันธุ์ (strains) โดยอาศัยคอมพิวเตอร์เป็นเครื่องช่วย จากการเปรียบเทียบนี้จะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไม่มีความแตกต่างหรือแตกต่างกันน้อย (conserved regions) และบริเวณที่มีความแตกต่างกันมาก (variable regions) ในระหว่างสายพันธุ์ การเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่เป็น conserved regions เพื่อออกแบบ primers จะใช้ได้ในการทำ PCR กับเชื้อก่อโรคที่สนใจได้ทั้งกลุ่มสายพันธุ์ของเชื้อนั้นที่มี variable regions แต่ถ้าต้องการบ่งชี้จำเพาะหรือแยกชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค ควรเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเป็นเอกลักษณ์ (unique sequence) ของแต่ละสายพันธุ์ และทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมแบบ exponential ซึ่งใช้เวลาสั้นมาก สามารถทดแทนวิธีการเพาะเลี้ยงซึ่งต้องใช้เวลาหลายวันหรือหลายสัปดาห์ สิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยใช้ในปริมาณน้อยกว่าวิธีการอื่น ๆ มากและที่สำคัญ คือเทคนิค PCR ช่วยทำให้สารพันธุกรรมที่เป็นเป้าหมายในการตรวจมีปริมาณหรือจำนวนโมเลกุลเพิ่มขึ้นก่อนที่จะทำการตรวจ ในขณะที่วิธีการอื่น ๆ โดยทั่วไปจะตรวจสารเป้าหมายเท่าที่มีอยู่ตามปกติในธรรมชาติ โดยมิได้มีการทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุที่วิธีมาตรฐานในการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสทางห้องปฏิบัติการโดยการเพาะแยกเชื้อใช้เวลานานหลายสัปดาห์ และวิธีทดสอบอื่น ๆ ที่มีข้อจำกัดทั้งในเรื่องของความไวและความจำเพาะ ทำให้มีคณะผู้วิจัยหลายกลุ่มทั่วโลกที่เห็นปัญหานี้ พยายามคิดค้นและพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

ทางห้องปฏิบัติการให้ดีขึ้น วิธีหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษาทดลองมากในช่วง 8 ปีที่ผ่านมา คือเทคนิค PCR[24]

ในปัจจุบันนี้โรคเลปโตสไปโรสิสจัดได้ว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศ ดังนั้นในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาทั้งทางระบาดวิทยา และการพัฒนาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งก่อประโยชน์ทำให้เกิดองค์ความรู้ที่สำคัญหลายประการของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส

2.7 การศึกษาองค์ความรู้ของโรคเลปโตสไปโรสิสด้านระบาดวิทยาในต่างประเทศ

ในหลายๆประเทศทั่วโลกได้จัดโรคเลปโตสไปโรสิสให้อยู่ในประเภทโรคติดเชื้อที่กลับมาเป็นปัญหาใหม่ (re-emerging infectious disease) แต่ละประเทศจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาคำตอบถึงสภาพปัญหาของโรคเลปโตสไปโรสิสที่เกิดขึ้น การศึกษาของประเทศต่างๆเหล่านี้ สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้ศึกษา และเพิ่มองค์ความรู้ในประเทศไทยได้อย่างคร่าว ๆ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

พ.ศ. 2497 ที่ประเทศบัลแกเรีย เกิดการระบาดครั้งใหญ่ของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนภายหลังน้ำท่วมใหญ่ โดยมีสาเหตุสำคัญที่เกิดจากเชื้อ pomona พบว่าบริเวณที่เกิดน้ำท่วมนั้นมีการเลี้ยงสุกรเป็นจำนวนมาก จึงได้ทำการเพาะแยกเชื้อจากไตของสุกรที่อยู่ในบริเวณนั้นพบว่าสามารถแยกพบเชื้อ canicola, pomona, *L.borgpetersenii* serovar sejroe และ *L.borgpetersenii* serovar ballum ซึ่งสรุปได้ว่า สุกรเป็นแหล่งรังโรคของการระบาด[19]

ประเทศนิวซีแลนด์ได้ทำการศึกษาด้วยวิธีทางซีโรโลยีของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคนที่มีอาชีพตัดแต่งเนื้อสัตว์กว่า 1,000 คน พบว่าคนงานส่วนใหญ่มีผลบวกต่อเชื้อ pomona และมีอยู่ประมาณ 10.2% ที่ตอบสนองต่อระดับไตเตอร์ที่ 1: 24 แสดงว่าคนเหล่านั้นเคยมีการติดเชื้อเลปโตสไปรา จากการซักประวัติย้อนหลังถึง 10 ปี มีคนที่เคยไปรับการรักษาด้วยอาการที่เข้าได้กับนิยามของโรคเลปโตสไปโรสิสจำนวน 42 คน[25]

สภาพการติดเชื้อเลปโตสไปรา ใน โค กระบือของประเทศอเมริกา ออสเตรเลีย อิสราเอล แอฟริกาเหนือ และรัสเซีย เชื้อที่พบส่วนใหญ่ในอเมริกาและออสเตรเลีย คือเชื้อ pomona ประเทศอิสราเอลและแอฟริกาเหนือคือเชื้อ grippotyphosa นอกจากนั้นแล้วอิสราเอลยังพบเชื้อชนิดนี้ในกระบือ ส่วนการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคนส่วนใหญ่ของประเทศอิสราเอลและรัสเซียคือเชื้อ grippotyphosa เป็นสาเหตุหลัก และเป็นการติดเชื้อจากการสัมผัสโดยตรง พบมากใน

ชาวนา สัตวแพทย์ และคนงานในโรงฆ่าสัตว์ แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในอเมริกานั้นมักพบว่ามีความสัมพันธ์กับการสัมผัสทางอ้อมกับแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ[26]

สถานการณ์ของโรคเลปโตสไปโรสิสในออสเตรเลีย ตั้งแต่ พ.ศ. 2507 ในฝูงสัตว์ส่วนใหญ่มีการระบาดของเชื้อ pomona เพราะจากตัวอย่างที่ส่งตรวจจำนวน 7304 ตัวอย่าง มีให้ผลบวกต่อเชื้อ pomona (12.4%), grippotyphosa (1.6%) และ *L. interrogans* serovar hebdomadis (0.5%) นอกจากนั้นแล้ว ลูกวัวในฝูงที่มีการติดเชื้อพบอาการปัสสาวะมีเลือดปน ตัวเหลือง ตาเหลือง มีอุบัติการณ์ของโรคสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

พ.ศ. 2508 พบว่าจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ติดเชื้อเลปโตสไปราของประเทศออสเตรเลียเป็นโค 13% โดยให้ผลบวกต่อเชื้อ pomona ประมาณ 36% โดยเฉพาะที่รัฐควีนส์แลนด์พบเชื้อ hardjo แพร่ระบาดในฝูงปศุสัตว์ทั่วทั้งรัฐ โดยส่วนใหญ่พบโคติดเชื้อเลปโตสไปราแบบไม่แสดงอาการ

พ.ศ. 2512 พบว่าเชื้อ hardjo เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดเต้านมอักเสบ และการแท้งในโคที่รัฐควีนส์แลนด์ ในขณะเดียวกันก็เกิดระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสในฝูงโคเนื้อและโคนมที่รัฐนิวเซาท์เวลส์ และมีคนงานรีดนมจำนวน 4 คน เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลด้วยอาการที่วินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส จึงได้ทำการเก็บปัสสาวะจากสัตว์ในฟาร์ม พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ hardjo

พ.ศ. 2514 มีการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคนเป็นจำนวนมากในเกาะทาสเมเนียซึ่งเรียกกันว่า influenza like syndrome โดยมีความสัมพันธ์กับรายงานในขณะนั้นที่พบเชื้อ hardjo มีการแพร่กระจายทั่วรัฐทั้งในโคเนื้อและโคนม ซึ่งมีโคนมจำนวนมากที่ไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใด นอกจากพบลักษณะเต้านมอ่อนนุ่ม และให้ผลผลิตน้ำนมลดลง ประกอบกับมีการแท้งและการตายแรกคลอดเป็นบางส่วน ต่อมาจึงตรวจพบเชื้อ hardjo ในตัวอ่อน และปัสสาวะของโคที่แท้ง ลูกชายของคนงานที่พักอาศัยอยู่ในฟาร์มมีอาการคล้ายไข้หวัด ปวดศีรษะรุนแรง ปวดเจ็บกล้ามเนื้อ ต่อมามีการส่งเลือดตรวจพบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อเลปโตสไปราที่ระดับไตเตอร์ 1: 3000

พ.ศ. 2516 มีการจัดให้ การติดเชื้อ hardjo และเชื้อ pomona เป็นโรคประจำถิ่น ในเกาะรัฐทาสเมเนีย และที่ Illawarra Moss Vale ทางฝั่งใต้ของรัฐนิวเซาท์เวลส์ ประมาณ 10-20% ของฝูงโคนมทั้งหมด พบโคมีอาการไข้ ซึม เบื่ออาหาร แท้งลูก ผลผลิตน้ำนมลดลง น้ำนมมีก้อนสีเหลือง จึงทำการทดสอบโรคเต้านมอักเสบด้วยวิธี Rapid mastitis test ให้ผลบวก เกิดการระบาดของโรคเป็นเวลากว่า 14 วัน หลังจากนั้นได้ทำการรักษาโดยให้ ยาสเตรปโตมัยซิน สามารถช่วยลดน้ำนมที่มีลักษณะผิดปกติและลดการแท้งลูกได้ ต่อมาได้จึงควบคุมโรคโดยใช้วัคซีนที่มีเชื้อเลปโตสไปรา 2 ชนิด (bivalent) คือเชื้อ hardjo และเชื้อ pomona ซึ่งควบคุมโรคได้เป็นผลสำเร็จ

พ.ศ. 2520 มีการระบาดครั้งรุนแรงในฟาร์มโคเนื้อสาเหตุสำคัญเกิดจากเชื้อ hardjo และเชื้อ pomona ที่ทำให้แม่โค 30 ตัว มีอาการแท้ง นอกจากนั้นแล้วแม่โคอีกประมาณ 500 ตัวอยู่ในช่วงไม่ให้นมหลังจากการแท้งลูก ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก การระบาดในครั้งนี้มีความสัมพันธ์กับการที่โคกินฟางข้าวซึ่งปนเปื้อนด้วยปัสสาวะของหนูที่ติดเชื้อ

พ.ศ. 2530 – 2531 จัดลำดับให้โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคสัตว์ติดคนที่สำคัญที่สุดในกลุ่มคนที่ประกอบอาชีพอยู่ในฟาร์มโคนม จากการสำรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราของคนงานในฟาร์มโคนมพบว่ามี 86 % ให้ผลบวกทางซีโรโลยีต่อเชื้อ hardjo และเชื้อ pomona มีการประมาณว่า คนที่ประกอบอาชีพในฟาร์มโคนมจำนวน 1 คนใน 10 คน จะได้รับเชื้อ hardjo ซึ่งอาจติดเชื้อขณะรีดนม ช่วยทำคลอดแม่โคที่ติดเชื้อ จับรก หรือตัวอ่อนที่แท้งโดยขาดความระมัดระวัง

ส่วนในประเทศนิวซีแลนด์เริ่มมีอุบัติการณ์ของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนเพิ่มสูงขึ้นมาตั้งแต่ พ.ศ. 2493 โดยเฉพาะในกลุ่มประกอบอาชีพอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม ซึ่งเชื้อ hardjo และเชื้อ pomona เป็นสาเหตุสำคัญ เมื่อดูการแพร่กระจายของโรคตามสภาพภูมิศาสตร์ ชี้ให้เห็นว่าโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศนิวซีแลนด์ยังเป็นปัญหาสำคัญ[11] วิธีการเก็บอาหารเลี้ยงสัตว์ เช่น ข้าวโพด ฟางข้าว ดำเนินการอย่างไม่มิดชิด บางครั้งก็เปิดโอกาสให้สัตว์ได้รับเชื้อเลปโตสไปราจากหนู เพราะอาหารเลี้ยงสัตว์เหล่านี้มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของประชากรหนูอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้สิ่งแวดล้อมมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อเลปโตสไปราที่ถูกขับออกมาจากปัสสาวะหนูมากยิ่งขึ้น ดังเช่นในประเทศนิวซีแลนด์พบว่าจากเหตุผลข้างต้นทำให้สัตว์เลี้ยงมีการติดเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar copenhageni จากหนูไม่ทางตรงก็ทางอ้อม มีคนป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสมากกว่า 800 คนภายในช่วงเวลา 1 ปี ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มคนที่ทำงานในฟาร์มปศุสัตว์ [6] และเคยมีรายงานว่าคนงาน 9 คนมีอาการป่วยคล้ายไข้หวัด โดยทุกคนอาศัยอยู่ในฟาร์มโคนมซึ่งมีโคนมที่เลี้ยงในฟาร์มยังไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส ปรากฏว่ากลุ่มคนงานมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราเมื่อตรวจด้วยวิธี MAT ต่อมาได้สุ่มโคในฟาร์มจำนวน 19 ตัว เพื่อตรวจสอบทางซีโรโลยี พบว่าให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ hardjo จำนวน 79%[18] ดังนั้นจึงเป็นจุดเริ่มต้นในการใช้วัคซีนป้องกันโรคในฟาร์มปศุสัตว์ทั่วไป[6]

มีรายงานการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสครั้งแรกในกระบือประมาณ พ.ศ. 2507 ในประเทศอินเดีย ซึ่งพบกระบือที่มีปัญหาเกี่ยวกับการผสมพันธุ์และอัตราการตายแรกคลอดสูง เนื่องจากเชื้อ hebdomadis[27]

จากการสำรวจสภาพการติดเชื้อของคนและสัตว์ ในบริเวณพื้นที่ต่าง ๆ ของ Tanzania พื้นที่ที่เลือกศึกษาคือ บริเวณที่มีบึง โคลนเลน ไร่อ้อย ทุ่งนา ทุ่งหญ้า ทะเลสาบ สำรวจใน หนู 537 ตัว โค 374 ตัว สุนัข 208 ตัว และคน 375 ราย โดยตรวจสอบด้วยวิธี MAT

แอนติเจนที่ใช้สำหรับการตรวจมีเชื้อ icterrohaemorrhagiae เชื้อ hardjo เชื้อ canicola เชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes และเชื้อ grippotyphosa ผลการตรวจพบว่าในหนูพวก *Mastomys natalensis* และ *Rattus rattus* มีประมาณ 1.9% ที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ icterrohaemorrhagiae ในโคพบเชื้อ hardjo 5.6% เชื้อ pyrogenes 1.9% ในสุนัขพบเชื้อ icterrohaemorrhagiae 37% เชื้อ *canicola* 0.5% ในคนมีเพียง 1 รายเท่านั้นที่ให้ผลบวกต่อเชื้อ grippotyphosa นอกจากนั้นแล้วยังได้ทำการแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคในโรงฆ่าสัตว์จำนวน 1021 ตัว พบเชื้อ 7 ตัว จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าโรคเลปโตสไปโรสิสยังเป็นโรคที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขในเกือบทุกพื้นที่ของ Tanzania[28]

การศึกษาการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปราในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็ก 2 ชนิด คือ พังพอน (*Herpetes auropunctatus*) 136 ตัว และหนู (*Mus musculus*) 96 ตัว โดยวางกับดักในพื้นที่ที่ Barbados แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธี MAT และนำชิ้นส่วนของไตมาเพาะเชื้อ พบว่าหนู (*Mus musculus*) 2 .9% ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อระดับไตเตอร์ 1:100 ขึ้นไปโดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อ ballum กับเชื้อ autumnalis ขณะที่พังพอน 41% ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ autumnalis ส่วนผลการเพาะเชื้อในหนูสามารถแยกเชื้อได้ 2.7% จากจำนวนหนูทั้งหมด โดยแยกเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar arborea และเชื้อ *L. kirschneri* serovar bim ในพังพอน 2.9% จากจำนวนพังพอนทั้งหมด สามารถแยกเชื้อ bim เป็นการศึกษาครั้งแรกที่พบว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อ bim ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในคน เนื่องจากในพื้นที่แห่งนี้มีผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสกว่า 63% มีสาเหตุจากการได้รับเชื้อชนิดนี้ ดังนั้นมาตรการต่างๆ จึงมุ่งเน้นไปที่สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคได้อย่างถูกต้อง[29]

การศึกษาเปรียบเทียบความชุกของโรคเลปโตสไปโรสิส ในแต่ละพื้นที่ของประเทศบราซิล จาก 6 รัฐ 56 ฟาร์ม โคจำนวน 2,449 ตัว โดยตรวจสอบด้วยวิธีทาง MAT โดยใช้แอนติเจน 24 ชนิด ปรากฏว่าให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ 1,480 ตัวอย่าง (60.43%) เชื้อที่เป็นสาเหตุหลัก คือเชื้อ hardjo (76.78%) เชื้อ *L.interrogans* serovar wolffii (5.35%) เชื้อ pomona (3.57%) เชื้อ grippotyphosa (3.57%) และ เชื้อ *L.interrogans* serovar australis (1.78%) และพบสัดส่วนของโคเนื้อให้ผลบวกต่อการติดเชื้อมากกว่าโคนม และมีความชุกของโรคแตกต่างกันในแต่ละรัฐ[30]

สรุปได้ว่าโรคเลปโตสไปโรสิสในโค กระบือนั้น (bovine leptospirosis) พบได้ทั่วโลก โดยส่วนใหญ่การติดเชื้อเกิดจาก การดื่มหรือลงไปแช่ในปลัก สระน้ำ คู คลองที่มีการปนเปื้อนปัสสาวะของโคหรือสัตว์อื่นที่มีการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยเฉพาะเชื้อ hardjo พบมากที่สุด[16] และในการศึกษาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับโรคเลปโตสไปโรสิส มักจะศึกษาถึงสาเหตุของเชื้อที่ทำให้เกิดการระบาด โดยทำการเพาะแยกเชื้อควบคู่กับการตรวจทางซีโรโลยีด้วย

2.8 การศึกษาองค์ความรู้ของโรคเลปโตสไปโรสิสด้านระบาดวิทยาในประเทศไทย

สถานการณ์โรคเลปโตสไปโรสิสในคนของประเทศไทย มีรายงานครั้งแรกโดย นายแพทย์ใช้ ยูนิพันธ์ เมื่อเกิดภาวะน้ำท่วมกรุงเทพครั้งใหญ่ใน พ.ศ. 2485 หลังจากนั้นอุบัติการณ์การเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส ก็มีการรายงานจากการตรวจพบทางห้องปฏิบัติการเป็นครั้งคราวอยู่ประปราย จึงจัดได้ว่าเป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทย ในรอบปี พ.ศ. 2528 – 2538 มีผู้ป่วยอยู่ระหว่างปีละ 100 – 300 ราย อัตราป่วย 0.17 – 0.50 ต่อแสนประชากร โดยพบผู้ป่วยค่อนข้างสูงในช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2539 พบว่ามีรายงานผู้ป่วยสูงขึ้น คือ พบผู้ป่วย 358 ราย ตาย 19 ราย อัตราป่วยตายเท่ากับร้อยละ 5.31 คิดเป็นอัตราป่วย 0.06 ต่อแสนประชากร โดยพบผู้ป่วยสูงในหลายจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คิดเป็นร้อยละ 95.9 ของผู้ป่วยทั้งประเทศ พบผู้ป่วยมากในจังหวัดบุรีรัมย์ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น และสุรินทร์ ในภาคเหนือได้แก่จังหวัดเพชรบูรณ์ และพิษณุโลก ส่วนภาคกลางและภาคใต้พบผู้ป่วยประปรายในบางจังหวัดเท่านั้น ใน พ.ศ. 2540 และ 2541 พบว่ามีการระบาดมากขึ้นเกือบ 7 เท่าของ พ.ศ. 2539 โดย พ.ศ. 2540 พบผู้ป่วย 2,334 ราย เสียชีวิต 113 ราย พ.ศ. 2541 พบผู้ป่วย 2,226 ราย เสียชีวิต 103 ราย และพ.ศ. 2542 พบผู้ป่วย 6,080 ราย เสียชีวิต 266 ราย อัตราป่วยต่อแสนประชากร เพิ่มเป็น 3.84, 3.62 และ 9.87 ตามลำดับ[31], [32], [33], [34], [35], [2] การเกิดโรคพบผู้ป่วยสูงตั้งแต่กลางฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาว โดยจะพบมากที่สุดในช่วงเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีน้ำท่วมพื้นที่ไร่นาและที่ลุ่มเป็นบริเวณกว้าง พบว่ามีอัตราป่วยสูงในกลุ่มอายุระหว่าง 20-50 ปี แต่มากที่สุดในกลุ่มอายุ 31-40 ปี พบมากถึงร้อยละ 41.5 อัตราส่วนของผู้ป่วยเพศชายต่อเพศหญิงคือ 7:1[2]

ใน พ.ศ. 2539 ได้มีความพยายามที่จะศึกษาความชุกและความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราแต่ละชนิดที่เกี่ยวข้องกับการระบาดในคน โดยใช้วิธีการตรวจที่นิยม คือ MAT ผลการตรวจเป็นบวกเมื่อมีภูมิคุ้มกันที่ระดับไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1: 100 จำนวนผลบวกจึงอาจจะหมายถึงผู้ที่เคยติดเชื้อและผู้ที่กำลังป่วยจริง ซึ่งต้องวินิจฉัยร่วมกับอาการ ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าในการระบาดครั้งนั้นมีเชื้อที่เป็นสาเหตุทั้งหมด 11 ชนิด โดยพบ เชื้อ *icterrohaemorrhagiae* มากที่สุด 31.7 % รองลงมาคือ *L.interrogans* serovar australis strain Ballico 26.8 %, *L.borgpetersenii* serovar javanica, *L.interrogans* serovar bataviae, *L.interrogans* serovar autumnalis strain Akiyami A พบมากเท่ากันคือ 7.3 % ในขณะที่ canicola, grippotyphosa, hebdomadis และ wolffii พบชนิดละ 2.4 % เท่ากัน[1]

การศึกษาจากสถานการณ์การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสของจังหวัดนครราชสีมาในพ.ศ. 2539 ซึ่งมีการระบาดของโรคครั้งใหญ่ในคนของ 2 พื้นที่ คือ อำเภอห้วยแถลง และ

อำเภอหนองบุนนาก ในการระบาดที่อำเภอหนองบุนนากเป็นการระบาดทุกตำบล (9 ตำบล) 29 หมู่บ้าน พบเพศชาย 45 ราย เพศหญิง 4 ราย คิดเป็นอัตราส่วนเพศชาย : เพศหญิง เท่ากับ 12 :1 ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทำนา พบผู้ป่วยอายุน้อยที่สุด 12 ปี อายุมากที่สุด 69 ปี และพบมากที่สุดในกลุ่มอายุ 25-29 รองลงมาเป็นกลุ่มอายุ 15-19 ปี จากการค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติม และดำเนินการสอบสวนโรคพบว่า จากการสังเกตสภาพสิ่งแวดล้อมของบ้านผู้ป่วย ร้อยละ 46.94 มีประวัติในบริเวณบ้าน พบหนูชุกชุมมากผิดปกติ ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนและร้อยละ 32.65 มีประวัติสัมผัสกับสัตว์ที่เสี่ยงต่อการมีเชื้อ ปัจจัยอื่นๆ ที่น่าจะเกี่ยวข้องคือผู้ป่วยร้อยละ 59.18 ซักประวัติแล้วมีบาดแผลตามร่างกายก่อนที่จะไปสัมผัสกับปัจจัยเสี่ยง (เดินลุยน้ำ จับปลา) โดยมีบาดแผลที่เท้ามากที่สุด รองลงมาคือหน้าแข้ง จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราในผู้ป่วยเพียง 13 ราย ตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา 4 ชนิดคือเชื้อ akiyami A, icterrohaemorrhagiae, ballico และ hebdomadis ซึ่งอาจเป็นเพราะสภาวะในช่วงฤดูฝนเข้าสู่ฤดูหนาว มีผลให้การวินิจฉัยเบื้องต้นคลาดเคลื่อนไป เพราะส่วนใหญ่จะมีอาการคล้ายกับไข้หวัด พื้นที่ที่พบผู้ป่วยมากเป็นพื้นที่ที่มีการไหลรวมตัวของแหล่งน้ำ และเป็นฝายกักเก็บน้ำได้ระยะสั้น ๆ มีปลาชุกชุม และประชาชนส่วนใหญ่นิยมลงไปจับปลาในแหล่งน้ำ ประกอบกับแหล่งน้ำนี้จะค่อย ๆไหลผ่านไปตามตำบลต่าง ๆ จนทั่วทุกตำบล ทำให้เกิดการระบาดกระจายไปในพื้นที่เดิมและข้างเคียงได้อย่างรวดเร็ว ถึง 13 ตำบล คาดว่าผู้ป่วยรายแรกน่าจะรับเชื้อมาจากพื้นที่ที่มีการเคลื่อนย้ายอพยพของสัตว์นำโรค ช่วงที่เกิดภาวะอุทกภัยของพื้นที่ใกล้เคียง แต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน[36]

ตั้งแต่ พ.ศ. 2539 เริ่มมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนของประเทศไทยและต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน กระทรวงสาธารณสุขศึกษาวิจัยร่วมกับหน่วยงานต่างๆ หลายหน่วยงาน เช่น กรมแพทย์ทหารบก กรมวิชาการเกษตร พบว่าแหล่งโรคน่าจะอยู่ที่ทุ่งนา เพราะสภาพแวดล้อมในทุ่งนามีความเหมาะสมต่อการอยู่รอดของเชื้อ หนูที่พบเชื้อส่วนใหญ่เป็นหนูที่อยู่ในนาทั้งสิ้น ได้แก่ หนูพุกใหญ่ นอกจากนี้ยังมีหนูนาใหญ่ และหนูนาเล็ก ผลการวิจัยเบื้องต้นสามารถยืนยันได้ว่า ผู้ป่วยติดเชื้อที่เพาะได้จากหนู เนื่องจากเลือดของผู้ป่วยตกตะกอนกับเชื้อที่แยกได้จากหนู แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นได้มีการดำเนินงานควบคุมหนู โดยเฉพาะหนูนาอย่างจริงจัง เพื่อลดอัตราป่วยตายของผู้ป่วยด้วยและได้เพิ่มความเข้มแข็งของระบบเฝ้าระวังโรคเลปโตสไปโรสิส[37] แต่การระบาดของโรคก็มิได้ลดลงแต่อย่างใด

ต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบอาการและอาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วยกับข้อมูลจากแบบสอบสวนโรคเฉพาะรายของผู้ป่วยที่สงสัยโรคเลปโตสไปโรสิสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้อมูลที่ทำการเก็บได้แก่ การประกอบอาชีพ กิจกรรมที่สัมผัสกับน้ำและสัตว์ เช่น การ

ทำนา การจับปลา การเลี้ยงสัตว์ และการมีบาดแผล นอกจากนี้ได้สำรวจสภาพแวดล้อมในบ้านของผู้ป่วยและกลุ่มเปรียบเทียบ ผลการวิเคราะห์พบว่าการประกอบกิจกรรม ได้แก่ การไถนา การถอนกล้า การใส่ปุ๋ยในพื้นที่เปียก นานกว่า 6 ชั่วโมง การเดินย่ำน้ำ และมีบาดแผลฉีกขาดสัมผัสน้ำหรือโคลน เป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดโรค[4]

จากการตรวจสอบระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา จากผู้ป่วยที่สงสัยโรคเลปโตสไปโรสิส จำนวน 190 ราย ด้วยวิธี MAT ในพ.ศ. 2542 นำซีรั่มมาตรวจสอบกับเชื้อแอนติเจน 16 ชนิด พบว่าให้ผลลบ 139 ราย ส่วนที่เหลือให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ sejroe 22 ราย, bratislava 8 ราย, pyrogenes 7 ราย, *L. interrogans* serovar bangkok 5 ราย, bataviae 2 ราย, icterrohaemorrhagiae 2 ราย, ballico 1 ราย, javanica 1 ราย, hebdomadis 1 ราย, wolffii 1 ราย และ pomona ชนิดละ 1 ราย[38]

จากข้อมูลดังกล่าว เริ่มมีการสังเกตเห็นว่าเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อให้เกิดโรคในคน อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับสัตว์จำพวกโค กระบือ ต่อมาจึงได้ทำการสำรวจโรคเลปโตสไปโรซีสทางซีโรโลยีด้วยวิธี MAT ในปศุสัตว์ทั่วประเทศ ระหว่างพ.ศ. 2540 - 2541 จากซีรั่มโคจำนวน 2,488 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 741 ตัวอย่าง (29.8%) เชื้อเลปโตสไปราชนิดที่พบมากคือเชื้อwoffii (48.02%), pomona (45.5%), javanica (36.0%), pyrogenes (30.1%), hebdomadis (24.9%) และ tarassovi (21.6%) ซีรั่มของกระบือจำนวน 211 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 40 ตัวอย่าง (19.0%) ชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่พบมากคือเชื้อ woffii (40%), tarassovi (35%) และ javanica (25%) ซีรั่มของสุกรจำนวน 857 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 37 ตัวอย่าง (4.3%) ชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่พบมากคือเชื้อ ballico (45.9%), canicola (45.9%), icterrohaemorrhagiae (37.8%) และ bataviae (32.4%) ซีรั่มของแพะ แกะจำนวน 251 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 67 ตัวอย่าง (26.7%) ชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่พบมากคือเชื้อ icterrohaemorrhagiae (94.0%) ซีรั่มของม้าจำนวน 3 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 1 ตัวอย่าง และซีรั่มของสุนัขจำนวน 48 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 2 ตัวอย่าง

นอกจากนั้นได้มีการสำรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในสัตว์จากโครงการสาธารณสุขเรื่องผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์ ระหว่าง พ.ศ. 2540-2541 โดยสำรวจ กระบือจำนวน 194 ตัว ให้ผลลบ 154 ตัว ผลบวก 40 ตัว กระบือส่วนใหญ่ ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสรุปได้ดังนี้ เชื้อ wolffii 16 ตัว, tarassovi 14 ตัว, javanica 10 ตัว, pomona 8 ตัว, pyrogenes 7 ตัว, ballico 1 ตัว และ bataviae 1 ตัว และมีโค 54 ตัวที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา มากกว่าหนึ่งชนิดเช่นกัน ซึ่งสรุปได้ดังนี้ เชื้อ sejroe 25 ตัว, Uncertain new 21 ตัว, Uncertain saigon 19 ตัว, ballum 16 ตัว, copenhageni 14 ตัว, bratislava 11 ตัว, pyrogenes

10 ตัว, *L. biflexa* serovar patoc 5 ตัว, *L. interrogans* serovar naam 4 ตัว, wolffii 3 ตัว, bangkok 3 ตัว, *L. borgpetersenii* serovar poi 3 ตัว, Akiyami A 2 ตัว, bataviae 2 ตัว, hebdomadis 2 ตัว, *L. interrogans* serovar rachmati 2 ตัว, hardjo 2 ตัว, icterrohaemorrhagiae 1 ตัว, javanica 1 ตัว และpomona 1 ตัว

รวมทั้งได้ทำการสำรวจเพิ่มเติมในปี พ.ศ. 2542 ซึ่งผลการสำรวจความชุกของการติดเชื้อเลปโตสไปราในโค และกระบือส่วนใหญ่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งสรุปได้ดังนี้ ชนิดของเชื้อเลปโตสไปราในโค เชื้อ wolffii 48.2 %, pomona 45.5%, javanica 36.0 %, pyrogenes 30.1%, hebdomadis 21.9%, tarrasovi 21.6%, icterrohaemorrhagiae 6.7%, canicola 5.1%, bataviae 3.4%, ballico 2.4% และAkiyami A 1.9% ชนิดของเชื้อเลปโตสไปราในกระบือ เชื้อ wolffii 40.0%, tarrasovi 35.0%, javanica 25.0%, pomona 20.0%, pyrogenes 17.5%, bataviae 10.0% และ ballico 0.25%[20]

แต่อย่างไรก็ตามผลการสำรวจที่ผ่านมานั้น ก็ไม่สามารถระบุชี้ชัด ได้ว่าโค และกระบือเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคนของประเทศไทยได้หรือไม่ เพราะเป็นการตรวจเฉพาะระดับภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อในสัตว์แต่เพียงอย่างเดียว อาจจะบอกได้คร่าว ๆ ว่า ปศุสัตว์ในประเทศไทยมีความชุกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราในฝูงค่อนข้างสูง แต่ไม่สามารถกล่าวได้ว่าจะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ดังเช่นการศึกษาในต่างประเทศถ้าจะระบุถึงสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค จะต้องทำการศึกษาครอบคลุมทั้งการตรวจทางซีโรโลยีและการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะ ร่วมกับการสังเกตลักษณะการเลี้ยงดูสัตว์ที่อาจมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์

ดังนั้นโครงการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้เลือกศึกษาในพื้นที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เนื่องมาจากในวันที่ 14 กันยายน พ.ศ. 2542 ประชาชนที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ดังกล่าวได้ร่วมกันทำความสะอาดขุดลอกหนองน้ำ มีผู้เข้าร่วมกิจกรรมในครั้งนี้กว่า 500 คน หลังจากกิจกรรมการขุดลอกหนองน้ำ พบผู้ป่วยที่มีอาการไข้ ปวดศีรษะ และปวดเมื่อยกล้ามเนื้อที่เข้าได้กับนิยามของโรคเลปโตสไปโรสิสมารับการรักษาที่โรงพยาบาลคูเมือง จำนวน 115 ราย ไม่มีเสียชีวิต โดยมีช่วงระยะเวลาการระบาดตั้งแต่วันที่ 19 กันยายน ถึง วันที่ 14 ตุลาคม พ.ศ. 2542 ในระหว่างนั้นคณะสอบสวนโรคประกอบด้วยแพทย์ นักวิชาการจากกองระบาดวิทยา ศูนย์ระบาดวิทยาภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์ และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลคูเมือง ร่วมกันออกสอบสวนโรค โดยการไปสัมภาษณ์ผู้ป่วยที่บ้าน และค้นหาผู้ป่วยเพิ่มเติม เพื่อหาสาเหตุและปัจจัยเสี่ยง โดยใช้วิธีการศึกษาแบบ historical cohort study สรุปได้ว่าการลงลอกหนองน้ำมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคเป็นอย่างยิ่ง และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี

MAT ในผู้ป่วย พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในพื้นที่นี้ คือเชื้อ serogroup Sejroe[39] จากการทบทวนวรรณกรรมทำให้ทราบว่าเชื้อ serogroup Sejroe มีโค กระบือ เป็นแหล่งรังโรคหลักสำคัญ[40] ดังนั้นการศึกษาว่าสัตว์ชนิดใด ที่น่าจะเป็นแหล่งรังโรคและเกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนครั้งนี้ จึงเลือกสำรวจ โค และกระบือเป็นสำคัญ เพื่อที่จะตอบคำถามเกี่ยวกับสัตว์ที่คาดว่าเป็นแหล่งรังโรคในการระบาด ในเขตที่มีปัญหาการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน

2.9 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.9.1 วัตถุประสงค์เฉพาะ

เพื่อสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยาและแหล่งรังโรคใน โค กระบือ ในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

2.9.2 วัตถุประสงค์ทั่วไป

2.9.2.1 เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่โค กระบือในพื้นที่ศึกษา จะเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญในการแพร่เชื้อเลปโตสไปรามาสู่คน

2.9.2.2 เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเป็นแนวทางการป้องกัน และควบคุมโรคเลปโตสไปโรสิสที่เหมาะสมและสอดคล้องกับปัญหาที่เกิดขึ้นจริงในพื้นที่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 สถานที่วิจัยและประชากรศึกษา

โครงการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกศึกษาในพื้นที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เนื่องจากจังหวัดบุรีรัมย์มีแนวโน้มการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสรุนแรงเพิ่มขึ้นตั้งแต่ พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา คิดเป็นอัตราป่วย 113.0 ต่อประชากรแสนคน อัตราป่วยตายร้อยละ 4.9 การระบาดของโรคมีการกระจายในทุกอำเภอ โดยอำเภอคูเมืองมีอัตราป่วยสูงสุดอยู่ใน 5 อันดับแรก ข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและตายด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสของอำเภอคูเมือง มีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและตายด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสของอำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ปี พ.ศ. 2539 – 2542 [41]

ปี พ.ศ.	จำนวนป่วย	อัตราป่วยต่อประชากรแสนคน	จำนวนตาย	อัตราป่วยตาย
2539	3	4.9	0	0
2540	26	39.8	0	0
2541	10	15.2	1	10.0
2542	145	218.0	3	2.1

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสในคนในตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญคือกิจกรรมขุดลอกหนองน้ำ แสดงให้เห็นว่าหนองน้ำขนาดใหญ่ (รูปที่ 1) ของตำบลคูเมืองเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส และเป็นหนองน้ำที่มีการเลี้ยงโค กระบือ อยู่โดยรอบ เป็นบริเวณที่สัตว์จะลงไปกินน้ำและนอนแช่อยู่เป็นประจำ ประกอบกับหลักฐานผลการตรวจในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสของตำบลคูเมืองด้วยวิธี MAT พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคในคนของพื้นที่นี้ คือเชื้อ serogroup Sejroe[39] ดังนั้นการศึกษาว่าสัตว์ชนิดใด ที่น่าจะเป็นแหล่งรังโรคและเกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนครั้งนี้ จึงเลือกสำรวจ โค และกระบือเป็นสำคัญ จากข้อมูลการสำรวจประชากรโค กระบือในปี พ.ศ. 2542 พบว่าในหมู่ที่ 2 และหมู่ที่ 4 ของตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นหมู่

กระบือมาเลี้ยงบริเวณหนองน้ำจำนวนทั้งหมด 56 ตัว เป็นโคจำนวน 20 ตัว กระบือจำนวน 36 ตัว จึงได้ทำการศึกษาตัวอย่างโคและกระบือทุกตัวที่มีประวัติการเลี้ยงอยู่รอบ ๆ บริเวณหนองน้ำ ร่วมกับการสอบถามและสังเกตสภาพแวดล้อม

รูปที่ 1 พื้นที่บริเวณหนองน้ำที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งมีโคและกระบืออาศัยอยู่โดยรอบ

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการตรวจหาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคและกระบือ โดยวิธี MAT

สารเคมี

3.2.1.1 น้ำกลั่น

3.2.1.2 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.2.1.3 Neopeptone media (Difco Laboratories, Detroit,MI.)

(ภาคผนวก)

3.2.1.4 เชื้อเลปโตสไปรา 22 ซีโรวาร์

3.2.1.5 Phosphate Buffer Saline (pH 7.2-7.4)

3.2.1.6 Rabbit Serum

3.2.2 สารเคมีสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือ โดยเทคนิค PCR

สารเคมี

3.2.2.1 น้ำกลั่น

3.2.2.2 1 mM EDTA (pH 8.0)

3.2.2.3 1 M TE

3.2.2.4 25 mM $MgCl_2$ (Fermentas, Hanover, MD.)

3.2.2.5 10 x PCR buffer without $MgCl_2$ (Fermentas, Hanover, MD.)

3.2.2.6 5 mM dNTPs (Fermentas, Hanover, MD.)

3.2.2.7 10 mM Primer Lepto F (Gibco BRL®, Life Technoliges, Frederick, MD.)

3.2.2.8 10 mM Primer Lepto R (Gibco BRL®, Life Technoliges, Frederick, MD.)

3.2.2.9 50 units เอนไซม์ Tag DNA polymerase (Fermentas, Hanover, MD.)

3.2.2.10 Gel Loading Buffer (0.2% Orange G in 50% glycerol)

3.2.2.11 100 bp DNA Ladder Plus

3.2.2.12 1 ×TBE

3.2.2.13 Agarose media (0.8%)(ภาคผนวก) (FMC Bioproducts, Rockland,ME.)

3.2.2.14 Ethidium bromide (0.5 mg per ml)

3.2.3 สารเคมีสำหรับการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

สารเคมี

3.2.3.1 Fletcher Medium base (Difco Laboratories, Detroit,MI.) (ภาคผนวก)

3.2.3.2 น้ำกลั่น

3.2.3.3 Rabbit Serum

3.2.3.4 Agar

3.2.3.5 5 – fluorouracil

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการตรวจหาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันย์ต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคและกระบือ โดยวิธี MAT

อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1.1 Appendorf® tube

3.3.1.2 Single autopipette

3.3.1.3 Multichannel pipette

3.3.1.4 Microtiter flat plate

3.3.1.5 Glass slide

3.3.1.6 กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

3.3.1.7 หลอดแก้ว ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.1.8 เครื่องชั่งมาตรฐาน

3.3.1.9 ขวดแก้ว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.3.1.10 Boiler

3.3.1.11 เครื่อง autoclave

3.3.1.12 เครื่องวัด pH

3.3.1.13 Water bath

3.3.1.14 หลอดแก้ว ขนาด 5 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือ โดยเทคนิค PCR

อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.2.1 กระบอกเก็บปัสสาวะ ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.2.2 Single autopipette

3.3.2.3 Appendorf® tube

3.3.2.4 Microcentrifuge tube

3.3.2.5 Vortex mixer

3.3.2.6 Centrifuge tube

3.3.2.7 Centrifuge

3.3.2.8 Boiler

3.3.2.9 เครื่อง Thermal cycler
(Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK)

3.3.2.10 Microflat plate

3.3.2.11 เครื่องชั่งมาตรฐาน

3.3.2.12 หลอดแก้ว ขนาด 200 มิลลิลิตร

3.3.2.13 ขวดแก้ว ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.2.14 Gel box

3.3.2.15 Comb

3.3.2.16 Electrophoresis chamber
(Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

3.3.2.17 UV Transilluminator
(Vilber Lourmat,La Vallee Cedex, France)

3.3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเพาะเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.3.1 กระบอกฉีดยา ขนาด 2 มิลลิลิตร

3.3.3.2 หลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.3.3.3 ถุงพลาสติกสีดำ

3.3.3.4 Centrifuge

3.3.3.5 Centrifuge tube

3.3.3.6 กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

3.3.3.7 กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

3.3.3.8 เครื่องชั่งมาตรฐาน

3.3.3.9 Boiler

3.3.3.10 เครื่อง autoclave

3.3.3.11 เครื่องวัด pH

3.3.3.12 Water bath

3.3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการตรวจความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ

อุปกรณ์และเครื่องมือ คือกระดาษลิตมัส

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 สอบถาม ชื่อ นามสกุล ที่อยู่ของเจ้าของสัตว์ ประวัติการแท้งของสัตว์ในช่วง 2 ปี ที่ผ่านมา อายุ เพศ และตำหนิของสัตว์ แล้วทำการบันทึกลงในแบบฟอร์มรายละเอียด

3.4.2 เก็บวัสดุตัวอย่างเลือด เพื่อทำการตรวจระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคกระบือ โดยวิธี MAT

ต้อนโค กระบือ เข้าซองบังคับสัตว์ แล้วกระทำการเจาะเก็บเลือดด้วยกระบอกฉีดยา และเข็มฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) หลังจากเก็บวัสดุตัวอย่างเลือดของโค กระบือ รีบปั่นแยกเก็บซีรั่มทันที แล้วใส่ในหลอดเก็บซีรั่ม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจในห้องปฏิบัติการ

3.4.3 เก็บวัสดุตัวอย่างปัสสาวะเพื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโค กระบือโดยเทคนิค PCR และทำการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.3.1 ต้อนโค กระบือ เข้าซองบังคับสัตว์ ทำความสะอาดรอบบริเวณอวัยวะเพศ จากนั้นก็กระตุ้นที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ หรือฉีดยา furosemide เข้าเส้นเลือดดำใหญ่ที่บริเวณ (jugular vein) แล้วรอเก็บน้ำปัสสาวะช่วงกลางลงในกระบอกเก็บปัสสาวะ

3.4.3.2 หลังจากเก็บวัสดุตัวอย่างปัสสาวะของโค กระบือ จะตรวจสภาพความเป็นกรด-ด่าง ในปัสสาวะ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือโดยเทคนิค PCR

3.4.3.3 ส่วนหนึ่งของปัสสาวะที่เก็บได้นั้นได้แบ่งไว้สำหรับตรวจโดยเทคนิค PCR แล้วอีกส่วนหนึ่งได้ใช้กระบอกฉีดยาดูดปัสสาวะจากกระบอกเก็บปัสสาวะ แล้วหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเพื่อเตรียมนำไปเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป ถ้ามีการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปราบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ก็จะดำเนินส่งตรวจสอบชนิดสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในต่างประเทศที่

Royal Tropical Institute , Department of Biomedical Research

WHO/FAO collaborating Center for Reference on Leptospirosis.

Meilbergdreef39

1105 AZ Amsterdam

The Netherlands.

3.4.4 หลังจากทราบผลการตรวจวินิจฉัยว่าซีรั่มของสัตว์ตัวใดที่มีระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา หรือตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะหรือมีการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำการรักษาสัตว์ตัวนั้นโดยให้ยา Dihydrostreptomycin 25 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 วัน

3.5 การวิเคราะห์ลักษณะสภาพการติดเชื้อ และการเป็นแหล่งรังโรคในโค กระบือ

3.5.1พารามิเตอร์ที่ใช้วัดลักษณะสภาพการติดเชื้อและการเป็นแหล่งโรคในโค กระบือ

3.5.1.1 ลักษณะทางกายภาพของสัตว์

- ประวัติการแท้ง ในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา
- ความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ

3.5.1.2 ลักษณะของผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- ระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคและกระบือโดยวิธี MAT
- การตรวจพบหรือไม่พบเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือโดยเทคนิค PCR

- การตรวจพบหรือไม่พบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะของโคและกระบือโดยการเพาะแยกเชื้อ
- การตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะ

3.5.2 วิธีการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์

3.5.2.1 ประวัติการแท้งในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา และความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ จากองค์ความรู้ที่กล่าวมาในข้างต้น เป็นข้อมูลที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส ซึ่งจำเป็นต้องมีการเก็บบันทึกรายละเอียด เพื่อดูความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์ตัวนั้น

3.5.2.2 การตรวจหาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโค กระบือ โดยวิธี MAT

หลักการของ MAT จะใช้เชื้อเลปโตสไปราทั้ง 22 ชนิด ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขแนะนำให้ใช้ในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 รายละเอียดแสดงสายพันธุ์เลปโตสไปราที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขแนะนำให้ใช้ในประเทศไทย[22]

SEROGROUPS	SEROVARS	STRAINS
1. Australis	1. ballico	Ballico
	2. bangkok	
	3. bratislava	
2. Autumnalis	4. autumnalis	Akiyami A
	5. rachmati	
3. Ballum	6. ballum	
4. Bataviae	7. bataviae	
5. Canicola	8. canicola	
6. Cellidoni	9. cellidoni	
7. Djasiman	10. djasiman	Djasiman
8. Grippotyphosa	11. grippotyphosa	
9. Hebdomadis	12. hebdomadis	Hebdomadis
10. Tarassovi	13. tarassovi	
11. Icterohaemorrhagiae	14. copenhageni	
	15. Icterohaemorrhagiae	
12. Louisiana	16. saigon	
13. Pomona	17. pomona	
15. Sejroe	18. hardjo	
	19. sejroe	
	20. wolffi	
16. Semaranga	21. patoc	
17. Andamana	22. andamana	CH – 11

เชื้อเลปโตสไปราทุกซีโรวาร์ที่ใช้จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (liquid media) เพื่อทำเป็นแอนติเจน แล้วนำมาทำปฏิกริยากับระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโค กระบือจนเกิดปฏิกริยาการจับกลุ่ม (agglutination) สังเกตได้จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ถ้าให้ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรามีลักษณะเป็น lysis ball หรือ star การตรวจทุกครั้งควรทำตัวควบคุมชนิดบวก และตัวควบคุมชนิดลบ[22]

การควบคุมคุณภาพ (quality control) เมื่อทำการตรวจหาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของ โค กระบือ โดยวิธี MAT

1. ทำการเพาะเชื้อเลปโตสไปราทุกซีโรวาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวให้มีอายุประมาณ 5-10 วัน ถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่หลาย ๆ ครั้ง จนเชื้อเจริญคงที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อที่ได้ต้องมีลักษณะตัวสั้น ว่องไว เชื้อไม่แน่นจนเกินไป และไม่รวมกันเป็นกลุ่ม

2. ทำตัวควบคุมชนิดบวก (positive serum control) ของเชื้อแต่ละซีโรวาร์

3. การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส ในห้องปฏิบัติการทุกครั้งต้องบันทึกข้อมูลดังนี้ คือ ชื่อ นามสกุลของเจ้าของสัตว์ แหล่งส่งตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง วัน เดือน ปี ที่รับ-ทำ-ส่งผล ระดับไตเตอร์ของเชื้อแต่ละชนิด ผู้วิเคราะห์ ผู้ตรวจสอบ

3.5.2.3 การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของ โค และกระบือโดยเทคนิค PCR

เทคนิค PCR เป็นเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาซึ่งกำลังมีบทบาทอย่างมากทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ และจะมีผลกระทบต่อการวินิจฉัยและการควบคุมโรคติดต่อในอนาคตอันใกล้นี้ เทคนิค PCR นี้สามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในหลอดทดลองได้โดยไม่จำกัดจำนวน โดยใช้สายดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนน้อยเท่านั้น วิธีนี้ใช้หลักการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้ออกเป็นสายเดี่ยวโดยอาศัยความร้อน หลังจากนั้นเมื่อลดอุณหภูมิให้เย็นลงในสภาวะที่มีดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (primer) 2 เส้น โดยที่แต่ละเส้นสามารถจับได้อย่างจำเพาะกับสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสาย และมีสายนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด และเอนไซม์ DNA polymerase ก็จะเกิดการสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ ซึ่งมีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ถ้าเริ่มต้นจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุด 1 รอบจะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2 คู่ ดังนั้นเมื่อใช้วิธีการเพิ่มแล้วลดอุณหภูมินี้หลาย ๆ รอบ ก็จะได้สาย ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าในทุก ๆ รอบ ในทางทฤษฎีเมื่อสิ้นสุดการทำ PCR จำนวน 30 รอบ ก็จะได้ส่วนของ ดีเอ็นเอ นั้นเป็นจำนวนถึงหนึ่งพันล้านเท่าของจำนวนดีเอ็นเอเริ่มต้น[42]

การควบคุมคุณภาพเมื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของ โค และกระบือโดยเทคนิค PCR

1. แบ่งน้ำยาต่าง ๆ ที่ใช้ในงาน PCR ใส่หลอดเล็ก ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในแง่ช่วยลดการปนเปื้อน เพราะมีโอกาสเปิดขวดน้ำยาเพื่อดูดถ่ายน้อยลง นอกจากนี้หากมีปัญหาการปนเปื้อนเกิดขึ้นในน้ำยาต่าง ๆ ก็สามารถทิ้งเฉพาะขวดหรือหลอดน้ำยานั้นได้

2. ในการทำ PCR ทุกครั้ง มีตัวควบคุมชนิดบวก (positive control) และตัวควบคุมชนิดลบ (negative control)

3. ปฏิบัติงานด้วยมาตรการที่เข้มงวดและระมัดระวัง โดยการสวมถุงมือและเปลี่ยนถุงมือบ่อย ๆ เปิดปิดฝาหลอดด้วยความระมัดระวัง และก่อนเปิดฝาหลอดทุกครั้ง จะนำหลอดดังกล่าวไปปั่น เพื่อให้สารละลายที่ติดอยู่บริเวณด้านในของฝาถูกปั่นไปอยู่ก้นหลอดทั้งหมด ในการเตรียมส่วนประกอบต่างๆ ของการทำ PCR จะทำอยู่ในรูปสารผสมเพียงหลอดเดียวที่เรียกว่า master mix จะช่วยลดโอกาสปนเปื้อน และบริเวณพื้นที่ทำงานทำความสะอาดด้วยสารละลายเจือจาง 1% Clorox

4. ทำการตรวจหาความไวของการตรวจหาเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ATCC 43642 (American Type Culture collection, Rockville,MD.) ด้วยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิส ซึ่งมีขนาดของ PCR product เป็น 343 bp โดยทำ ten-fold serial dilutions มีเชื้อเลปโตสไปรา 2×10^8, 2×10^7 , 2×10^6, 2×10^5, 2×10^4, 2×10^3, 2×10^2, 20, 2, 0.2, 0.02 เซลล์ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร

5. การตรวจหาดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ทุกครั้งต้องบันทึกข้อมูลดังนี้คือ ชื่อ นามสกุลของเจ้าของสัตว์ แหล่งส่งตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่าง วัน เดือน ปี ที่รับ-ทำ ส่งผล ผลการตรวจพบหรือไม่พบดีเอ็นดีของเชื้อเลปโตสไปรา ผู้วิเคราะห์ และผู้ตรวจสอบ

3.5.2.4 การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

การเพาะแยกเชื้อจากเลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง หรืออวัยวะต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษสำหรับเพาะเชื้อเลปโตสไปรา วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสำคัญ ซึ่งสามารถแสดงเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้โดยตรง (definitive diagnosis) และควรทำควบคู่ไปกับการวินิจฉัยโดยวิธีอื่น ๆ ด้วยทุกครั้ง หลักการของการเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะ ควรเก็บปัสสาวะหลังจากแสดงอาการป่วย 1 สัปดาห์เป็นต้นไป ทำ ten -fold serial dilutions อย่างน้อย 3 dilutions ในสารละลาย Phosphate Buffer Saline ที่ pH 7.2-7.4 นำปัสสาวะที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งเหลว (semisolid) ที่มีส่วนผสมของยา 5-fluorouracil โดยมีความเข้มข้นของยาใน

อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 200-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [38]

การควบคุมคุณภาพเมื่อทำการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

1. เก็บน้ำปัสสาวะช่วงกลางจะมีโอกาสเพาะแยกเชื้อได้มากที่สุด
2. เก็บตัวอย่างปัสสาวะก่อนที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะ
3. ภาชนะเก็บตัวอย่างต้องปราศจากเชื้อ ติดฉลากที่มีรายละเอียดของชื่อสัตว์ อายุ เพศ วันที่เก็บตัวอย่าง พร้อมกับใบนำส่งตัวอย่าง และรีบส่งตัวอย่างโดยเร็วถึงจะมีโอกาสเพาะแยกเชื้อได้มากที่สุด

3.5.2.5 การตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะของโคและกระบือ

หลักการของการตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา คือนำเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้ทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับแอนติซีรั่มมาตรฐานที่จำเพาะต่อชนิดสายพันธุ์จำนวน 230 ชนิดสายพันธุ์ ครอบคลุมจำนวนซีโรกรุปของเลปโตสไปรา ทั้ง 23 ซีโรกรุป ที่มีในปัจจุบัน โดยมีสมมติฐานว่าเชื้อที่เพาะแยกได้จากสัตว์รังโรคควรเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น

นำแอนติซีรั่มมาตรฐานทำปฏิกริยากับเชื้อเลปโตสไปราที่ได้มาจากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะของโคกระบือ จนเกิดปฏิกริยาการจับกลุ่มเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ถ้าให้ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรามีลักษณะเป็น lysis ball หรือ star การตรวจทุกครั้งควรทำตัวควบคุมชนิดบวก และตัวควบคุมชนิดลบ[43]

ซึ่งการวิเคราะห์ขั้นตอนตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราในการศึกษาครั้งนี้ ได้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในต่างประเทศดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น เนื่องจากยังไม่สามารถตรวจสอบได้ในประเทศไทย

3.5.3 ขั้นตอนและวิธีการในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.3.1 ประวัติการแท้งในช่วง 2 ปีที่ผ่านมา และความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะ

สอบถามเจ้าของสัตว์เกี่ยวกับประวัติการแท้งในช่วง 2 ปีที่ผ่านมาของสัตว์แต่ละตัว โดยกรอกลงในแบบฟอร์มรายละเอียด และหลังจากการเก็บปัสสาวะแล้วนั้น นำกระดาษลิตมัสจุ่มลงในปัสสาวะ เพื่อตรวจสอบลักษณะความเป็นกรด - ด่าง แล้วบันทึกข้อมูล

3.5.3.2 การตรวจหาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคและกระบือ โดยวิธี MAT

นำซีรั่มของโคและกระบือที่ใส่ไว้ในหลอดเก็บซีรั่มซึ่งแช่เก็บไว้ในน้ำแข็ง (ice pack) สำหรับควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยทำการวิเคราะห์

1. การเตรียมแอนติเจน

เชื้อเลปโตสไปราแต่ละชนิด รวมทั้งหมด 22 ชนิด ซึ่งได้รับการเพาะเลี้ยงลงในหลอดที่มี Neopeptone media ให้มีอายุประมาณ 5-7 วัน จนตัวเชื้อเจริญดงที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่เชื้อต้องมีการเคลื่อนไหวว่องไว ไม่หนาแน่นจนเกินไป และไม่รวมกันเป็นกลุ่ม มีความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปรา 10^6-10^7 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นด้วย Phosphate Buffer Saline

2. Microscopic Agglutination Test (MAT)

2.1 วิธี Screening Test

2.1.1 เจือจางซีรั่มให้เป็น 1 : 10 โดยใช้ซีรั่มปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ Phosphate Buffer Saline ปริมาตร 18 ไมโครลิตร

2.1.2 ใช้ Single autopipette ดูดซีรั่มที่เจือจางแล้ว หยดลงใน Microtiter flat plate ทั้งหมด 24 หลุม

2.1.3 ใช้ Single autopipette ขนาด 10 ไมโครลิตร ดูดแอนติเจนทั้ง 22 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน Neopeptone media หยดเชื้อแต่ละชนิด ลงไปในแต่ละหลุมทั้งหมด 22 หลุมที่มีซีรั่มที่เจือจาง

2.1.4 เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง

2.1.5 ใช้ Multichannel pipette ชนิด 8 ช่อง ดูด dilution ต่างๆ ใน Microtiter flat plate ใส่สไลด์และนำสไลด์นั้นมาอ่านผลการเกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

การอ่านผล : ผลบวก คือ การจับกลุ่มกันเป็นก้อน หรือสานเป็นตาข่ายมีระดับไตเตอร์ $\geq$ 1:20

ผลลบ คือ ไม่มีการจับกลุ่ม

รายที่ให้ผลบวกนำไปหาระดับไตเตอร์ต่อเชื้อชนิดนั้นๆ โดยทำ Confirmation test

3. การตรวจวิธี Confirmation Test

3.1 ใช้ Microititer flat plate 1 plate สามารถทำได้ 10 ตัวอย่าง รวมทั้ง positive และ negative control ตามแถวแนวนอน 1-12

3.2 ใช้ Mulitchannel pipette ขนาด 5-50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรมาที่ 20 ไมโครลิตร ใส่ Phosphate Buffer Saline ลงในแถว B-H หลุมที่ 1 ตามแนวขวาง ใส่หลุมละ 20 ไมโครลิตร นำซีรั่มมาเจือจางเป็น two fold serial diution ใน Microtiter flat plate โดยใส่ซีรั่มที่เจือจาง (1:20) ใส่ลงในแถว A- B หลุมที่ 1 ตามแนวขวางดังตารางที่ 3

3.3 ใช้ Multichannel pipette ชนิด 8 ช่อง ขนาด 5-50 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 20 ไมโครลิตร ดูดผสมซีรั่มประมาณ 10 ครั้งในแถว B และดูดผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงแถว C ผสมและเจือจางต่อไปจนถึงแถว H ทุกหลุมจะมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.4 ใช้ Single autopipette ขนาด 5-50 ไมโครลิตร หยดเชื้อเลปโตสไปราปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงแถว A-H ทุกหลุมตามแนวขวางแล้วผสมโดยใช้มือเคาะด้านข้าง plate ทุกด้านแรงๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้ง 2 ชั่วโมงจะได้ Final dilution ของแถว A-H เป็น 1:20, 1:40, 1:80, ..., 1:2560 ตามลำดับ

3.5 ใช้ Multichannel pipette ชนิด 8 ช่อง ดูด dilution ต่างๆ ใน Microtiter flat plate ใส่ลงสไลด์ และนำสไลด์นั้นมาดูกล้องจุลทรรศ์พื้นมืด

3.6 อ่านผลปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มด้วยกล้องจุลทรรศ์พื้นมืด

4+ = 100% Clearance of Leptospirosis from the field

3+ = 75% Clearance of Leptospirosis from the field

2+ = 50% Clearance of Leptospirosis from the field

1+ = 25% Clearance of Leptospirosis from the field

ระดับไตเตอร์ จะตัดสินที่หลุมสุดท้ายที่ให้ 50% Agglutination[43]

สรุปวิธีการทำตามตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สรุปวิธีการทำ Confirmation test ในการทำ MAT

Final dilution	Reagent			ตัวอย่างซีรั่มที่นำมาทำ Confirmation test										Positive control	Negative control
	PBS (ul)	Serum (ul)	Leptospira (ul)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A(1: 20)	-	20	20												
B(1: 40)	20	20	20												
C(1: 80)	20	-	20												
D(1: 160)	20	-	20												
E(1: 320)	20	-	20												
F(1: 640)	20	-	20												
G(1: 1280)	20	-	20												
H(1: 2560)	20	-	20												

ทิ้ง 20 ไมโครลิตร

3.5.3.3 การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือโดยเทคนิค PCR

นำปัสสาวะของโคและกระบือที่ใส่ไว้ในกระบอกเก็บปัสสาวะ ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการวิเคราะห์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้รูปแบบการตรวจวิเคราะห์จากการศึกษาวิจัยของผู้อื่นที่ได้ทำการศึกษาในประเทศไทย โดยการศึกษานั้นได้ใช้แบบ Primer สำหรับตรวจและแยกชนิดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรคโดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MegAlign program (DNASTAR Inc, Madison, WI.) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่แตกต่างกันมากกับแบคทีเรียชนิดอื่น และจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ทีเหมาะสำหรับการเป็น Primer คือยีนส์สำหรับการสังเคราะห์ 16S ribosomal RNA (rRNA) gene ดังตารางที่ 4 แล้วได้สั่งสังเคราะห์จากบริษัท Gibco BRL®, Life Technoliges, Frederick, MD.[44] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น [45]

ตารางที่ 4 Primer sequences ของยีนส์ที่ใช้เทคนิค PCR

ขนาดของยีนส์	ชื่อ Primer	Primer sequences	ขนาดของ PCR product (bp)
16S (rRNA)	Primer Lepto F	5′-TCYGAGTCTGGGATAACTTTCC	343
16S (rRNA)	Primer Lepto R	5′- GTACCATCATCACATYGCTG	343

1. การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่างปัสสาวะ

(DNA Preparation *Leptospira interrogans* from Urine)

1.1 เขย่ากระบอกปัสสาวะที่มีปัสสาวะ นานประมาณ 3 นาที แล้วใช้ Single autopipette ดูดปัสสาวะปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Centrifuge tube

1.2 ใช้ Single autopipette ดูดน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน Centrifuge tube ที่มีปัสสาวะ

1.3 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบ / นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.4 เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย 1 mM EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

1.5 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบ / นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.6 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

1.7 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบ / นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.8 เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมสารละลาย 1 M TE ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

1.9 ต้มหลอดตัวอย่างในน้ำเดือด นาน 10 นาที

2. การทำ Polymerase Chain Reaction

2.1 เตรียม PCR reaction mixture ที่ปริมาตร 180 ไมโครลิตร

โดยใช้ Single autopipette ดูด

- น้ำกลั่น	123	ไมโครลิตร
- 25 mM แมกนีเซียมคลอไรด์	20	ไมโครลิตร
- 10 X PCR buffer	20	ไมโครลิตร
- 5 mM dNTPs	8	ไมโครลิตร
- 10 mM Primer Lepto F	4	ไมโครลิตร
- 10 mM Primer Lepto R	4	ไมโครลิตร
- Tag DNA polymerase (50 units)	1	ไมโครลิตร

เตรียมสำหรับหลาย ๆ reactions ในหลอดเดียวกันเป็น master mix ก่อนแล้วจึงแบ่งใส่ Microcentrifuge tube ที่ labeled ไว้เรียบร้อยแล้วหลอดละ 18 ไมโครลิตร

2.2 เติมดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากปัสสาวะปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงไปใน Microcentrifuge tube นำทั้งหมดผสมให้เข้ากันโดยใช้ Single sutopipette ดูดขึ้นลงหลายครั้ง

หมายเหตุ - ทำตัวควบคุมชนิดบวก และตัวควบคุมชนิดลบ

- ในวิธีที่กล่าวมานั้นระหว่างที่กระทำในทุกขั้นตอน มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

2.3 นำไปเข้าในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งได้ตั้งอุณหภูมิและเวลาการทำงานไว้ดังนี้

Denaturation	94	องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
Primer annealing	58	องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที
Primer extension	72	องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที

จำนวน 30 รอบ

รอบสุดท้ายจะคงอุณหภูมิอยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ปฏิกริยา extension สมบูรณ์ขึ้น แล้วหยุดปฏิกริยาด้วยการลดอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส

3. การตรวจวิเคราะห์ PCR product

3.1 ใช้ Microflat plate 1 plate สามารถทำได้หลายตัวอย่างพร้อมทั้ง positive และ negative control ตามแถวแนวนอน

3.2 ใช้ Single autopipette ดูด PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ใส่ใน Microflat plate

3.3 ใช้ Single autopipette ดูด Gel Loading Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ใน Microflat plate ด้วย

3.4 ในหลุมแรกของ Microflat plate ใช้ Single autopipette ดูด DNA ladder 2 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็น Marker

3.5 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Single autopipette ดูดขึ้นลงหลายครั้ง

3.6 วาง 0.8 % agarose gel ที่เตรียมไว้แล้วลงใน electrophoresis chamber จากนั้นเท 1 × TBE Buffer ให้ท่วม gel โดยร่อง gel ที่ใส่ PCR product จะอยู่ทางขั้วลบ

3.7 ใช้ Single autopipette ดูดสารละลายใน Microflat plate 9 ไมโครลิตร ใส่ลงในร่อง comb ของ 0.8 % agarose gel

3.8 เปิดเครื่องที่กระแสไฟขนาด 100โวลท์ นาน 40 นาที สังเกตสีของ Gel Loading Buffer ว่าเคลื่อนมาทางปลายด้านขั้วบวก

3.9 ตัก gel ออกจาก chamber นำไปส่องดู specific band ด้วย UV Transilluminator และบันทึกภาพโพลารอยด์ เก็บไว้เป็นหลักฐาน

การอ่านผล : ผลบวกคือพบ specific band ที่ 343 bp เปรียบเทียบขนาดกับ DNA size marker

ผลลบคือไม่พบ specific band ที่ 343 bp เปรียบเทียบขนาดกับ DNA size marker[44]

3.5.3.4 การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

โดยหลักการของการเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะ ควรนำปัสสาวะทำ ten-fold serial dilutions อย่างน้อย 3 dilutions ในสารละลาย Phosphate Buffer Saline แล้วเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งเหลว (semisolid media) แต่ในทางปฏิบัติเมื่ออยู่ในภาคสนามนั้น การดำเนินงานดังกล่าวมีความไม่สะดวกในทางปฏิบัติอยู่มาก ดังนั้นหากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ทันที จึงเก็บปัสสาวะไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวก่อน (transport medium) แล้วรีบส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด ก็จะมีโอกาสเพาะแยกเชื้อได้มากเช่นกัน

ดังนั้น หลังจากเก็บวัสดุตัวอย่างปัสสาวะของโคและกระบือด้วยกระบอกเก็บปัสสาวะแล้ว ได้รีบดำเนินการเก็บลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Fletcher liquid medium) ทันที โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การนำปัสสาวะเก็บลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

1.1 ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 2 มิลลิลิตร ดูดปัสสาวะแล้วหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวทันทีจำนวน 3 หลอด หลอดที่หนึ่งหยดน้ำปัสสาวะ 1 หยด หลอดที่สองหยดน้ำปัสสาวะ 2 หยด และ 3 หยด ในหลอดที่สาม

1.2 ปิดหลอดฝาเกลียวใส่ถุงดำคลุมให้มีลักษณะเป็นห้องมืด แล้วรีบจัดส่งทางห้องปฏิบัติการให้เร็วที่สุด เพื่อนำไปเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

2. การนำวัสดุตัวอย่างปัสสาวะเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (Fletcher semisolid medium)

2.1 นำวัสดุตัวอย่างปัสสาวะซึ่งมีปัสสาวะอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวมาปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 เทส่วนใสทิ้งนำตะกอนเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง

2.3จากนั้นจึงนำไปบ่มเพาะในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ28-30องศาเซลเซียส

2.4ตรวจดูเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

การอ่านผล : ผลบวก คืออาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปราเกิดขึ้น กระจายอยู่บริเวณใกล้ผิวหน้าของอาหาร และพบเป็นแถบวงกลม (Dinger's Ring) อยู่ในระดับต่ำลงมาจากผิวหน้าเล็กน้อย เมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด จะพบเชื้อเลปโตสไปราเป็นเส้นเล็ก ๆ เคลื่อนไหวรวดเร็ว ย้อมด้วยสี giemsa ติดสีกรัมลบ (น้ำเงิน) และเมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะเห็นรูปร่างเกลียวชัดเจน และมีลักษณะโค้งงอคล้ายตะขอที่ปลายข้างใดข้างหนึ่ง หรือทั้ง 2 ข้าง

ผลลบ คือไม่พบการเจริญเติบโต หรือการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ทั้งสิ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนับตั้งแต่วันเริ่มเพาะแยกเชื้อจนถึงสัปดาห์ที่ 12[8]

2.5.3.5 การตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา ที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะของโคและกระบือ

ในกรณีที่ตรวจพบว่ามีการเจริญของเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จะทำการเก็บเชื้อเลปโตสไปราจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว 5 มิลลิลิตร แล้วเติมกลีเซอรอล (glycerol) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็น 10% กลีเซอรอล แล้วแบ่งใส่หลอดแช่แข็ง (cryotube) หลอดละ 1 – 2 มิลลิลิตร เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว สำหรับส่งเชื้อที่เพาะแยกได้นี้ทำการจำแนกชนิดยืนยันที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในต่างประเทศ

Royal Tropical Institute , Department of Biomedical Research

WHO/FAO collaborating Center for Reference on Leptospirosis.

Meilbergdreef39

1105 AZ Amsterdam

The Netherlands[8]

3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.6.1 ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา ซึ่งจะมีทั้ง

3.6.1.1 ข้อมูลเชิงคุณภาพ

ผลการตรวจวินิจฉัยที่ได้จากการนับจำนวนสัตว์ที่ให้ผลบวก หรือผลลบ ซึ่งจะมีค่าเป็นจำนวนเต็ม และหลังจากที่รวบรวม ตรวจสอบข้อมูลเป็นที่เรียบร้อยแล้ว จะนำมาสรุปวิเคราะห์โดยใช้ อัตราส่วน (ratio) สัดส่วน (proportion) ร้อยละ (percentage) แล้วนำเสนอข้อมูลด้วยตาราง

3.6.1.2 ข้อมูลเชิงปริมาณ

ค่าไตเตอร์ซึ่งเป็นค่าต่อเนื่อง จะนำมาสรุปวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำมาประมาณค่า เพื่อหาช่วงระยะระดับความเชื่อมั่น 95 % ค่าเฉลี่ยของประชากร แล้วนำเสนอข้อมูลด้วยตาราง

3.6.2 ข้อมูลสถิติเชิงวิเคราะห์

3.6.2.1 วิเคราะห์หาความชุกสัมพัทธ์ (prevalent ratio) เปรียบเทียบเพศ ชนิดสัตว์ กลุ่มอายุ ประวัติตายแรกคลอดหรือแท้งในสัตว์เพศเมีย กับการตรวจพบภูมิคุ้มกัน หรือการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะของสัตว์

3.6.2.2 คาดประมาณช่วงของความชุกสัมพันธ์ โดยใช้ 95 % confidence interval

3.6.2.3 ทดสอบสมมติฐานความแตกต่างของสัดส่วนความชุกโดย X^2 – test หรือ Fisher's exact test ที่ระดับ $\alpha = 0.05$ แบบสองทาง

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การศึกษานี้ได้ศึกษาตัวอย่างโค และ กระบือทุกตัว ที่มีประวัติการเลี้ยงอยู่รอบ ๆ บริเวณหนองน้ำที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ซึ่งมีโค จำนวน 20 ตัว กระบือจำนวน 36 ตัว รวมเป็น 56 ตัว เพศผู้ 13 ตัว เพศเมีย 43 ตัว สัตว์ที่มีอายุน้อยที่สุด 1 ปี มากที่สุด 15 ปี (มัธยฐานเท่ากับ 4 ปี) สัตว์เพศเมียที่มีประวัติการตายแรกคลอดหรือแท้งในช่วง 2 ปี มีจำนวน 10 ตัว (ร้อยละ 23.3) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ลักษณะทั่วไปของโคและกระบือในการศึกษา

ลักษณะทั่วไป	โค	กระบือ	รวมจำนวนโคและกระบือ
จำนวน (ตัว)	20	36	56
เพศ			
- ตัวผู้ (ตัว)	4 (20%)	9 (25%)	13 (23.2%)
- ตัวเมีย (ตัว)	16 (80%)	27 (75%)	43 (76.8%)
อายุ (ปี)			
- พิสัย	2 – 8	1 – 15	1 – 15
- ค่ามัธยฐาน	4	4	4
ประวัติการตายแรกคลอด การแท้งในช่วง 2 ปี (วิเคราะห์เฉพาะเพศเมีย)			
- มีประวัติ	5 (31.3%)	5 (18.5%)	10 (23.3%)
- ไม่มีประวัติ	11 (68.8%)	22 (81.5%)	33 (76.7%)

4.1 ผลการศึกษาระดับไตเตอร์ของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในซีรั่มของโคและกระบือโดยวิธี MAT

การตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MAT พบว่า มีโค กระบือที่ให้ผลบวกต่อการตรวจจำนวน 16 ตัว คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 28.6 สัตว์บางตัวมีการติดเชื้อมากกว่า 1 ชนิด (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราในโค กระบือด้วยวิธี MAT

จำนวนของเชื้อเลปโตสไปรา ที่ตรวจพบ ในสัตว์ 1 ตัว	จำนวนสัตว์ที่ตรวจพบ (ตัว)	ร้อยละ
ตรวจไม่พบ	40	71.4
ตรวจพบ 1 ชนิด	13	23.2
ตรวจพบ 2 ชนิด	2	3.6
ตรวจพบ 3 ชนิด	1	1.8
รวม	56	100.0

เมื่อพิจารณาระดับไตเตอร์สูงสุดในสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจโดยวิธี MAT ซึ่งดูการเกิดปฏิกริยาการจับกลุ่ม (รูปที่ 2 และรูปที่ 3) พบว่า ระดับไตเตอร์ อยู่ระหว่าง 1 : 20 ถึง 1 : 80 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 จำนวนสัตว์จำแนกตามระดับไตเตอร์สูงสุดที่ตรวจพบโดยวิธี MAT

ระดับไตเตอร์ที่ตรวจพบ	จำนวนสัตว์ที่ตรวจพบ (ตัว)	ร้อยละ
1 : 20	9	56.3
1 : 40	4	25.0
1 : 80	3	18.8
รวม	16	100.0

ในการศึกษานี้ ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 7 ชนิด ชนิดที่พบว่า โคกระบือมีการติดเชื้อมากสุดคือเชื้อ tarassovi (ร้อยละ 56.25) รองลงมาคือ sejroe (ร้อยละ 37.5) ส่วนที่เหลือได้แก่ ballum , pomona , Akiyami A , CH11 และ copenhageni (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 จำนวนสัตว์จำแนกตามชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา ที่ตรวจพบจากการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน โดยวิธี MAT

ชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา	จำนวนสัตว์ที่ตรวจพบ (ตัว)	ร้อยละ
L. borgpetersenii **serovar tarassovi**	9	56.25
L. borgpetersenii **serovar sejroe**	6	37.50
L. borgpetersenii **serovar ballum**	1	6.25
L. interrogans **serovar pomona**	1	6.25
L.interrogans **serovar autumnalis strain Akiyami A**	1	6.25
Leptospira biflexa **serovar andaman strain CH11**	1	6.25
L. interrogans **serovar copenhageni**	1	6.25

เมื่อศึกษาว่าปัจจัยใดที่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบภูมิคุ้มกันในสัตว์ พบว่า ชนิดของสัตว์ เพศ และประวัติการตายแรกคลอดหรือแท้ง ไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบภูมิคุ้มกัน แต่พบว่ากลุ่มอายุมีความสัมพันธ์ คือ กลุ่มอายุน้อยจะตรวจไม่พบระดับภูมิคุ้มกัน ในขณะที่กลุ่มอายุกลางตรวจพบได้มากขึ้น และลดลงในกลุ่มอายุมาก (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ต่อการตรวจพบภูมิคุ้มกันในสัตว์

ตัวแปร	ตรวจพบ	ตรวจไม่พบ	Prevalent ratio	95 % CI	p-value
ชนิดสัตว์					0.895 #
- โค	5 (25.0%)	15 (75.0%)	0.82	0.33 – 2.02	
- กระบือ	11 (30.6%)	25 (69.4%)	Ref.		
เพศ					> 0.999 **
- ตัวผู้	4 (30.8%)	9 (69.2%)	1.10	0.43 – 2.84	
- ตัวเมีย	12 (27.9%)	31 (72.1%)	Ref.		
กลุ่มอายุ			-	-	0.022 #
- <2 ปี	0 (0.0%)	8 (100.0%)			
- 3 ถึง 5 ปี	13 (43.3%)	17 (56.7%)			
- >5 ปี	3 (16.7%)	15 (83.3%)			
ประวัติการตายแรกคลอด /แท้งในช่วง 2 ปี (วิเคราะห์เฉพาะเพศเมีย)					0.237 **
- มีประวัติ	1 (10.0%)	9 (90.0%)	0.30	0.04 – 2.05	
- ไม่มีประวัติ	11 (33.3%)	22 (66.7%)	Ref.		

Chi-squares p-value

** Fisher exact p-value

4.2 ผลการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของ โคและกระบือโดยเทคนิค PCR

ความไวของผลการตรวจโดยเทคนิค PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจำนวนเชื้อเลปโตสไปราที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถตรวจพบคือ เชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคจำนวน 20 เซลล์ ในปัสสาวะของโค กระบือ 1 มิลลิลิตร (รูปที่ 4) ส่วนผลการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะของโคและกระบือ ให้ผลบวก 9 ตัวอย่าง คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 16.1 (รูปที่ 5)

หมายเหตุ :

จากการตรวจความเป็นกรด – ด่างของปัสสาวะ พบว่าปัสสาวะของโคมีค่าความเป็นกรด – ด่าง อยู่ระหว่าง 6.8 -8.3 (ค่าเฉลี่ย 7.8) ปัสสาวะของกระบือมีค่าความเป็นกรด – ด่าง อยู่ระหว่าง 7.2 –8.0 (ค่าเฉลี่ย 7.8)

เมื่อศึกษาว่าปัจจัยใดที่มีความสัมพันธ์กับปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะสัตว์ โดยจัดให้สัตว์ที่ผลบวกต่อการตรวจ PCR เป็นสัตว์ที่มีการปล่อยเชื้อ ส่วนสัตว์ที่มีผลลบต่อการตรวจ PCR เป็นสัตว์ที่ไม่มีการปล่อยเชื้อ พบว่า โคมีความชุกของการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะเป็น 6.3 เท่าเมื่อเทียบกับกระบือ (95% confidence interval เท่ากับ 1.44 ถึง 27.49) ส่วนเพศไม่มีความสัมพันธ์กับการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์ที่เคยมีประวัติตายแรกคลอดหรือแท้งมีความชุกของการปล่อยเชื้อในปัสสาวะเป็น 4.40 เท่าเมื่อเทียบกับสัตว์ที่ไม่มีประวัติดังกล่าว (95% confidence interval เท่ากับ 1.18 ถึง 16.46) สำหรับปัจจัยด้านอายุพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆต่อการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะ

ตัวแปร	ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	Prevalent ratio	95 % CI	p-value
ชนิดสัตว์					0.007 #
- โค	7 (35.0%)	13 (65.0%)	6.30	1.44 – 27.49	
- กระบือ	2 (5.6%)	34 (94.4%)	Ref.		
เพศ					> 0.999 **
- ตัวผู้	2 (15.4%)	11 (84.6%)	0.95	0.22 – 4.00	
- ตัวเมีย	7 (16.3%)	36 (83.7%)	Ref.		
กลุ่มอายุ			-	-	0.688 #
- <2 ปี	1 (12.5%)	7 (87.5%)			
- 3 ถึง 5 ปี	4 (13.3%)	26 (86.7%)			
- >5 ปี	4 (22.2%)	14 (77.8%)			
ประวัติการตายแรกคลอด /แท้งในช่วง 2 ปี (วิเคราะห์เฉพาะเพศเมีย)					0.040 **
- มีประวัติ	4 (40.0%)	6 (60.0%)	4.40	1.18 – 16.46	
- ไม่มีประวัติ	3 (9.1%)	30 (90.9%)	Ref.		

Chi-squares p-value

** Fisher exact p-value

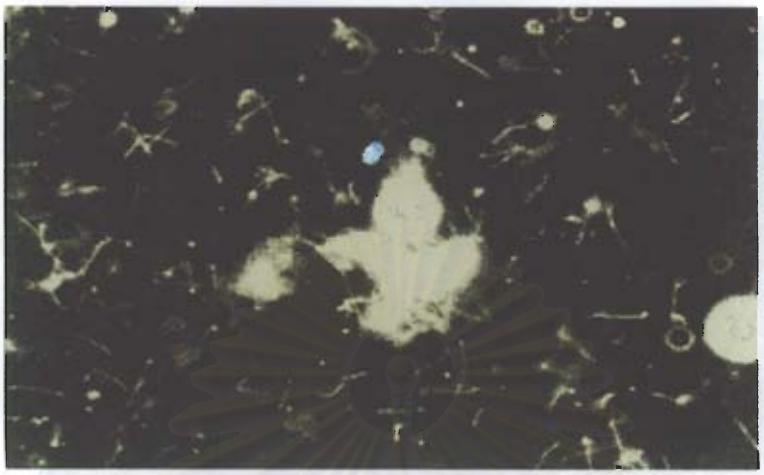
4.3 ผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคและกระบือ

จากการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของโคจำนวน 20 ตัว กระบือจำนวน 36 ตัว สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราใน โคเพศเมีย อายุ 3 ปี ซึ่งเคยมีประวัติการแท้ง จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยตรวจพบในอาทิตย์ที่ 10 ของการเพาะเชื้อ และกระบือเพศผู้ อายุ 3 ปี จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยตรวจพบในอาทิตย์ที่ 9 ของการเพาะเชื้อ ในหลอดที่มีการหยดปัสสาวะ 2 หยด ทั้ง 2 ตัวอย่าง (รูปที่ 6 และรูปที่ 7) ซึ่งโคและกระบือ ทั้ง 2 ตัวนี้ ได้ตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะโดยเทคนิค PCR ด้วยเช่นกัน

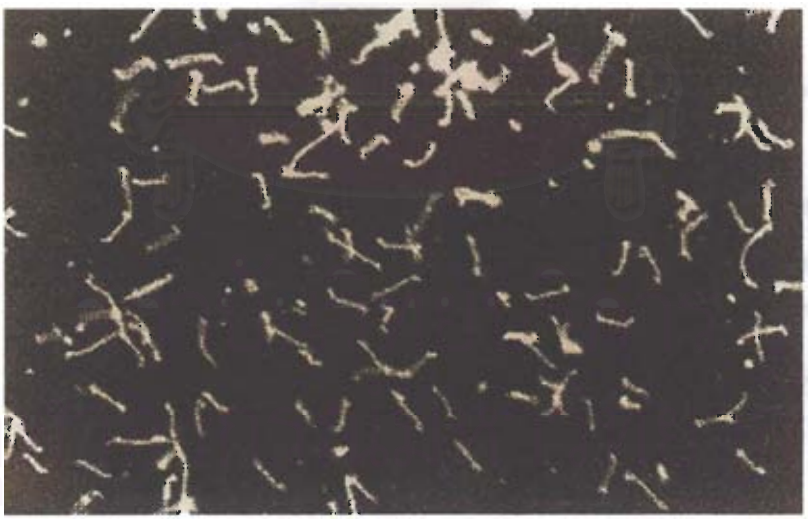
เป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 3 นั้นมี 17 ตัวอย่าง จาก 56 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.35) ที่พบแถบวงกลม อยู่ในระดับต่ำลงมาจากผิวหน้าเล็กน้อยของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดพบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นอยู่เป็นจำนวนมาก

4.4 ผลการตรวจสอบชนิดสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราที่ได้จากการเพาะแยกเชื้อในปัสสาวะของโคและกระบือ

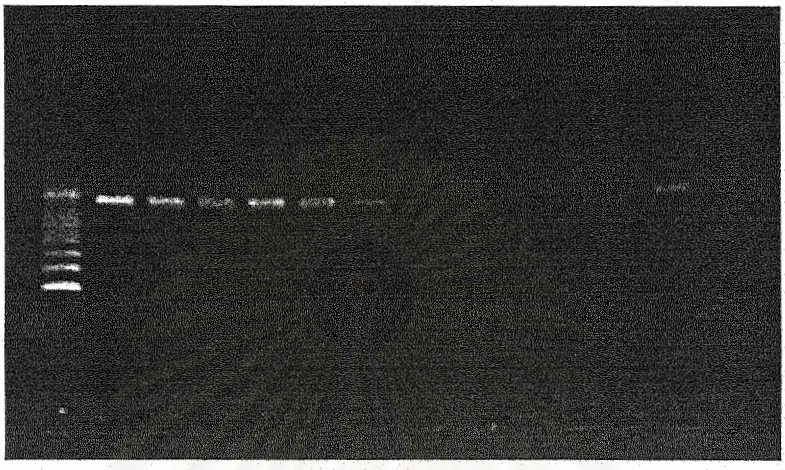
จากนั้นได้ส่งไปตรวจสอบยืนยันที่ห้องปฏิบัติการอ้างอิงในต่างประเทศที่ Royal Tropical Institute , Department of Biomedical Research WHO/FAO collaborating Center for Reference on Leptospirosis ณ ประเทศเนเธอแลนด์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ ด้วยวิธี agglutination with monoclonal antibodies และวิธี one – sided cross – absorption of antisera ผลพบว่าในโคตรวจพบเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar sejroe ส่วนในกระบือตรวจพบเชื้อ *L. interrogans* serovar bratislava



รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราของซีรั่ม
ที่ระดับไตเตอร์ 1:80 โดยวิธี MAT



รูปที่ 3 การไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี MAT



Lane M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 + -

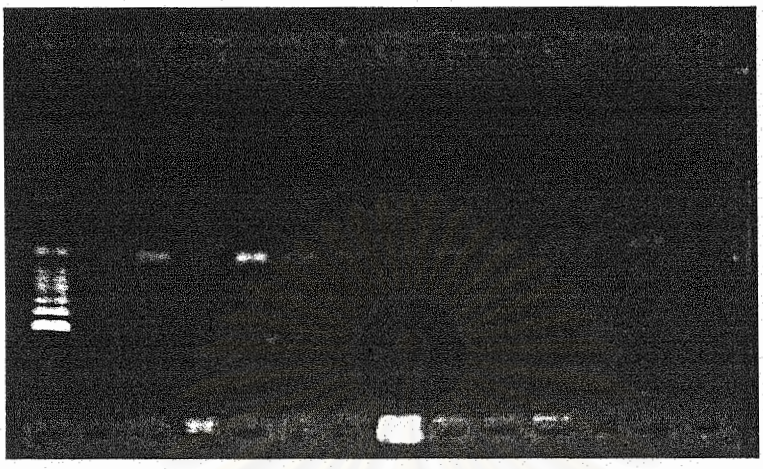
รูปที่ 4 ผลการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ATCC 43642 ในปัสสาวะ โดยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิสภายใต้แสง Ultra Violet

Lane M คือ DNA ladder เริ่มจากล่างไปบน ขนาด 100 ,200 ,300 ,400 ,500 ,600 ,.....2072 bp ตามลำดับ

Lane 1 ถึง 11 คือ ผลการตรวจหาเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ATCC 43642 ด้วยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิส ซึ่งมีขนาดของ PCR product เป็น 343 bp โดยทำ ten-fold serial dilutions มีเชื้อเลปโตสไปรา 2×10^{8}, 2×10^{7} , 2×10^{6}, 2×10^{5}, 2×10^{4}, 2×10^{3}, 2×10^{2}, 20, 2, 0.2, 0.02 เซลล์ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร โดยเรียงจากซ้ายไปขวา

Lane + คือ ตัวควบคุมชนิดบวก

Lane- คือ ตัวควบคุมชนิดลบ



Lane M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 + -

รูปที่ 5 ผลการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะ โดยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิส ภายใต้แสง Ultra Violet

Lane M คือ DNA ladder เริ่มจากล่างไปบน ขนาด 100 ,200 ,300 ,400 ,500, 600 ,.....2072 bp ตามลำดับ

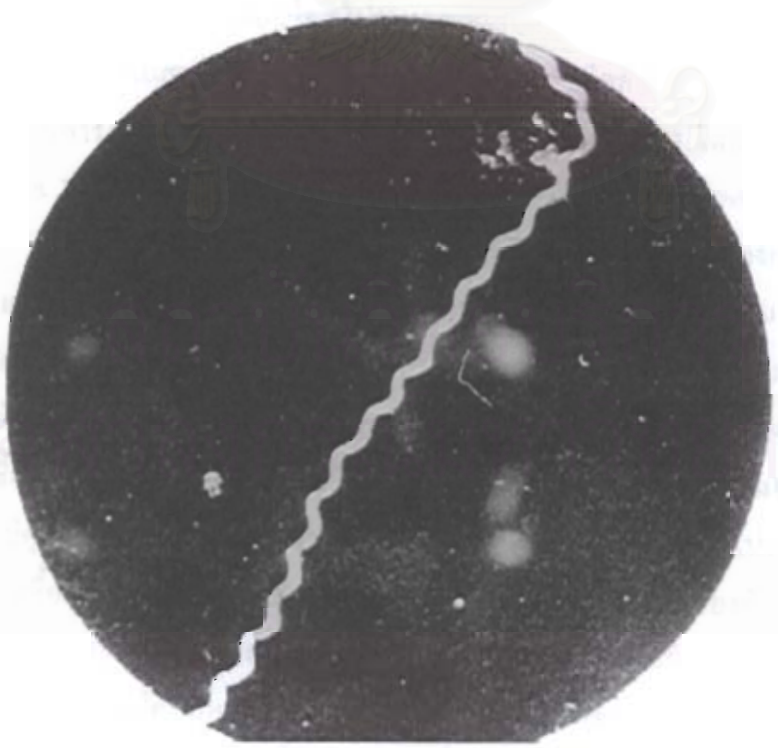
Lane 1 ถึง 9 คือ ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคด้วยเทคนิค PCR ผ่านทางอิเล็กโตโฟเรซิส ซึ่งมีขนาดของ PCR product เป็น 343 bp

Lane + คือ ตัวควบคุมชนิดบวก

Lane - คือ ตัวควบคุมชนิดลบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด



รูปที่ 7 เชื้อเลปโตสไปราดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 15,000 เท่า

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

จากการทบทวนวรรณกรรมจึงทำให้ทราบว่า การสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสในโคและกระบือ ไม่ควรใช้ข้อมูลเกี่ยวกับอาการป่วยของสัตว์แต่เพียงอย่างเดียว แต่ควรใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการหลายวิธีด้วยกัน ทั้งการตรวจทางซีโรโลยี และการตรวจหาเชื้อในปัสสาวะ โดยร่วมกับการสังเกตสภาพแวดล้อมบริเวณที่เลี้ยงสัตว์ ถึงจะทำให้ทราบได้ว่าสัตว์เหล่านั้นสามารถเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของการเกิดโรคในคนได้หรือไม่ เนื่องจากโค กระบือที่ติดเชื้อเลปโตสไปราส่วนใหญ่มักจะไม่แสดงอาการป่วยใด ๆ อาจจะมีการแท้งเกิดขึ้นบ้างในช่วง 3 เดือนสุดท้ายของระยะตั้งครรภ์ แต่สิ่งที่สำคัญคือภายหลังการติดเชื้อ สัตว์เหล่านี้สามารถขับเชื้อออกมากับปัสสาวะ แล้วกลายเป็นแหล่งรังโรคทั้งในคนและสัตว์ [19]

จากตารางที่ 6 และตารางที่ 7 ผลการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน ด้วยวิธี MAT หรือการตรวจดูความชุกทางซีโรโลยีต่อการติดเชื้อเลปโตสไปรา พบว่าจำนวนของโคและกระบือ ประมาณ 1 ใน 4 ส่วน เคยมีการติดเชื้อเลปโตสไปรา และในจำนวนนี้มีสัตว์บางตัวติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่า 1 ชนิด โดยปกติแล้วร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดเท่านั้น ดังนั้นในพื้นที่ใดที่มีเชื้อเลปโตสไปราหลายชนิดปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม สัตว์ที่อยู่ในบริเวณนั้นก็จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อหลาย ๆ ชนิดด้วยเช่นกัน นอกจากนั้นยังพบว่าสัตว์ส่วนใหญ่มีการตอบสนองต่อการสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราที่ระดับไตเตอร์ค่อนข้างต่ำ คือ 1:20 และสูงสุดที่ระดับไตเตอร์ 1:80 เท่านั้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น ๆ [46], [47] ที่เกี่ยวข้องกับการลดลงของระดับภูมิคุ้มกัน ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละตัว ดังเช่น เคยมีรายงานว่าภายหลังการติดเชื้อ 20 สัปดาห์ สัตว์บางตัวจะไม่สามารถตรวจพบระดับภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อได้ แต่ในขณะที่สัตว์บางตัวยังสามารถตรวจพบที่ระดับภูมิคุ้มกันที่มีค่าไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1:100 ได้เป็นเวลายาวนานกว่า 1 ปี ขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายของสัตว์ และขนาดของเชื้อเลปโตสไปราที่สัตว์ได้รับเข้าไป[48] ถ้าสัตว์ได้รับเชื้อในปริมาณน้อยก็จะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระดับต่ำ มักมีสาเหตุมาจากการที่สัตว์ติดเชื้อเลปโตสไปราโดยทางอ้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อเลปโตสไปราจากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อ[47]

จากข้อมูลสนับสนุนดังที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการสังเกตุสภาพการเลี้ยงโค กระบือที่มีหลายเจ้าของ พบว่ามีการผสมพันธุ์แบบเลือดชิดภายในฝูง และเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งรอบ ๆ บริเวณหนองน้ำขนาดใหญ่ ซึ่งในบริเวณนั้นจะมีปลัก ประมาณ 2-3 ปลักอยู่รอบ ๆ บริเวณ จึงอาจกล่าวได้ว่าในพื้นที่บริเวณหนองน้ำ มีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปรา

หลายชนิดด้วยกัน และจากตารางที่ 8 ซึ่งแสดงชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจด้วยวิธี MAT พบเชื้อ tarassovi ในสัดส่วนที่มาก รองลงมาคือเชื้อ sejroe ซึ่งมีความแตกต่างกันกับผลการสำรวจในโค กระบือของพื้นที่อื่น ๆ ที่มักพบว่าโค กระบือมีความชุกทางซีโรโลยีต่อเชื้อ hardjobovis สูงมากกว่าเชื้อเลปโตสไปราชนิดอื่น[3] , [40] , [45] , [49] , [50] ความแตกต่างนี้สามารถเกิดขึ้นได้ขึ้นกับสภาพทางภูมิศาสตร์ หรือมีสัตว์หลายชนิดอยู่ร่วมกันในระบบนิเวศน์ทำให้มีการถ่ายทอดเชื้อแลกเปลี่ยน เป็นผลให้ความชุกของการติดเชื้อในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันไป[49] แต่อย่างไรก็ตามเชื้อเลปโตสไปราก็ยังมีความสัมพันธ์อย่างค่อนข้างจำเพาะเจาะจงกับสัตว์แต่ละชนิด ทำให้สัตว์ชนิดนั้นจะมีความไวสูงต่อการติดเชื้อ ดังจะเห็นได้ว่าในการสำรวจครั้งใด หรือพื้นที่ใดก็ตาม โค กระบือจะมีความชุกของเชื้อ serogroup Sejroe ในสัดส่วนที่ค่อนข้างสูงมาก ดังนั้นโค กระบือที่สำรวจในการศึกษาครั้งนี้ ก็มีความไวต่อการติดเชื้อ serogroup Sejroe สูงด้วยเช่นกัน

ตัวแปรที่นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ดังตารางที่ 9 พบว่า ชนิดของสัตว์ เพศ ไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบระดับภูมิคุ้มกัน เนื่องมาจากสภาพของการเลี้ยงดูในโค กระบือ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่มีความแตกต่างกันแต่ประการใดที่มีการเลี้ยงปะปนกันอยู่ทั่วบริเวณ ในด้านของตัวแปรประวัติการตายแรกคลอดหรือแท้งของสัตว์เพศเมียในช่วง 2 ปี ที่พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันเช่นเดียวกันนั้น ทั้งที่ผลการตรวจด้วยวิธี MAT พบเชื้อ tarassovi และ sejroe ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ให้ฝูงสัตว์เกิดการแท้งในช่วงระยะท้ายของการตั้งครรภ์ หรือมีปัญหาลูกสัตว์ตายแรกคลอดในหลายประเทศ[12] แต่เนื่องมาจากสภาพการเลี้ยงโค กระบือที่เลี้ยงแบบชาวบ้านทั่วไปในประเทศไทยนั้น จะปล่อยให้สัตว์ผสมพันธุ์กันเองภายในฝูง ทำให้ช่วงระยะเวลาตั้งครรภ์ของสัตว์ในกลุ่มที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เกิดขึ้นไม่พร้อมกัน ถ้าสัตว์ตัวใดได้รับเชื้อเลปโตสไปราเข้าไปในช่วงระยะท้ายของการตั้งครรภ์ สัตว์ตัวนั้นก็อาจจะแท้งลูกเนื่องมาจากการติดเชื้อ แต่ถ้าสัตว์ตัวใดได้รับเชื้อเลปโตสไปราเข้าไปในช่วงระยะต้น หรือระยะกลางของการตั้งครรภ์ โอกาสที่สัตว์ตัวนั้นจะแท้งจากการติดเชื้อจะมีน้อยมาก รวมทั้งสัตว์ที่ได้รับเชื้อก่อนการตั้งครรภ์ หรือสัตว์ที่ได้รับเชื้อหลังจากการคลอดลูกแล้วก็จะไม่แท้งจากการติดเชื้อเลปโตสไปราเช่นกัน ซึ่งการตรวจระดับภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MAT เป็นการตรวจว่าสัตว์เคยมีการติดเชื้อเลปโตสไปรา แต่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่าสัตว์ตัวนั้น ๆ เคยได้รับเชื้อมานานมากน้อยเพียงใด ดังนั้นการตรวจสอบสัตว์ที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อโดยการตรวจระดับภูมิคุ้มกัน จึงไม่มีความสัมพันธ์กันแต่อย่างใดกับประวัติการแท้งของสัตว์ นอกจากนั้นแล้วการเลี้ยงสัตว์ในลักษณะที่กล่าวมานั้นของประเทศไทยจึงไม่ค่อยพบการแท้งในฝูงสัตว์คราวละมาก ๆ ดังเช่นในต่างประเทศ

ในขณะที่กลุ่มอายุมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เนื่องจากสัตว์กลุ่มอายุในวัยก่อนผสมพันธุ์ (น้อยกว่า 2 ปี) จะมีพฤติกรรมต่อไปนี้ ได้แก่ การผสมพันธุ์ การหาอาหาร การ

ทำงาน น้อยกว่าในสัตว์กลุ่มอายุ 3-15 ปี ทำให้มีโอกาสในการสัมผัสเชื้อได้น้อยกว่า[51], [52] ซึ่งเห็นได้ชัดจากผลการศึกษา ที่พบว่าเมื่อสัตว์เริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (3-5 ปี) จะมีสัดส่วนของการพบเชื้อสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นพฤติกรรมของสัตว์จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอายุ ส่วนการที่สัตว์ในกลุ่มอายุมากกว่า 5 ปีขึ้นไป มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในระดับที่ต่ำ เนื่องจากการที่พื้นที่แห่งนี้มีเชื้อเลปโตสไปราปนเปื้อนอยู่ในระบบนิเวศน์อย่างต่อเนื่อง ทำให้โค กระบือที่เคยได้รับเชื้อมาแล้วในช่วงเริ่มวัยเจริญพันธุ์ หรือเริ่มมีการผสมพันธุ์ และพฤติกรรมเหล่านี้ยังไม่เปลี่ยนแปลง จึงยังจะได้รับเชื้อเลปโตสไปราอย่างต่อเนื่อง และถ้าเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่เคยได้รับมาแล้วในอดีต ก็จะไม่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมากนัก หรืออาจจะอยู่ในระดับต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบ ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ เช่นการศึกษาในปี พ.ศ. 2523 ของกลุ่มประชากรสุนัข ประเทศเปอร์โตริโก[53] ในปี พ.ศ.2527 ของกลุ่มประชากรสุนัข และโคนม กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย[54] ในปี พ.ศ.2530 ของกลุ่มประชากรกระบือ ประเทศอิตาลี[27] เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันแต่เพียงอย่างเดียว ยังไม่ใช่วิธีที่จะแสดงได้อย่างชัดเจนถึงสภาพการติดเชื้อเลปโตสไปราในฝูงสัตว์ เพราะการที่สัตว์มีผลบวกทางซีโรโลยี แสดงได้เพียงว่าสัตว์ตัวนั้นเคยมีการติดเชื้อ แต่มิได้หมายความว่าสัตว์ตัวนั้นกำลังติดเชื้อ หรือสัตว์ที่มีผลลบก็มิได้แสดงว่าสัตว์ตัวนั้นไม่เคยมีการติดเชื้อ สิ่งเหล่านี้ยังไม่เพียงพอสำหรับการตรวจสอบสภาพว่าสัตว์ในฝูงนั้นเป็นแหล่งรังโรคที่จะปล่อยเชื้อสู่สิ่งแวดล้อม จำเป็นที่ต้องตรวจสอบเชื้อในปัสสาวะของสัตว์ด้วย

วิธี PCR เป็นวิธีที่วินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสที่มีประสิทธิภาพ เพื่อแก้ปัญหาบางอย่างอันเนื่องมาจากวิธีการเพาะแยกเชื้อ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ โดยการตรวจ 16S (rRNA) gene จากผลการศึกษาพบว่า โคมีความชุกของการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะมากกว่ากระบือ ถึงแม้ว่ากระบือจะมีความไวของการติดเชื้อใกล้เคียงกับโค แต่กระบืออาจจะเป็นสัตว์ที่ปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะได้ไม่ดีเท่ากับโค เช่นใน พ.ศ.2530 ที่ประเทศอิตาลีมีการศึกษาอาการทางคลินิคและความชุกของการติดเชื้อเลปโตสไปโรสิสในกระบือ โดยสุ่มตัวอย่างกระบือในพื้นที่ราบใกล้แม่น้ำซึ่งมีประชากรกระบือประมาณ 20,000 ตัว ได้จำนวนตัวอย่างกระบือทั้งหมด 2,162 ตัว และทำการตรวจทางซีโรโลยีด้วยวิธี MAT และเพาะเชื้อจากปัสสาวะ พบว่าในกระบือฝูงนี้มีความชุกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราซีโรกรุป *Sejroe* ถึงร้อยละ 55 ตั้งแต่ระดับไตเตอร์ที่ 1:50 ขึ้นไปแต่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะได้เลย [27] มีความเป็นไปได้ว่าทั้งโค และกระบือเป็นสัตว์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อ serogroup Sejroe แต่เชื้อเลปโตสไปราซีโรกรุปนี้ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับกระบือได้ดี เป็นผลให้โคโลนีของเชื้อ

เลปโตสไปราคงอยู่ในไตของกระบือเพียงช่วงเวลาที่ไม่ยาวเท่ากับโค ซึ่งเป็นข้อสันนิษฐานในเบื้องต้นเท่านั้น ควรจะมีการศึกษาที่เฉพาะเจาะจงในเรื่องนี้ อันจะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมโรคเลปโตสไปโรสิสได้อย่างตรงเป้าหมายต่อไป

จากตารางที่ 9 และตารางที่ 10 ที่พบว่าประวัติการตายแรกคลอดหรือแท้งของสัตว์เพศเมียในช่วง 2 ปี มีความสัมพันธ์กับการปล่อยเชื้อ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน หรือการที่กลุ่มอายุไม่มีความสัมพันธ์กับการปล่อยเชื้อ แต่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ก่อนที่จะอภิปรายถึงปัญหานี้ ต้องมีความเข้าใจก่อนว่าการที่สัตว์ติดเชื้อเลปโตสไปรา หมายถึง สัตว์ตัวนั้นมีการตอบสนองทางระดับภูมิคุ้มกัน แต่มิได้รวมถึงว่าสัตว์ตัวนั้นต้องมีการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราออกมาในปัสสาวะ ซึ่งทั้งสองประการนี้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างกัน สามารถอธิบายได้จากผลการศึกษาของต่างประเทศและในประเทศไทย เช่น ในปี พ.ศ. 2531 ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการสอบสวนการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน และได้สงสัยว่าสุนัขในบ้านจะเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ จึงได้มีการตรวจซีรั่มด้วยวิธี MAT และเพาะเชื้อจากปัสสาวะของทั้งในคนและสุนัข ซึ่งสุนัขทุกตัวไม่มีอาการเจ็บป่วยใด ๆ จากผลการศึกษาพบว่ามีสุนัขจำนวนหนึ่งที่ตรวจไม่พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ค่าไตเตอร์ 1:100 แต่ตรวจพบเชื้อ canicola จากปัสสาวะ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคนในครั้งนั้น[55] ในปี พ.ศ.2523 ได้มีการทดลองในนิวซีแลนด์ โดยนำเชื้อ tarassovi ฉีดเข้าในสุนัขที่สุขภาพปกติดีไม่เคยมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปรามาก่อน ผลพบว่าสุนัขไม่แสดงอาการป่วยใด ๆ และค่าไตเตอร์ที่ตรวจพบสูงสุดคือ 1:200 เท่านั้น และลดลงจนไม่สามารถตรวจได้อีกภายในระยะเวลา 5 เดือน แต่ยังสามารถตรวจพบเชื้อในปัสสาวะของสุนัขเหล่านี้ได้นานกว่า 7 เดือน[51] ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ถึงจะไม่สามารถตรวจพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและไม่พบอาการเจ็บป่วยใด ๆ แต่สุนัขยังมีการปล่อยเชื้อในปัสสาวะได้เป็นระยะเวลายาวนาน นอกจากนี้ได้มีการศึกษาในประเทศไทย เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2506 ที่ดักหนูตามเขตต่าง ๆ ในฝั่งพระนครทั้งหมด 10 เขต แล้วนำซีรั่มตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันที่ค่าไตเตอร์ 1 : 100 พร้อมกับทำการเพาะแยกเชื้อจากไตของหนู พบว่ามีหนูจำนวนหนึ่งสามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในไตแต่ไม่พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันใด ๆ[56] เช่นเดียวกับการศึกษาในสัตว์จำพวกหนูที่เกาะฮาวาย ซึ่งมีการตรวจระดับภูมิคุ้มกันที่ระดับไตเตอร์ต่ำและทำการเพาะแยกเชื้อจากไต ผลการศึกษาพบว่า ในหนูแรทและหนูไมซ์ มีผลบวกต่อการเพาะเชื้อเป็นจำนวน 2 เท่าของผลบวกทางซีโรโลยี[19] นอกจากนั้นแล้ว ยังมีการรายงานว่า สุกรที่ติดเชื้อ pomona อยู่เป็นประจำ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการปล่อยเชื้อออกมาทางปัสสาวะกับผลการตรวจทางซีโรโลยี[3]

ระดับภูมิคุ้มกันของสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคที่มีการปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะนั้น จะไม่แตกต่างกับสัตว์ที่มิใช่เป็นแหล่งรังโรค เป็นผลเนื่องมาจากความดื้นรนของเชื้อเลปโตสไปราที่จะต้องหลบจากภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อให้อยู่รอดได้ในสัตว์ โดยเชื้อจะเข้าไปอยู่ในท่อของหน่วยไต ซึ่งเป็นบริเวณที่การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถเข้าถึงได้ เชื้อเลปโตสไปราจึงยังถูกขับผ่านออกมาทางปัสสาวะได้โดยที่ไม่มีผลไปกระตุ้นให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ร่างกายของสัตว์จึงมีระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในระดับต่ำ เคยมีการศึกษาช่วงเวลาตั้งแต่โคมีการติดเชื้อเลปโตสไปราจนกระทั่งขับเชื้อออกมาทางปัสสาวะ พบว่าถ้าโคมีการติดเชื้อชนิดที่มีความจำเพาะกัน เช่น เชื้อ serogroup Sejroe จะสามารถปล่อยเชื้อออกมาในปัสสาวะได้ตั้งแต่ 1 ปี จนถึง 2 ปี[16], [19], [57], [58] แต่ในกระบือยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดเกี่ยวกับช่วงเวลาของการปล่อยเชื้อในปัสสาวะ นอกจากนั้นแล้ว serogroup Sejroe ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการแท้ง และลูกตายแรกคลอดในโค และกระบือ จากที่กล่าวมานั้นจึงเป็นเหตุผลสนับสนุนว่าโค กระบือ ที่เคยมีประวัติการตายแรกคลอดหรือแท้งของสัตว์เพศเมียในช่วง 2 ปี จึงมีความสัมพันธ์และสามารถตรวจพบเชื้อในปัสสาวะได้ ซึ่งสาเหตุของการแท้งหรือการตายแรกคลอดนั้น น่าจะเป็นผลมาจากการติดเชื้อเลปโตสไปรา โดยที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแต่อย่างใด

จากผลการเพาะเชื้อในปัสสาวะของโคที่ตรวจพบเชื้อ serogroup Sejroe ซึ่งเป็นซีโรกรุปที่พบได้เป็นประจำในโค และภายหลังที่ติดเชื้อในซีโรกรุปนี้จะทำให้โคปล่อยเชื้อเลปโตสไปราออกมาในปัสสาวะได้เป็นเวลานาน ในขณะที่กระบือตรวจพบเชื้อ serogroup Australis ชนิด bratislava ซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปราที่มีความชุกสูงในกลุ่มสุกร จากการสำรวจภายในหมู่บ้านพบว่า มีการเลี้ยงสุกรจำนวน 2 ตัว ซึ่งบ้านที่เลี้ยงสุกรนั้นอยู่ใกล้กับบ้านที่เลี้ยงกระบือ จึงมีความเป็นไปได้ว่ากระบือตัวที่พบเชื้อนี้อาจจะได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนมากับของเหลวจากคอกสุกรที่เลี้ยงภายในหมู่บ้าน กระบือตัวที่กล่าวมานั้นอาจจะได้รับเชื้อ bratislava อยู่เป็นประจำจากสุกร ทำให้เชื้อมีการพัฒนาปรับตัวได้ในร่างกายของกระบือ และเจริญอยู่ที่ไตพร้อมกับปล่อยเชื้อออกมาทางปัสสาวะ โดยมีการตอบสนองทางระดับภูมิคุ้มกันในระดับต่ำมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการสำรวจทั้งทางซีโรโลยีและการเพาะเชื้อในปัสสาวะของสุกร จึงไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดในการตอบปัญหานี้ ในความเป็นจริงนั้นมักพบการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปราระหว่างคอกสัตว์ได้ถ้าคอกสัตว์ไม่มีระบบการกำจัดของเสียอย่างถูกสุขลักษณะ เป็นผลให้ของเหลวจากคอกสัตว์ที่มีเชื้อเลปโตสไปราไหลปนเปื้อนลงสู่พื้นคอก ดินโคลน ทำให้มนุษย์หรือสัตว์อื่นได้รับเชื้อเข้าไปในร่างกาย

จากเหตุการณ์ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในกลุ่มคนงานที่ไปร่วมลอกสระหนองตาด ตำบลคูเมืองเมื่อเดือนกันยายน พ.ศ. 2542 อันเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาในครั้งนี้ พบ

ว่ามีผู้ป่วยจำนวน 115 ราย จากการตรวจซีรั่มชนิด IgM antibody ต่อเชื้อเลปโตสไปรา พบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อ sejroe มากที่สุด รองลงมาตามลำดับได้แก่ pyrogenes, Akiyami A, bratislava, bangkok, copenhageni, ballico, wolffii และgrippotyphosa รวมทั้งได้มีการศึกษาระบาดวิทยาเชิงวิเคราะห์ยืนยันได้ว่าเป็นการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสที่ผู้ป่วยได้รับเชื้อมาจากสระน้ำ ที่ร่วมกันขุดลอก[39] ซึ่งโดยปกติแล้วหนองน้ำแห่งนี้จะเต็มไปด้วยหญ้าที่ขึ้นรก มีหนูค่อนข้างชุกชุม ผู้คนทั่วไปไม่นิยมไปใช้อุปโภคหรือบริโภค ส่วนใหญ่เป็นโค กระบือที่จะลงไปกินน้ำ ปล่อยปัสสาวะด้วยเหตุผลเหล่านี้หนองน้ำที่เป็นสาเหตุของการระบาด น่าจะมีเชื้อเลปโตสไปราปนเปื้อนอยู่ในน้ำค่อนข้างมาก เนื่องจากมีสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของโรคเลปโตสไปโรสิสอาศัยและปล่อยเชื้ออยู่หลายชนิด ประกอบกับเป็นหนองน้ำที่มีลักษณะน้ำนิ่ง มีต้นไม้ปกคลุมให้ความร่มรื่นเป็นบางแห่ง ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะต่อการอยู่รอดของเชื้อเลปโตสไปรา ดังนั้นการที่ผู้คนลงไปร่วมกันขุดลอกสระ มีการแช่น้ำเป็นเวลานาน มีบาดแผลจากการทำงาน จึงทำให้เชื้อเลปโตสไปราที่มีอยู่แล้วในหนองน้ำ เข้าสู่ร่างกายทำให้เกิดการเจ็บป่วย ต่อเนื่องจากเหตุการณ์ระบาดในครั้งนั้นก็ยังมีชาวบ้านในตำบลคูเมืองที่ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสเกิดขึ้นอย่างประปราย โดยที่ผลจากการสอบสวนคาดว่าน่าจะมีแหล่งติดโรคจากหนองน้ำแห่งนี้ด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาถึงผลการตรวจทางซีโรโลยีของผู้ป่วยจะเห็นได้ว่าเชื้อ sejroe เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคในคน ประกอบกับข้อมูลของผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะในโค กระบือ ทั้งจากเทคนิค PCR ที่แสดงได้ว่าทั้งโค กระบือมีการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะจริง โดยสิ่งสำคัญคือผลการเพาะเชื้อจากปัสสาวะในโคที่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ว่าเป็นเชื้อ sejroe และจากผลการเพาะเชื้อในกระบือที่พบเชื้อ bratislava ซึ่งเชื้อนี้ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการการเกิดโรคในคน อีกทั้งจากการเก็บข้อมูลความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะในโคและกระบือที่ศึกษา พบว่าปัสสาวะของสัตว์เหล่านี้มีค่าตั้งแต่เป็นกลางจนถึงเป็นด่างอ่อน เพราะเป็นสัตว์กินพืช ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของเชื้อเลปโตสไปราในการออกจากร่างกายสัตว์มาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกในช่วงระยะเวลาหนึ่ง รวมทั้งอุปนิสัยของโค กระบือที่มักจะปล่อยปัสสาวะลงสู่แหล่งน้ำจึงทำให้เชื้อเลปโตสไปราอยู่รอดได้เป็นระยะเวลานานขึ้น และจากการที่สัตว์เหล่านี้ปล่อยปัสสาวะออกมาเป็นปริมาณมากกว่าสัตว์จำพวกหนูหลายเท่า จึงทำให้มีโอกาสที่ปล่อยเชื้อเลปโตสไปราลงสู่แหล่งน้ำได้เป็นจำนวนมากด้วยเช่นกัน เคยมีรายงานพบว่า โคสามารถปล่อยเชื้อเลปโตสไปราออกมาในปัสสาวะตั้งแต่ 10,000 ถึง 1,000,000 เซลล์ ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร[11], [19] ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าทั้งโค และกระบือน่าจะเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญในการเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญในการเกิดโรคในคน ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าสัตว์จำพวกหนู

จากข้อสังเกตของผลการศึกษาที่พบว่าในช่วงสองถึงสามสัปดาห์แรก พบลักษณะแถบวงกลม ที่เรียกว่า Dinger ' s ring เกิดขึ้นในหลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนหลายตัวอย่างด้วยกัน ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะเริ่มแรกที่จะสังเกตว่า น่าจะมีการเจริญของเชื้อเลปโตสไปราเกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เมื่อนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดในเวลาต่อมาไม่พบเชื้อเลปโตสไปรา แต่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นอยู่เป็นจำนวนมากแทน อธิบายได้ว่า Dinger ' s ring คือบริเวณที่มีความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปราอยู่เป็นจำนวนมาก จนเกิดเป็นวงแหวนสีขาว สามารถสังเกตเห็นได้ครั้งแรกประมาณวันที่ 7-10 ของการเพาะเชื้อและการที่พบวงแหวนนี้อยู่ในระดับต่ำลงมาจากผิวหน้าเล็กน้อยของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเพราะเชื้อเลปโตสไปรามีความต้องการอากาศในปริมาณเล็กน้อย (microaerophilic) ซึ่งเวลาผ่านไปวงแหวนสีขาวนั้นจะเกิดต่ำลงมาเรื่อย ๆ เพราะเชื้อต้องการสารอาหารมากขึ้น[59] ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อแบคทีเรียเหล่านั้นก็จะไปแย่งสารอาหาร ทำให้เชื้อเลปโตสไปราตายเป็นจำนวนมาก จึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราที่เหลืออยู่ในปริมาณค่อนข้างน้อยทางกล้องจุลทรรศน์ได้

กล่าวโดยสรุป ถึงแม้ว่าเชื้อเลปโตสไปราจะไวต่อความแห้ง ความเป็นกรดด่าง และมีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมอื่นๆอีกมากที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ โรคเลปโตสไปโรสิสจึงน่าจะเป็นโรคที่ควบคุมได้ง่าย แต่ในความเป็นจริง พบว่าโรคนี้เป็นโรคที่ควบคุมได้ยากมาก ด้วยเหตุผลที่ไม่ทราบได้อย่างแน่ชัดว่า มีสัตว์ชนิดใดเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญในพื้นที่นั้น ๆ จากที่ผ่านมามาตรการควบคุมโรคเลปโตสไปโรสิส มักจะมุ่งเน้นการควบคุมและกำจัดประชากรหนูเป็นสำคัญ แต่จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นชัดเจนว่าโค กระบือ ก็เป็นแหล่งรังโรคหลักที่สำคัญของการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ดังนั้นควรปรับกลยุทธ์มาตรการควบคุมโรคในกลุ่มปศุสัตว์ โดยพัฒนาศึกษาวิจัยวิธีการยับยั้งมิให้โค กระบือเหล่านี้ปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะ ร่วมกับการให้ยารักษาควบคู่กับการให้วัคซีนป้องกันโรคเพื่อลดโอกาสการติดเชื้อในสัตว์ จะเป็นผลให้มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราลดลงด้วย

จากการทบทวนวรรณกรรม งานศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราในกระบือมีน้อยมาก ทั้ง ๆ ที่เป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดกับเกษตรกร ซึ่งเป็นอาชีพที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสมากที่สุด และจากผลการศึกษาในครั้งนี้ กระบือก็เป็นสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ในปัสสาวะ โดยเฉพาะเชื้อ bratislava จากข้อมูลทางระบาดวิทยาของประเทศไทย พบว่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 มีผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ bratislava เพิ่มมากขึ้น[35] จึงควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อพิสูจน์สมมติฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรสิสของกระบือให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เพราะในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถตอบได้อย่างชัดเจนว่า กระบือเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของเชื้อ bratislava ในประเทศไทย

ในอดีตที่ผ่านมา ถ้ามีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนเกิดขึ้นในพื้นที่ใด พื้นที่นั้นก็มักจะทำการสุ่มตัวอย่างโค กระบือ เพื่อสำรวจหาความชุกต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MAT แต่เพียงอย่างเดียว โดยพิจารณาเฉพาะข้อมูลที่แสดงว่าโค กระบือ ในพื้นที่นั้นมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิดใด แล้วจึงจะนำไปหาความเชื่อมโยงกับการเกิดโรคในคน ซึ่งผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการสำรวจหาความชุกทางซีโรโลยีแต่เพียงอย่างเดียว ยังไม่เป็นหลักฐานเพียงพอที่จะพิสูจน์ได้แน่ชัดว่าสัตว์ชนิดใดที่น่าจะเป็นแหล่งรังโรคหลักของการระบาด จำเป็นต้องมีการเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะ ซึ่งเป็นวิธีสำคัญที่สุดในการที่จะชี้ชัดลงไป แต่การเพาะแยกเชื้อก็เป็นวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ยุ่งยาก ต้องมีความเชี่ยวชาญ และใช้เวลานาน ซึ่งอาจจะควบคุมป้องกันโรคได้ไม่ทันการณ์ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะด้วยวิธี PCR จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญในการช่วยประเมินสภาพปัญหาในเบื้องต้นได้อย่างคร่าว ๆ ว่า สัตว์ชนิดใดน่าจะเป็นแหล่งรังโรคของการระบาดได้ เพราะให้ผลการตรวจที่รวดเร็ว สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราได้แม้ปัสสาวะของสัตว์จะมีปริมาณเชื้ออยู่ค่อนข้างน้อย การเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการไม่ยุ่งยากเท่ากับการเพาะเชื้อที่ต้องระมัดระวังมิให้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพชนิดอื่น ดังนั้นจึงควรที่จะต้องมีการศึกษาขยายผลต่อไป โดยพัฒนาให้สามารถตรวจหาชนิดของเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะได้ทันที ไม่ต้องรอผลจากการเพาะเชื้อแต่เพียงอย่างเดียว เพราะต้องใช้เวลานานมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

1. สมโภช มนเทียรอาสน์, มยุรา กุสุมภ์, พิมพ์ใจ นัยโกวิท, และคณะ. การระบาดของเลปโตสไปโรสิสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ.ศ.2539. วารสารวิชาการสาธารณสุข 6 (เมษายน – มิถุนายน 2540): 241– 248.
2. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สมบัติ แทนประเสริฐสุข, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, 2542.
3. Faine, S. Leptospira and Leptospirosis . 2nd ed. Melbourne: MediSci®, 1999.
4. วราลักษณ์ ตังคณะกุล, กาญจนา ยังขาว, โนรีรัตน์ สร้อยสระน้อย , และคณะ. ปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลปโตสไปโรสิสในประชากรเขตชนบท ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. วารสารวิชาการสาธารณสุข 8 (กรกฎาคม – กันยายน 2542):352–359.
5. Karasyova, E.V. , and Lysenko, A,, eds. Zoonoses control: Natural Focality of Leptospirosis. Vol. 1. Moscow: Centre of international projects GKNT,1982.
6. Hungerford, T.G. Disease of Livestock. 9th ed. New York: Mc Graw – Hill Book, 1990.
7. Sehgal , S.C. Human leptospirosis – indian . International leptospirosis society marysville , Australia , 1999 . International Leptospirosis Society Abstracts 2 (1999): 128.
8. ดวงพร พูลสุขสมบัติ. การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา . กรุงเทพมหานคร : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก , 2542. (อัดสำเนา)
9. Amstutz, H.E. Bovine medicine and surgery. 2nd ed. Santa Barbara: American Veterinary , 1980.
10. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Earter, G.R. Clinical Veterinry Microbiology. London: Mosby-Year Book Europe :1994.
11. Radostits, O.M., et al. Veterinary Medicine a Textbook of the Diseases of Cattle Sheep Pig Goat and Horse: Disease Livestock. 9th ed. London: W.B. Saumders Company , 2000.
12. Andaws, A.H., et al. Disease and Husbandy of Cattle: Bovine Medicine. Oxford: Blackwell Scientific Publication , 1992.
13. Rebhun, W.C. Disease of Dairy Cattle: Dairy Cattle. Baltimore: Williams & Wilkins , 1995.
14. Farr, R.W. State – of – the – art clinical article leptospirosis. Clinical Infectious Diseases 21 (1995): 1-8.

15. Plank, R. Review overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in human. Microbes and Infection 2 (2000):1265-1276.

16. Parker ,M., and Leslie, H.C. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity: Leptospirosis. 7th ed. Baltimore: Williams & Wilkins: 1984.

17. Levett, PN. Leptospirosis. Clinical Microbiology Review 2001(April):296–326.

18. Thomas , M.B. Outbreak of leptospirosis on a single farm in east , d J 107(1994): 290-291 .

19. Babudieri, B. Animal reservoirs of leptospirosis. Ann N.Y. Acas Sci 70 (1958):393-413.

20. ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ, นิตยา อินทรศรี, ปัจฉิมา อินทรกำแหง และคณะ. การตรวจโรคเลปโตสไปโรสิสด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา ระหว่าง ปี 2540 – 2541. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ 25 (2542): 12 – 19.

21. Venkataraman, K.S., and Nadunchelliyan, S. Epidemiology of an outbreak of leptospirosis in man and dog. Comp Immuno Microbiol infect Dis 15 (1992): 243-247.

22. พิมพ์ใจ นัยโกวิท และ ดาริกา กิ่งเนตร, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรสิส. นนทบุรี : โรงพิมพชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด , 2541.

23. กำลัง ชุมพลบัญชร. การแยกเชื้อเลปโตสไปร่าจากตัวอย่างปัสสาวะของโค. ในรายงานวิจัยการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, หน้า 251 –258. 4-6 พฤศจิกายน 2534 ณ โรงแรมเอเชีย กรุงเทพมหานคร.

24. อังคณา ฉายประเสริฐ และคณะ. PCR ในโรคติดต่อ รายงานของคณะผู้เชี่ยวชาญเพื่อพัฒนาและนำเอาวิธีการของ PCR มาใช้ในงานควบคุมโรคติดต่อ.กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, 2537.

25. Blackmore, D.K. Leptospirosis in meat inspectors : preliminary results of a serological survey. The New Zealand Medical Journal 28(November 1979): 648.

26. Merchant, I.A. and Packer, R.A. Veterinary Bacteriology and Virology: Veterinay Bacteriology. 6th ed. Ames: Iowa State University, 1961.

27. Ciceroni, L. Prevalence of leptospires infections in buffalo herds in Italy. Veterinary Record 137 (1995): 192-193.

28. Proceeding of the international workshop held. Rodent biology and integrated pest management in Africa. Belgian-journal-of-Zoology 21 (1997): 97-104.

29. Matthias, M.A. and Levett, P.N. Leptospiral carriage by mice and mongooses on the Island of Barbados. International Leptospirosis Society Marysville , Australia , 1999. International Leptospirosis Society Abstracts 2 (1999): 112.

30. Vasconcellos , S.A. Bovine leptospirosis : Occurrrence and most prevalent serovars in farms from states of south, southeastern and center regions of brazil from International leptospirosis society marysville, Australia , 1999. International Leptospirosis Society Abstracts 2 (1999): 132.

1. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ ศิริชัย วงศ์วัฒนไพบูลย์, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค . กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2537.

32. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สมศักดิ์ วัฒนศรี, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2538.

33. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สมศักดิ์ วัฒนศรี, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2539.

34. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สมศักดิ์ วัฒนศรี, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2540.

35. ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สมบัติ แทนประเสริฐสุข, บรรณาธิการ. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์, 2541

36. ธนวรรณ ธนเสาวภาคย์ . รายงานการสอบสวนโรคเลปโตสไปโรสิส อำเภอหนองบุนนาก จังหวัดนครราชสีมา กันยายน – 30พฤศจิกายน 2539. วารสารวิทยาการระบาดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 (พฤษภาคม – สิงหาคม 2540) : 20-25.

37. วราลักษณ์ ตังคณะกุล และ ดาริกา กิ่งเนตร. การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พ.ศ. 2540. วารสารวิชาการสาธารณสุข 7 (กรกฎาคม- กันยายน 2541) : 386-395.

38. พิมพ์ใจ นัยโกวิท และคณะ. การตรวจหาระดับแอนติบอดีของโรคเลปโตสไปโรซีสในคน. นนทบุรี : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข , 2542. (อัดสำเนา)

39. พราน ไพรสุวรรณ์, ปียนิตย์ ธรรมาภรณ์พิลาศ, สุริยะ คูหะรัตน์, และคณะ. การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในกลุ่มคนงานลอกสระ จังหวัดบุรีรัมย์ พ.ศ.2542. การประชุมวิชาการกระทรวงสาธารณสุขครั้งที่ 5 , หน้า 334-335. 22-25 ตุลาคม 2542 ณ โรงแรมหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา.

40. Songer, J.G. Zoonosis update leptospirosis. JAVMA 15 (November1998): 56-60.

41. สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์ . โครงการนำร่องการควบคุมและป้องกันโรคเลปโตสไปโรซีส จังหวัดบุรีรัมย์ . บุรีรัมย์ : สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์, 2543.(อัดสำเนา)

42. Nuovo, G.J. PCR in situ hybridization : Protocols and applications. New York: Raven Press, 1992

43. Carter, G.R. Essentials of verterinary bacteriology and mycology. 3rd ed. Philadelphia: Philadelphia university ,1986.

44. อลงกรณ์ อมรศิลป์ . การตรวจเชื้อ *Leptospira interrogans* ในปัสสาวะของหนูด้วยเทคนิค polymerase chain reaction . กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543.(อัดสำเนา)

45.Heinemann, M.B. Detection and differentiation of *Leptospira spp.* serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Veterinary Microbiology 73 (2000): 261-267.

46. Espi, A. Serogical prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). Epidemiology Infection 124 (2000): 599-602.

47. Prescott, J.F. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slaughter. Can J Vet Res 51 (1987): 229-231.

48. Dhaliwal, G.S. Effect of Leptospira interrogans serovar hardjo infection on milk yield in endemically infected dairy herds. Veteterinary Record 28 (September1996): 1205-1206.

49. Jordan University of Sciene and Technology . Prevalence of leptospiral antibodies in cattle in Northern Jordan . Tropical-Animal-health-and-production 24 (1992): 127-128 .

50. Bahaman, A.R. Serological prevalence of leptospiral infection in domestic animals in west Malaysia. Epidem Inf 99 (1987): 79-92.

51. Everard C.O.R. Leptospirosis in dogs and cats on the island of Trinidad : West Indies. Int J Zoon 6 (1979): 33-40.

52. Van den Broek, A. H. M., Thrusfield, M.V., Dobbie, G.R., and Ellist, W.A. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. Journal of Small Animal Practice 32 (1999): 118– 124.

53. Farrington, N.P., and Sulzer, K.R. Canine leptospirosis in Puerto Rico. Int J Zoon 9(1982): 45–50.

54. Heisey, G.B. Epidemiology and characterization of leptospirosis at an urban and provincial site in Thailand. Southeast Asian J. Trop Med Pub Hlth 19 (June 1988): 64-68.

55. Schmidt, D.R. Leptospirosis epidemiological features of a sporadic case. Arch Intern Med 149 (August 1989): 1256-1264.

56. สมเนตร บุญพรรคนาวิก. การศึกษาสำรวจโรคเลปโตสไปโรสิสในหนูในจังหวัดพระนคร. J Med Ass Thailand 48(June 1965): 42-52.

57. Leonard, F.C. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Veterinary Record 131 (1992): 435-439.

58.Leonard, F.C., Quinn, P.J., Ellis, W.A., and Farrell, K.O. Association between cessation of leptospiruria in cattle and urinary antibody levels. Veterinary science 55 (1993): 195–202.

59. Natarajaseenivasan, K. Persistence of dinger ' s ring by *Leptospira interogans* serovar *australis* in semi solid EMJH medium . Vet.J. 73 (May 1996) : 571-572.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเตรียม Neopeptone Liquid Media

1.1 ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

1.2 ชั่งโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 0.2 กรัม ด้วยเครื่องชั่งมาตรฐานใส่ลงในน้ำกลั่น

1.3 ชั่ง Neopeptone ปริมาณ 0.4 กรัม ด้วยเครื่องชั่งมาตรฐานใส่ลงในน้ำกลั่น

1.4 นำไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

1.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

1.6 ปรับ PH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

1.7 เตรียม Rabbit Serum 16 มิลลิลิตร นำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

1.8 ผสมลงใน media ที่เตรียมไว้ หลอดละ 5 มิลลิลิตร

1.9 นำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 วันติดต่อกัน

2. การเตรียม 0.8 % Agarose gel

2.1 ใช้ Single autopipette ดูดน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้วขนาด 200 มิลลิลิตร

2.2 ใช้ Single autopipette ดูดสารละลาย TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น

2.3 ใช้ Pipette ดูดเอาสารละลายที่มี TBE ผสมกับน้ำกลั่นออกเป็นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแล้ว ขนาด 100 มิลลิลิตร

2.4 ชั่ง Agarose 0.4 กรัม ด้วยเครื่องชั่งมาตรฐาน ใส่ลงในสารละลาย TBE ที่ dilution 1:5 ซึ่งอยู่ในขวดแก้ว

2.5 นำไปต้มจนสารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ระหว่างที่ต้มมีการเขย่าขวดแก้วตลอดเวลา

2.6 หลังจากต้มเสร็จแล้ว ทิ้งให้มีอุณหภูมิลดต่ำลงเป็นเวลา 10 นาที

2.7 ใช้ Single autopipette ดูด Ethidium bromide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากัน

2.8 เททั้งหมดใส่ใน gel box แล้วใส่ comb เพื่อให้เกิดหลุมหลังจากเจลแข็งตัว

2.9 ทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียม Fletcher Liquid Medium

3.1 ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 920 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้ว ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3.2 ชั่ง Fletcher Medium base ปริมาณ 2.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งมาตรฐานใส่ลงในน้ำกลั่น

3.3 นำไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

3.4 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

3.5 ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.42 แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3.6 เติม Rabbit Serum 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.7 แบ่งใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 5 มิลลิลิตร

3.8 นำไป inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 2 วันติดต่อกัน

หมายเหตุ: การเตรียม inactive scrum ต้องผ่านเครื่องกรองเชื้อแบคทีเรีย แช่ใน waterbath อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปใส่ media ได้

4. วิธีการของ PCR มีรายละเอียดดังนี้

4.1 การออกแบบสังเคราะห์ Primer

เทคนิค PCR อาศัยหลักการจับเข้าคู่กันแบบจำเพาะของสายดีเอ็นเอ ระหว่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหากับ Primer ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primer เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มจำนวน ดังนั้นจะต้องทราบลำดับของเบสที่ขนาบข้างส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจเพื่อนำมาสร้าง Primer ซึ่งเป็น oligonucleotide สั้น ๆ ขนาดประมาณ 18-28 นิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงลำดับที่สามารถจับกับปลายด้านตรงข้ามของดีเอ็นเอที่ต้องการแต่ละสาย โดยตำแหน่งที่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบนั้น จะต้องห่างกันไม่เกินความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเอนไซม์ Tag DNA polymerase ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้คอมพิวเตอร์มาช่วยออกแบบ Primers ซึ่งสามารถช่วยอำนวยความสะดวก และลดเวลาในการออกแบบและเลือก Primers ที่ต้องการ โดยทั่วไปสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

4.1.2 ใช้คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่าง ๆ โดยอาศัยข้อมูลจาก Nucleotide Database เช่น GenBank เป็นต้น

4.1.3 เลือกใช้ Software สำเร็จรูปที่เป็น Automatic primer – probe design program มีจำหน่ายเป็นจำนวนมากให้เลือกใช้

4.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี PCR

ปฏิกริยาของ PCR ในแต่ละรอบมี 3 ขั้นตอน ได้แก่

4.2.1 Denaturation ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ แยกจากกันเป็นสายเดี่ยวเกิดที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 90 องศาเซลเซียส ถึง 95 องศาเซลเซียส

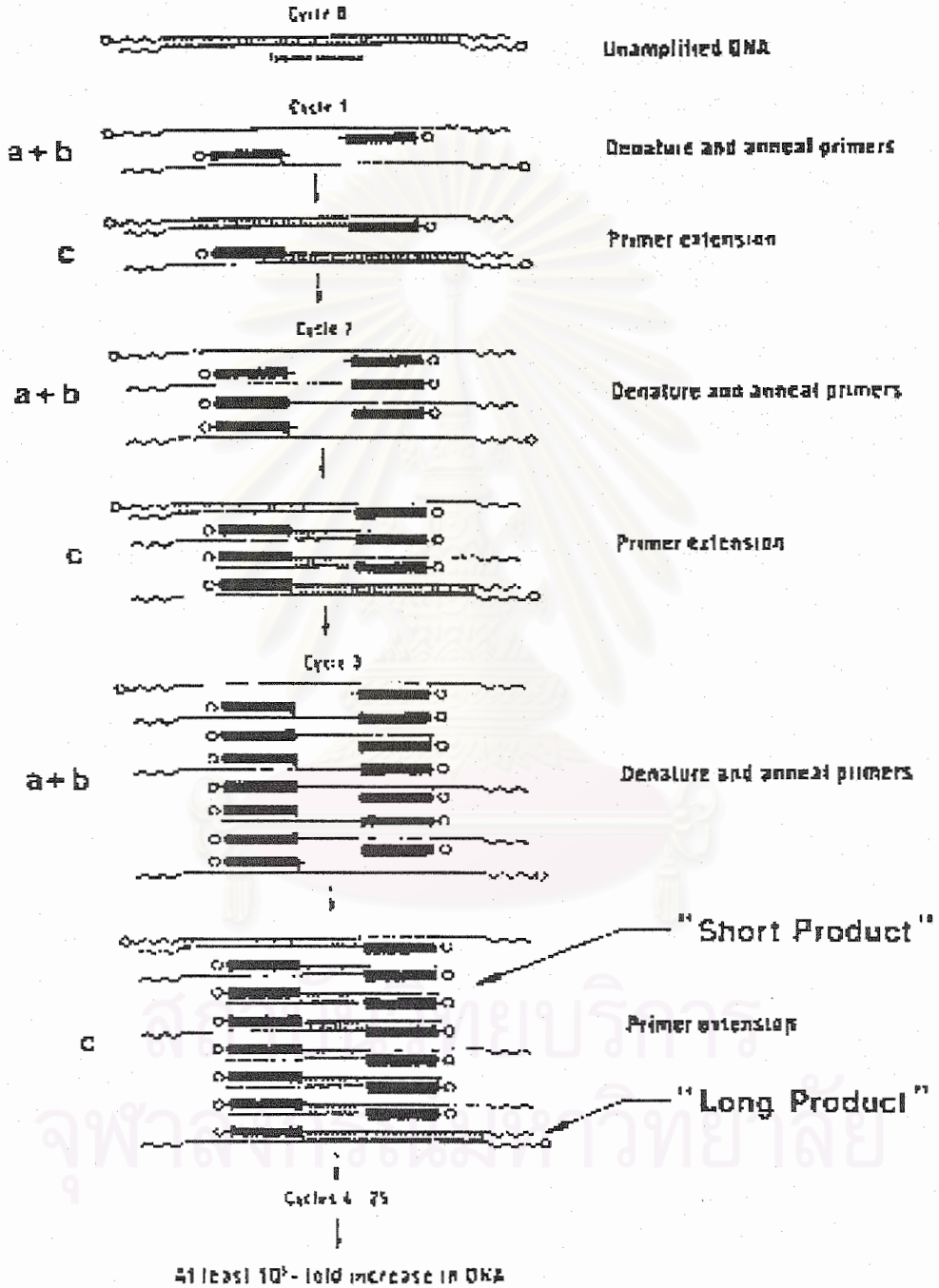
4.2.2 Primer annealing primer แต่ละสายเข้าไปจับคู่สมบนดีเอ็นเอต้นแบบ เกิดที่อุณหภูมิ ประมาณ 40 องศาเซลเซียส ถึง 60 องศาเซลเซียส

4.2.3 Primer extension การต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3 ' ของ Primer โดยใช้เอนไซม์ Tag DNA polymerase ซึ่งต้องการที่อุณหภูมิพอเหมาะที่ 72 องศาเซลเซียส

เมื่อทำซ้ำจำนวนหลายรอบทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน ดีเอ็นเอ จากเดิมได้อย่างพหุคูณ โดยปรกติจะให้ปฏิกริยา Polymerase Chain Reaction เกิดขึ้นซ้ำ ๆ จำนวน 20-30 รอบ ทำให้ได้ผลิตผลจำพวกที่สังเคราะห์ได้มากคือ short product ที่มีขนาดความยาวกำหนดจากปลาย 5 ' ของ Primer ทั้งสองสาย (รูปที่ 8) ส่วนผลิตผลจำพวกที่สังเคราะห์ได้น้อย คือ long product ซึ่งสังเคราะห์โดยตรงจาก ดีเอ็นเอ จำนวนสายของ long product จะเพิ่มตามจำนวนรอบ และปลาย 3 ' ของ long product จะค่อนข้างไม่แน่นอน เมื่อสิ้นสุดครบจำนวนรอบที่กำหนดของปฏิกริยา Polymerase Chain Reaction จำนวนของ short product จะเพิ่มขยายสูงกว่า long product มากจึงไม่มีความจำเป็น ต้องมีขั้นตอนการแยกให้บริสุทธิ์ออกจากกัน[42]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 หลักการของวิธี PCR ขั้นพื้นฐาน[42]



4.3. การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR

การตรวจผลผลิต PCR สามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่

4.3.1 วิธี Electrophoresis เป็นการนำผลผลิต PCR มาแยกตามขนาดความยาวโดยใช้กระแสไฟฟ้าบน agarose gel หรือ polyacrylamide gel เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตราฐานที่ทราบขนาดความยาวแน่นอน ตรวจสอบผลการแยกโดยย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ส่องดูด้วยแสง ultraviolet

4.3.2 วิธี Nucleic acid hybridization เป็นการตรวจผลผลิต PCR ที่ตรึงอยู่บนแผ่น membrane เช่น nylon , nitrocellulose ด้วยวิธี Southern blotting หรือ dot / slot blotting กับ oligonucleotide probe จำเพาะที่เป็นเบสคู่สมแล้ว ตรวจสอบผลของ hybridization ที่ได้ ซึ่งติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารปลอดรังสี

นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่น ๆ ที่อาจนำมาใช้ได้เช่น Amplification refractory mutation system (ARMS) Color complement assay (CCA) Microtiter plate detection assay เป็นต้น[42]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวเสาวพักตร์ ยิ้นจ้อย เกิดวันที่ 14 ธันวาคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2540 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2541

ปัจจุบันรับราชการตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ 5 กลุ่มงานวิชาการระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อ กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย