การหาแหล่งโรคที่ทำให้เกิดการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิส ในจังหวัดบุรีรัมย์

นางธรรมวรรณ หนุนไธสง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2381-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF THE INFECTION SOURCES TO LEPTOSPIROSIS OUTBREAK IN BURIRUM PROVINCE

MRS.TAMMAWAN HNUNTHAISONG

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 2002

ISBN 974-17-2381-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหาแหล่งโรคที่ทำให้เกิดการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์
โดย	นางธรรมวรรณ หนุนไธสง
สาขาวิชา	สัตวแพทยสาธารณสุข
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

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

..... กรรมการ
(นายสัตวแพทย์ ประวิทย์ ชุมเกษียร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางธรรมวรรณ หนุนไธสง: การหาแหล่งโรคที่ทำให้เกิดการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์ (IDENTIFICATION OF THE INFECTION SOURCES TO LEPTOSPIROSIS OUTBREAK IN BURIRUM PROVINCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน, 77 หน้า, ISBN 974-17-2381-4

จากปัญหาการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนอย่างรุนแรงและต่อเนื่องเป็นเวลาติดต่อกัน 3-4 ปีของจังหวัดบุรีรัมย์ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าแหล่งโรค (source of infection) ของเชื้อเลปโตสไปร่ายังคงอยู่และมีการวนเวียนของเชื้อในพื้นที่ แหล่งโรคนั้นอาจเป็นสัตว์นำโรค (carrier) ที่ปล่อยเชื้อออกจากร่างกายแล้วเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในแหล่งน้ำ จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจหาแหล่งโรค ทั้งในสัตว์นำโรค (เช่น โค กระบือ สุกร สุนัข หนู) และแหล่งน้ำที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่า โดยการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิคลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และการเพาะเชื้อจากปัสสาวะสัตว์ ไตหนู และน้ำจากแหล่งน้ำที่สงสัย จำนวน 244 ตัวอย่าง ซึ่งให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับการตรวจทางซีโรโลยีด้วยเทคนิค Microscopic Agglutination Test (MAT) ด้วยการวัดระดับไตเตอร์ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่า 24 ซีโรกรุ๊ป จำนวน 340 ตัวอย่างที่ระดับไตเตอร์เริ่มต้น 1:20 พบว่าสัตว์ในพื้นที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ 38 (11.1%) ตัวอย่าง แบ่งเป็นโค 21 ตัวอย่าง กระบือ 12 ตัวอย่าง สุกร 3 ตัวอย่าง และสุนัข 2 ตัวอย่าง โดยส่วนใหญ่พบมีแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *Leptospira interogans* serovar *ballum* 38.2%, *bratislava* 12.7% ที่เหลือได้แก่ *hebdomadis, patoc, sejroe, autumnalis,* และ *icterohaemorrhagiae* จากผลการตรวจดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคประจำถิ่นในจังหวัดบุรีรัมย์ แต่ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งส่งตรวจให้ผลลบทั้งหมดนั้นสันนิษฐานได้ว่าในการศึกษาครั้งนี้สัตว์และแหล่งน้ำในพื้นที่ไม่ใช่แหล่งโรคที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคในคน แต่จากรายงานจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเลปโต- สไปโรสิสในพื้นที่ที่สูงขึ้นอาจเกิดจากการวินิจฉัยโรคผิดพลาด ซึ่งต้องมีการศึกษาหาสาเหตุเพิ่มเติมต่อไป

ภาควิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สัตวแพทยสาธารณสุข ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545

##427 55557 31:MAJOR VETERINARY PUBLIC HEALTH

KEYWORD: LEPTOSPIROSIS/SOURCE OF INFECTION / CARRIER HOST

TAMMAWAN HNUNTHAISONG: IDENTIFICATION OF THE INFECTION SOURCES TO LEPTOSPIROSIS OUTBREAK IN BURIRUM PROVINCE. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. THANIS DAMRONGWATANAPOKIN, D.V.M.,Ph.D. 77 pp. ISBN. 974-17-2381-4

From human Leptospirosis epidemic that occurred increasingly and continuously for 3-4 years in Burirum province. The epidemic may be use to hypothesize that source of Leptospirosis infection was continuing to circulate in the outbreak area. The source of infection could have been carrier animals that shed *Leptospira spp.* or environment that is contaminated with leptospires. Therefore, the objective of this study was to find the source of leptospirosis infection including carrier animal (i.e. cattles, buffaloes, pigs, dogs, and rats) and environment especially, suspicious water resource. Polymerase Chain Reaction (PCR) and culture techniques were employed to isolated *Leptospira spp*. from urine samples. A total of 244 urine and suspicious water samples were negative to both PCR and culture techniques. Comparatively, a total of 340 serum samples were examined for antileptospiral antibodies using Microscopic Agglutination Test (MAT). The MAT used 24 serogroup as a tested battery. From a total of 340 serum samples, 38 (11.1%) samples were positive at the cut off point greater than 1:20. Out of 38 serum samples, cattles accounted for 21 samples, buffaloes 12 samples, pigs 3 samples and dogs 2 samples. Most prevalence serovar were *Leptospira interogans* serovar *ballum* (38.2%). *Leptospira interogans* serova *bratislava* accounted for 12.7%. Serovar *hebdomadis, patoc, sejroe, autumnalis*, and *icterohemorrhagiae* were also found positive in this study. Eventhough the results reviewed that leptospirosis is an endemic disease in Burirum province due to positive serum sample, *Leptospira spp.* was not found in all collected sample. This can be hypothesized that animals and suspicious water resource were not the source of infection in human leptospirosis epidemic in this study. Therefore, the increasing cases of leptospirosis in human may have been a misdiagnosis and need further investigation.

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

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

Academic year : 2002

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.น.สพ.ดร.โสมทัต วงศ์สว่าง รศ.สพ.ญ.ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี รศ.ดร.จันทร์จรัส เรี่ยวเดชะ อ.สพ.ญ.ดร.เบญจมาศ มโหสถนันทน์ ผศ.ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ ผศ.น.สพ.ดร.อลงกร อมรศิลป์ น.สพ.ประวิทย์ ชุมเกษียร และ สพ.ญ.วิรงรอง หุ่นสุวรรณ ที่ได้ให้คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ปศุสัตว์จังหวัดบุรีรัมย์ ปศุสัตว์อำเภอห้วยราช สาธารณสุขอำเภอห้วยราช น.สพ.เลอเกียรติ นิยมทอง คุณไฉไล คูวัฒนานุกูล คุณพรทิพย์ เส็งสำเริง คุณอดิศร สังฆะโต สพ.ญ.ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ เจ้าหน้าที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เจ้าหน้าที่กลุ่มควบคุมโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน กรมปศุสัตว์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาสัตว-แพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ สพ.ญ.ปราณี พาณิชย์พงษ์ น.สพ.ปิยวัฒน์ สายพันธุ์ สพ.ญ.จุฬาพร ศรีหนา สพ.ญ.เสาวพักตร์ ฮิ้นจ้อย น.สพ.โอฬาร ต้นวีระพงษ์ศิริ ที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจมาตลอด

ขอขอบคุณ น.สพ.สุพจน์ หนุนไธสง และ ด.ญ.ธนธรณ์ หนุนไธสง ที่ให้ความสนับสนุนด้านการเงินและพลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดเวลา

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และให้คำแนะนำในการดำเนินชีวิตและการทำงานแก่ผู้วิจัยและครอบครัวตลอดมา

ธรรมวรรณ หนุนไธสง

สารบัญ

หน้า

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

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อเลปโตสไปร่า 3
2.2 การติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิส 4
2.3 พยาธิกำเนิดของโรคเลปโตสไปโรสิส 6
2.4 อาการของโรค 8
2.5 ระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย 11
2.6 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส 19
2.7 จุดประสงค์ของการวิจัย 24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 สถานที่วิจัยและประชากรศึกษา 25
3.2 สารเคมี 28
3.3 อุปกรณ์ 29
3.4 วิธีการศึกษา 31
3.5 การตรวจวิเคราะห์ 32
3.6 สถิติที่ใช้วิเคราะห์ 41

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการศึกษา 42

4.1 ผลการศึกษาในโค การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT 42

4.2 ผลการศึกษาในกระบือ การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT 44

4.3 ผลการศึกษาในสุกร การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปร่า ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT 46

4.4 ผลการศึกษาในสุนัข การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT 47

4.5 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในไตหนูด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ 48

4.6 ผลการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าในน้ำด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ 49

4.7 ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีของร่างกาย ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT 49

4.8 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสัตว์ด้วยเทคนิค PCR 51

4.9 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะ ด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อ 52

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการศึกษา 53

รายการอ้างอิง 63

ภาคผนวก 71

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ ..... หน้า

1. แสดงข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและตายด้วยโรคเลปโตสไปโรสิส ของอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ ปี พ.ศ. 2539-2543 26
2. แสดงจำนวนประชากรตัวอย่างของการศึกษา 26
3. แสดงชนิดซีโรวาห์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจ MAT 36
4. ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะโคด้วยเทคนิค PCR, การเพาะเชื้อ และ MAT 43
5. ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของโค ด้วยเทคนิค MAT 43
6. ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะกระบือด้วยเทคนิค PCR, การเพาะเชื้อ และ MAT 44
7. ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของกระบือด้วยเทคนิค MAT 45
8. แสดงผลการตรวจภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า ในกระบือด้วยเทคนิค MAT 45
9. แสดงผลอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่าในสุกรด้วยเทคนิค MAT 46
10. แสดงผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุกร ด้วยเทคนิค MAT 46
11. ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสุนัขด้วยเทคนิค PCR, การเพาะเชื้อ และ MAT 47
12. ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของกระบือด้วยเทคนิค MAT 48
13. แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในไตหนูด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ 48
14. แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในน้ำด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ 49
15. แสดงผลการตรวจหาอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT 50
16. แสดงชนิดซีโรวาห์และระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่า 51
17. แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะด้วยเทคนิค PCR 52
18. แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะด้วยการเพาะเชื้อ 52

สารบัญภาพ

ภาพที่ ..... หน้า

1. ลักษณะพื้นที่และสภาพแวดล้อมของอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ 27
2. รูปแบบการดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค 27
3. แสดงลักษณะโรงเรือนและการเลี้ยงสุกรของเกษตรกรรายย่อย 28
   ในพื้นที่อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์
4. แสดงการทำ screening test ด้วยเทคนิค MAT 34
5. แสดงการทำ Titer Test ด้วยเทคนิค MAT 34
6. แสดงการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและตกตะกอนของเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT..35
7. แสดงผลการไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและตกตะกอนของเชื้อเลปโตสไปร่าด้วย 35
   เทคนิคMAT
8. แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอ ของเชื้อ*L.icterohaemorrhagiae* ATCC 43642 40
   ในปัสสาวะ โดยเทคนิค PCR

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรสิส (Leptospirosis) หรือโรคไข้ฉี่หนู เป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญโรคหนึ่ง (zoonotic disease) ที่มีรายงานการเกิดโรคทั่วโลก สาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรียเลปโตสไปร่า (*Leptospira spp.)* มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่งเกลียว สามารถเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วด้วยการหมุน เชื้อเลปโตสไปร่าจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการก่อให้เกิดโรค คือ กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค (*Leptospira interogans*) และกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (*Leptospira biflexa)* ปัจจุบันเชื้อเลปโตสไปร่าถูกจัดแบ่งกลุ่มตามคุณลักษณะทางซีโรโลยีได้ 23 ซีโรกรุ๊ป (serogroup) และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้มากกว่า 200 ซีโรวาห์ (serovar) (Faine et al., 1999) เชื้อเลปโตสไปร่ามีลักษณะที่สำคัญ คือ สามารถเจริญเติบโตและดำรงชีพภายนอกร่างกายสัตว์หรือคนได้เป็นเวลานานด้วยการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นคุณลักษณะสำคัญและมีผลต่อการถ่ายทอดหรือการติดต่อของโรค โดยสิ่งแวดล้อมนั้นต้องเป็นบริเวณที่มีความชื้นพอเหมาะ มีร่มเงา สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.2-7.4 อุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส (ºC) ได้แก่ในน้ำหรือดินที่เปียกชื้นซึ่งเชื้อสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นได้นานเป็นเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนโดยไม่สูญเสียความสามารถในการก่อโรค (Faine et al., 1999) ดังนั้นในบริเวณเขตร้อนชื้นมีน้ำท่วมขังจึงเป็นแหล่งสะสมของเชื้อเลปโตสไปร่า และเป็นแหล่งโรค (source of infection) ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในสัตว์และคน จึงมักพบการระบาดของโรคสูงขึ้นในช่วงฤดูฝนหรือภายหลังน้ำท่วม (Biberstein. 1990; Radostits et al., 1994)

โรคเลปโตสไปโรสิสก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขในหลายๆประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น (สมโภช มนเทียรอาสน์ และคณะ,1997) พบว่าเชื้อเลปโตสไปร่าก่อให้เกิดโรคในคนได้ทุกเพศทุกวัย และคนที่ต้องทำงานคลุกคลีกับสัตว์หรือทำงานในที่ชื้นแฉะ การติดต่อของโรคเกิดจากการสัมผัสโดยตรงกับปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อ หรือจากสิ่งแวดล้อมที่มีเชื้อปนเปื้อน โดยเชื้อเลปโตสไปร่าจะไชผ่านผิวหนังทางบาดแผลหรือผิวหนังที่เปียกชุ่ม หรือการกินอาหารและน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเปื้อน อาการและความรุนแรงของโรคไม่แน่นอนทั้งนี้ขึ้นกับระดับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ปริมาณเชื้อและชนิดซีโรวาห์ (serovar) ของเชื้อที่ร่างกายได้รับ ผู้ที่สัมผัสและได้รับเชื้ออาจแสดงอาการของโรคไม่รุนแรงและหายได้เองแม้ไม่ได้รับการรักษาหรือมีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต (วราลักษณ์ ตังคณะกุล,1999)

ปัญหาการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์มีความสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากผลของการเกิดโรคจะทำให้ผลผลิตและคุณภาพผลิตภัณฑ์จากสัตว์นั้นลดลง อาทิเช่น สัตว์มีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ ปริมาณน้ำนมรวมและคุณภาพของน้ำนมลดลง ปัญหาการแท้งหรือความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ เป็นต้น (Higgins et al., 1980; Thierman, 1984; Blood and Radostits, 1989; และ Smyth et al., 1992) นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในด้านระบาดวิทยาของโรค สัตว์ที่ติดเชื้อจะเปลี่ยนสถานะเป็นสัตว์รังโรค (reservoir) และสัตว์นำโรค (carrier) จากนั้นสัตว์จะแพร่เชื้อด้วยการขับเชื้อ (shedding) ออกจากร่างกายพร้อมกับปัสสาวะ น้ำนม หรือน้ำเชื้อ (semen) ทำให้เกิดการติดต่อของโรคสู่สัตว์อื่นและคนต่อไป

สำหรับประเทศไทยตั้งแต่เกิดปัญหาการระบาดของโรคเมื่อปีพ.ศ.2539 เป็นต้นมา หน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องได้ดำเนินมาตรการต่างๆในการควบคุมและป้องกันโรคทั้งในคนและสัตว์ เช่น การศึกษาค้นหาสัตว์นำโรค แหล่งโรค (source of infection) ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค เป็นต้น อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดโรคยังไม่ลดลงกลับมีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงขึ้นและยังพบการระบาดในพื้นที่เดิมๆ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าสาเหตุหรือแหล่งโรคของเชื้อเลปโตสไปร่านั้นยังคงอยู่ทำให้มีการวนเวียนของเชื้อเลปโตสไปร่าในพื้นที่ โดยสัตว์นำโรคนั้นอาจเป็นสัตว์เลี้ยงของเกษตรกร ได้แก่ โค กระบือ สุกร สุนัข ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อต่อสิ่งแวดล้อมตามแหล่งน้ำเพื่อการอุปโภคบริโภคหรือพื้นที่เกษตรกรรม และต่อสัตว์นำโรคโดยเฉพาะหนูที่อาจเป็นพาหะของโรคในพื้นที่และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในคน ดังนั้นในการควบคุมโรคเลปโตสไปโรสิสจึงจำเป็นต้องทราบหรือหาแหล่งรังโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาการระบาดก่อน เพื่อวางแผนการควบคุมโรคและตัดวงจรการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปร่า ปัจจุบันการศึกษาหาสัตว์ที่เป็นรังโรคโดยส่วนใหญ่เป็นการสำรวจทางซีโรโลยี ทำให้ไม่ทราบสถานการณ์ของโรคในสัตว์หรือสัตว์ที่เป็นสัตว์นำโรคที่แท้จริง ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เป็นการค้นหาสัตว์นำโรค ได้แก่โค กระบือ สุกร สุนัข หนู และการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อมจากแหล่งน้ำ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการวางแผนการดำเนินการควบคุมโรคในสัตว์ให้เกิดประสิทธิภาพและเข้มแข็งมากขึ้น เพื่อควบคุมสัตว์นำโรคและทำให้ลดอัตราและปริมาณการขับเชื้อของสัตว์ ลดอัตราการแพร่กระจายเชื้อและการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะทำให้ลดพื้นที่หรือจำกัดพื้นที่การเกิดโรคและลดอุบัติการณ์การเกิดโรคในคนได้ในที่สุด

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อเลปโตสไปร่า

โรคเลปโตสไปโรสิสหรือโรคไข้ฉี่หนู (Leptospirosis) เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในสกุลสไปโรขีต (Spirochete) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเส้นเกลียวบาง ความยาวประมาณ 6-20 ไมโครเมตร ความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1 ไมโครเมตร มีปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างงอเป็นตะขอ (hook) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope) จะเห็นลักษณะเป็นเส้นเล็กๆเคลื่อนไหวรวดเร็วโดยการหมุน (Plank and Dean, 2000) ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า ปศุสัตว์ (Farr,1994) เชื้อเลปโตสไปร่า (*Leptospira spp.*) จัดออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการก่อให้เกิดโรค คือ *Leptospira biflexa* เป็นกลุ่มเชื้อเลปโตสไปร่าที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ อาศัยอย่างเป็นอิสระในสิ่งแวดล้อม (free living saprophyte) และ *Leptospira interogans* ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรคทั้งในคนและสัตว์ ปัจจุบันได้จัดแบ่งกลุ่มเชื้อเลปโตสไปร่าตามลักษณะทางซีโรโลยีซึ่งเป็นการแบ่งกลุ่มตามการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและตกตะกอนทางซีรั่มวิทยา (agglutination cross absorption) ระหว่างเชื้อเลปโตสไปร่าและแอนติบอดี้ (antibody) ของร่างกาย โดยแบ่งออกได้เป็น 23 ซีโรกรุ๊ป (serogroup) และแบ่งย่อยได้มากกว่า 200 ซีโรวาห์ (serovar) การสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อในแต่ละซีโรวาห์ร่างกายไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันข้ามชนิดได้ (cross immunity)

เชื้อเลปโตสไปร่ามีคุณสมบัติที่สามารถดำรงชีพอย่างเป็นอิสระและเจริญเติบโตภายนอกโฮสต์ (host) หรือร่างกายสัตว์และคนในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมได้ เช่นในน้ำ ดินที่ชื้นแฉะ โคลนตม แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อได้ (Babudieri,1958) สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการคงอยู่และการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปร่านั้นมักเป็นบริเวณที่มีความชื้น มีร่มเงา มีก๊าซออกซิเจนเพียงพอ และมีสภาพความเป็นด่างอ่อนๆ (pH 7.2-7.4) ในระดับอุณหภูมิประมาณ 28-30 ºC ตัวอย่างเช่นดินที่เปียกชื้นเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถคงอยู่ได้นาน 183 วัน ดินที่แห้งเชื้อสามารถคงอยู่ได้นานเพียง 30 นาที บริเวณผิวน้ำเชื้อจะคงอยู่ได้ 22 วัน และเชื้อจะอยู่ในน้ำนิ่งได้นานกว่าในน้ำไหล จากคุณลักษณะของเชื้อเลปโตสไปร่าดังกล่าวข้างต้น น้ำ ความชื้น อุณหภูมิ และสภาพความเป็นกรด-ด่างของสิ่งแวดล้อม จึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อม ซึ่งส่งผลต่อการแพร่กระจายเชื้อและวงจรการติด

ต่อของโรคเลปโตสไปโรสิสทั้งในสัตว์และคน (Merchant and Packer,1967; Hanson and Tripathy,1981; Biberstein,1990; Radostits et al,1994)

เชื้อเลปโตสไปร่าไม่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ร้อน แห้ง หรือเย็นจัด โดยจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือถูกทำลายได้ง่ายที่ pH ต่ำกว่า 6 และสูงกว่า 8 หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7-10 °C และสูงกว่า 34-36 °C (Blood and Radostits,1989) ตัวอย่างเช่น เชื้อเลปโตสไป-ร่าจะถูกทำลายได้ในความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที ในสภาพอากาศแห้งแล้งอุณหภูมิ 37 °C เชื้อจะตายภายในเวลา 3 ชั่วโมง หรือในน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น สารละลายไอโอดีนขนาดความเข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน (p.p.m) ในเวลา 1 นาที น้ำยาคลอรีนขนาดความเข้มข้น 3-5 p.p.m เป็นเวลา 10 นาที (Faine et al.,1999)

2.2 การติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิส

โรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคนที่สำคัญโรคหนึ่ง การติดต่อและการแพร่เชื้อของโรคเกิดจากสัตว์สู่คนเป็นวิธีหลักและเป็นวิธีสำคัญ การติดต่อโรคระหว่างคนสู่คนสามารถเกิดได้แต่มีรายงานน้อยมาก การติดต่อของโรคโดยส่วนใหญ่เกิดจากสัตว์นำโรคได้แก่ วัว ควาย สุกร สุนัข แพะ แกะ ขับเชื้อออกจากร่างกายไปปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมโดยทางปัสสาวะ และเนื่องจากสัตว์เหล่านั้นมีปริมาณปัสสาวะเป็นจำนวนมาก ทำให้โอกาสการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น เช่น ในปัสสาวะโค 1 มิลลิลิตรมีเชื้อเลปโตสไปร่าปะปนอยู่ประมาณ 10^6 เซลล์ (Prescott et al.,1987) และที่สำคัญสัตว์สามารถขับเชื้อได้เป็นเวลานานทำให้การปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะน้ำจึงเป็นตัวกลางสำคัญที่เป็นแหล่งเก็บกักเชื้อและทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อและการติดต่อของโรคเป็นบริเวณกว้างขวางออกไป ดังนั้นสัตว์และคนสามารถติดต่อโรคได้หลายทางดังนี้

2.2.1 การติดต่อจากสัตว์สู่คน

สัตว์ที่ติดเชื้อจะเปลี่ยนสถานะเป็นสัตว์รังโรคและสัตว์นำโรค ที่จะขับเชื้อ (shedding) ออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะ น้ำนม เนื้อเยื่อตัวอ่อน น้ำคัดหลั่งของอวัยวะเพศของสัตว์เพศเมีย และน้ำเชื้อของสัตว์เพศผู้ ไปปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั้งแหล่งน้ำ ดิน โคลน ปลัก ทุ่งหญ้าอาหารสัตว์ ทำให้คนมีโอกาสสัมผัสหรือติดเชื้อจากสัตว์มี 2 วิธีสำคัญ คือ การติดเชื้อทางตรง (direct infection) และการติดเชื้อทางอ้อม (indirect infection) ดังนี้

2.2.1.1 การติดเชื้อทางตรง โดยการที่คนสัมผัสกับสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ติดเชื้อ ได้แก่ ปัสสาวะ เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่แท้ง รก เลือดที่มีเชื้อเลปโตสไปร่าปะปนอยู่ คนอาจติดโรคได้โดยการสูดหายใจเอาละอองปัสสาวะของสัตว์ที่มีเชื้อ โดยเฉพาะจากการที่ปัสสาวะตกกระทบพื้นซีเมนต์ของโรงเรือนแล้วแตกเป็นละอองน้ำในโรงเรือนปิดที่มีการระบายอากาศไม่ดี การบริโภคเนื้อสัตว์หรือเครื่องในสัตว์ในระยะมีเชื้อในกระแสเลือด (leptospiremia) (Radotits, 1994; Faine et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าคนเกิดการติดเชื้อได้จากการถูกสัตว์เช่น สุนัข หนู หรือแมลงกัด ทั้งนี้สาเหตุที่เกิดจากสัตว์กัดนั้น น่าจะเป็นสาเหตุโน้มนำของการติดเชื้อ เนื่องจากผิวหนังที่เกิดบาดแผลหรือเป็นรอยถลอกมีโอกาสที่จะทำให้เชื้อเลปโตสไปร่าแทรกไชเข้าสู่ร่างกายได้โดยง่าย (Faine et al., 1999)

2.2.1.2 การติดเชื้อทางอ้อม เป็นวิธีสำคัญและวิธีหลักของการติดต่อโรคจากสัตว์สู่คน ผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสโรครับเชื้อเลปโตสไปร่าจากสิ่งแวดล้อมที่มีปัสสาวะสัตว์ที่ติดเชื้อปนเปื้อนอยู่ เช่น การทำกิจกรรมที่ต้องแช่น้ำเป็นเวลานานๆโดยเฉพาะตามแหล่งน้ำจืดตามธรรมชาติ ได้แก่ การว่ายน้ำ ล่องแก่ง กิจกรรมในการทำนา การเดินย่ำที่ชื้นแฉะหรือแช่น้ำเป็นเวลานาน (Anderson et al., 1978; Jevon et al., 1986; Katz et al., 1991; วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ, 1999) การลอกคูคลอง (เสาวพักตร์ ฮิ้นจ้อย, 2002) การกินอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อน (Cacciapuoti et al., 1987) ดังนั้นคนที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส จึงมักเป็นกลุ่มคนที่มีอาชีพหรือมีลักษณะการดำรงชีวิตที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสัตว์ ได้แก่ เกษตรกรเลี้ยงสัตว์ สัตวแพทย์ คนงานโรงฆ่าสัตว์ หรือคนที่มีกิจกรรมที่ต้องแช่หรือสัมผัสกับน้ำเป็นเวลานานๆ เช่น เกษตรกรทำนา เป็นต้น จากการศึกษาในประเทศออสเตรเลีย พบว่าผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสโดยส่วนใหญ่มีประวัติการสัมผัสกับหนู 58.2% สุนัข 45.2% และโค 37.7% (Smythe et al., 2000) ดังนั้นการสัมผัสการคลุกคลีกับสัตว์ทั้งสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์ รวมทั้งสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะตามแหล่งน้ำที่อาจเป็นแหล่งเก็บกักเชื้อ เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคในคน

2.2.2 การติดต่อระหว่างสัตว์

การติดต่อโรคเลปโตสไปโรสิสระหว่างสัตว์ สามารถเกิดได้ทั้งการติดต่อทางตรงและทางอ้อมเช่นกัน ดังนี้

2.2.2.1 การติดเชื้อทางตรง การติดเชื้อระหว่างสัตว์สู่สัตว์ทางตรงนั้นสามารถเกิดได้หลายวิธี เช่น จากแม่สู่ลูกผ่านทางน้ำนม ผ่านทางรก (transplacenta) หรือการผสมพันธุ์ทั้งการผสมพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติและการผสมเทียม เนื่องจากพฤติกรรมการผสมพันธุ์

ของสัตว์ เช่น การดมหรือเลียอวัยวะเพศ ทำให้สัตว์ติดเชื้อจากน้ำคัดหลั่งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และจากการศึกษาของ Ellis and Thiermann (1986) สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปร่าได้จากมดลูกและท่อนำไข่ของแม่โคที่ติดเชื้อซึ่งมีผลทำให้พ่อพันธุ์ติดเชื้อได้จากการผสมพันธุ์ และจากรายงานของ Rodina (1970) พบว่าเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำเชื้อแช่แข็งได้นานถึง 3 ปี ซึ่งวิธีการติดต่อโรคของสัตว์ด้วยการผสมพันธุ์นั้นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ลูกสัตว์แรกคลอดติดเชื้อมาแต่กำเนิด ส่งผลให้ลูกสัตว์มีสุขภาพไม่แข็งแรงสมบูรณ์และตายในที่สุด (Babudieri,1958) ดังนั้นผลของการติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์จะทำให้อัตราการตายแรกคลอดหรืออัตราการแท้งสูงขึ้น (Blood and Radostits,1989; Radostits et al.,1994)

2.2.2.2 การติดเชื้อทางอ้อม เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตภายนอกร่างกายสัตว์ได้เป็นเวลานาน จึงทำให้โอกาสการแพร่เชื้อเลป-โตสไปร่าและการติดต่อของโรคไปสู่สัตว์ร่วมฝูงหรือสัตว์อื่นที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันสูงขึ้น การติดเชื้อทางอ้อมจึงเป็นวิธีที่สำคัญต่อการระบาดของโรค จากการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตส-ไปร่าในสิ่งแวดล้อม เช่น การปนเปื้อนเชื้อในทุ่งหญ้าอาหารสัตว์ ปลักโคลน แหล่งน้ำบริโภค หรืออาหารสัตว์ที่ถูกปนเปื้อนจากปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อโดยเฉพาะจากหนู ซึ่งเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญตามธรรมชาติ (Blood and Radostits,1989; Gerritsen et al.,1994.)

2.2.3 การติดต่อระหว่างคน

การติดต่อโรคเลปโตสไปโรสิสจากคนสู่คนสามารถเกิดขึ้นได้ เช่น การติดต่อจากแม่สู่ลูกผ่านทางน้ำนม (Bolin and Koellner,1988) ผ่านทางรกจากแม่ที่ติดเชื้อ (Faine,1982) หรือการถ่ายเลือด (Nedunehelliyan and Venugopalan,1997) แต่การติดต่อโดยวิธีนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจากการดูแลด้านสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมและสุขอนามัยของคน ทำให้ลดอัตราการสัมผัสเชื้อและลดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อสิ่งแวดล้อมรวมทั้งลดโอกาสการแพร่เชื้อ ดังนั้นการติดต่อโรคโดยวิธีนี้จึงไม่ใช่วิธีสำคัญที่จะทำให้เกิดการระบาดของโรคในคน

2.3 พยาธิกำเนิดของโรคเลปโตสไปโรสิส

เชื้อเลปโตสไปร่าติดต่อสู่คนและสัตว์ได้โดยการไชผ่านเยื่อบุตามร่างกาย (mucous membrane) ทั้งเยื่อบุในช่องปาก โพรงจมูก ตา ผิวหนังที่มีบาดแผลหรือรอยถลอก ผิวหนังที่เปียกชุ่มจากการแช่น้ำนานๆ เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วด้วยการหมุนทำให้ตำแหน่งที่เกิดการติดเชื้อไม่เกิดการอักเสบ หลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะกระจาย

ไปตามอวัยวะต่างๆตามกระแสเลือด ได้แก่ ปอด ตับ ไต หัวใจ เยื่อหุ้มสมอง มดลูก จากนั้นเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะบริเวณตับ เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้สูงสุดภายใน 2-4 วันหลังจากเข้าสู่ร่างกาย (Radostits et al, 1994) และใช้เวลาฟักตัวของโรคประมาณ 2-20 วัน ก่อนแสดงอาการของโรค (Hanson and Ferguson, 1975; Smith et al., 1994) ในระยะที่มีเชื้อในกระแสเลือด (leptospiremia phase) สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าได้จากเลือด น้ำไข-สันหลัง น้ำในช่องม่านตา (aqueous humer) น้ำนม และเนื้อเยื่ออวัยวะภายในร่างกาย ในระยะนี้สัตว์หรือคนจะแสดงอาการมีไข้และอาการทางระบบทั่วไปที่เชื้อเลปโตสไปร่าก่อให้เกิดพยาธิสภาพ โดยเชื้อเลปโตสไปร่าจะก่อให้เกิดพยาธิสภาพด้วยการทำลายเซลล์ของผนังเส้นเลือด (endothelial cell) โดยเฉพาะเส้นเลือดขนาดเล็กหรือเส้นเลือดฝอยของอวัยวะต่างๆ ด้วยการสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ (cytotoxin) ทำให้เซลล์เหล่านั้นตายเนื่องจากภาวะการขาดออกซิเจนและเกิดการอักเสบหรือเกิดเนื้อตายตามมา (necrosis) สารพิษอีกชนิดได้แก่สาร-พิษเอนโดท๊อกซิน (endotoxin) ที่ผลิตสารฮีโมลัยซิน (haemolysin) ซึ่งมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตก สัตว์หรือคนที่ติดเชื้อจะแสดงอาการไข้ พบจุดเลือดออก (petechial haemorrhages) ตามผิวหนังและเยื่อบุร่างกาย ปัสสาวะมีเลือดปน และเกิดภาวะโลหิตจางตามมา ในรายที่มีอาการรุนแรงจะมีภาวะดีซ่านได้ในภายหลัง ปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดอาการของโรคอย่างรุนแรงคือการติดเชื้อที่ไต โดยสารพิษจะทำลายเส้นเลือดฝอยรอบๆหน่วยไตและก่อให้เกิดการอักเสบแบบ interstitial nephritis การเสื่อมสลายของไต (nephrosis) ซึ่งจะทำให้เกิดอาการปัสสาวะมีเลือดปน (haematuria) เกิดภาวะมีสารยูเรียในเลือด (uremia) หรืออาจร่วมกับภาวะโลหิตจางของร่างกายที่เกิดจากพยาธิกำเนิดของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ก่อให้เกิดภาวะปริมาณเลือดต่ำ (hypovolemia) ความดันเลือดต่ำ (hypotension) ซึ่งมีผลทำให้เกิดภาวะไตวาย (renal failure) และทำให้สัตว์หรือคนเสียชีวิตได้ในที่สุด (Faines et al., 1999)

หลังการติดเชื้อประมาณ 1-2 สัปดาห์ ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลป-โตสไปร่า (immune phase) โดยเม็ดเลือดขาวจะทำลายเชื้อทั้งในกระแสเลือดและในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆของร่างกาย ยกเว้นบริเวณท่อไตส่วนต้น (proximal convoluted tubules) ที่เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถหลบเลี่ยงการถูกทำลายของภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ ภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นในระยะแรกจะเป็นภูมิคุ้มกันชนิด IgM จากนั้นจะสร้างภูมิคุ้มกันชนิด IgG ตามมาโดยระดับแอนติบอดี้ที่ร่างกายสร้างขึ้นจะเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 หลังการติดเชื้อ แอนติบอดี้ที่ร่างกายสร้างขึ้นจะคงอยู่ได้เป็นเวลานาน โดยเฉพาะ IgG ที่สามารถคงอยู่ในร่างกายและสามารถตรวจพบได้นานถึง 20 ปี (Chapman et al.,1991) ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวินิจฉัยโรคหรือการสำรวจสภาวะโรค ภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นจะมีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละซีโรวาห์เท่านั้นไม่มีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อต่างชนิด ผลของการสร้าง

แอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อยังมีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อร่างกายได้ เช่น การเกิดอาการ recurrent iridocyclitis ในม้าซึ่งทำให้ม้านั้นตาบอดได้ในที่สุด (Radostitis et al., 1994)

เชื้อเลปโตสไปร่าที่หลุดรอดจากการถูกทำลายของแอนติบอดี้ของร่างกาย จะไปฝังตัวอยู่ในบริเวณท่อไตส่วนต้น (proximal convoluted tubules) และรวมอยู่กันเป็นกลุ่มก้อน (colonized) จากนั้นเชื้อจะถูกขับออกจากร่างกายพร้อมปัสสาวะหลังการติดเชื้อประมาณ 1 สัปดาห์ (Radostits et al., 1994) กระบวนการขับเชื้อของร่างกายมีบทบาทสำคัญต่อการระบาดของโรค ทำให้เกิดการปนเปื้อนและการสะสมของเชื้อในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น จากนั้นเชื้อจะแพร่สู่สัตว์อื่นๆและคนได้ต่อไป การขับเชื้อออกจากร่างกายนั้นพบว่าเกิดได้เป็นระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดสัตว์และซีโรวาห์ของเชื้อที่ร่างกายได้รับ เช่น โคที่ติดเชื้อ *L. interogans* serovar *hardjo* (*L. hardjo*) จะขับเชื้อได้นานประมาณ 10-118 วัน หรือเฉลี่ย 36 วัน (Radostits et al., 1994) ลักษณะการขับเชื้อของร่างกายพบได้เป็นช่วงๆ (intermitten period) นอกจากการขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะแล้ว ร่างกายสามารถขับเชื้อผ่านทางน้ำนมหรือรกในระยะมีเชื้อในกระแสเลือด และเป็นสาเหตุทำให้สัตว์โดยเฉพาะในโคนมมีอาการเต้านมอักเสบ ลูกสัตว์ติดเชื้อแต่กำเนิดหรือเกิดภาวะการแท้ง (Hungerford, 1990)

2.4 อาการของโรค

2.4.1 อาการในคน

การเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ไม่มีลักษณะอาการที่จำเพาะ อาการที่พบมีตั้งแต่รุนแรงน้อย (mild) ถึงรุนแรงมาก (severe) กระทั่งทำให้เสียชีวิต (fatal) ทั้งนี้ความรุนแรงของโรคขึ้นกับปริมาณเชื้อเลปโตสไปร่าที่ร่างกายได้รับ ความรุนแรงของเชื้อ และระดับของภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Torten,1982) การเกิดโรคในคนไม่มีลักษณะอาการของโรคที่จำเพาะต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า ทำให้การวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นที่มีลักษณะอาการคล้ายคลึงกันทำได้ยาก เช่น โรคไข้หวัดใหญ่ ไข้เลือดออกชนิดเดงกี่ สครับไทฟัส ไข้ไทฟอยด์ (วราลักษณ์ ตังคณะกุล,1998) ทำให้การวินิจฉัยโรคเกิดความผิดพลาดได้ เช่น ในประเทศบราซิลพบว่าผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสกว่า 42% ถูกวินิจฉัยโรคผิดพลาดว่าเป็นโรคไข้เลือดออกชนิดเดงกี่ (Ko et al.,1990) อาการของโรคที่พบโดยส่วนใหญ่ ได้แก่ มีไข้ไม่ทราบสาเหตุ ปวดศรีษะและกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง โดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่องและหลัง ตาแดงอักเสบ ดีซ่าน ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มอาการได้ 2 กลุ่มตามลักษณะความรุนแรงของโรคได้ ดังนี้

2.4.1.1 กลุ่มที่ไม่มีอาการเหลือง (anicteric) เป็นลักษณะอาการของโรคที่ไม่รุนแรง อาการที่พบได้แก่ มีไข้เฉียบพลัน มักเป็นอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ ลักษณะของไข้เป็นแบบ biphasic คือ เป็นระยะมีไข้สลับกับระยะไข้ลดและกลับเป็นระยะมีไข้อีกครั้ง ปวดศีรษะและกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง เยื่อบุตาบวมแดง (วราลักษณ์ ตังคณะกุล,1998) และผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่สามารถหายจากอาการของโรคได้เองแม้ไม่ได้รับการ จากลักษณะอาการดังกล่าวทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นได้ เช่น โรคไข้หวัดใหญ่ เป็นต้น

2.4.1.2 กลุ่มที่มีอาการเหลือง (icteric) เป็นกลุ่มอาการที่มีอาการตัวเหลืองหรือดีซ่านร่วมด้วย ผู้ป่วยในกลุ่มนี้จะมีอาการของโรคอย่างรุนแรงถึงแก่เสียชีวิตได้และมักจะเรียกผู้ป่วยในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มอาการโรค Weil's disease (Farr,1994) อาการที่พบได้แก่ มีไข้สูงเฉียบพลัน (40 °C) เยื่อบุตาบวมแดง ปวดศีรษะและกล้ามเนื้ออย่างรุนแรงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่องและหลัง มีจุดเลือดออกตามผิวหนังและเยื่อบุต่างๆของร่างกาย อาการเหลืองเป็นดีซ่าน ตับและไตวาย เยื่อหุ้มสมองอักเสบ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ อาจพบมีอาการทางระบบทางเดินหายใจเนื่องจากเลือดออกในปอด (lung haemorrhage) ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่มักเสียชีวิตเนื่องจากภาวะไตวาย ภาวะเลือดออกจากรุนแรง (วราลักษณ์ ตังคณะกุล,1998) ผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีอัตราตายประมาณ 10–20 % (Torten,1982)

การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่จะแสดงอาการมีไข้ 100% ไข้สูงมากกว่า 39°C 46.8% ปวดกล้ามเนื้อ 83.9% กดเจ็บกล้ามเนื้อโดยเฉพาะน่อง 50% ปวดศีรษะ 77.4% ปวดศีรษะรุนแรง 62.9% ตัวเหลือง 64.5% ตาแดงทั้งสองข้าง 41.9% คอแข็ง 25.8% ตาแดง คอแข็งและเหลือง 6.4% (วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ, 1999) ซึ่งอาการโดยส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับการเกิดโรคในประเทศ New Caledonia และบราซิล (Perrocheau and Perolat, 1997; Ko et al., 1999)

2.4.2 อาการในสัตว์

เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถจะก่อให้เกิดโรคในสัตว์ได้หลายชนิด และในแต่ละซีโร-วาห์ของเชื้อก็ก่อให้เกิดโรคในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป หรือในสัตว์ตัวเดียวกันสามารถที่จะติดเชื้อเลปโตสไปร่าได้หลายซีโรวาห์ การเกิดโรคในสัตว์ไม่มีลักษณะอาการจำเพาะที่จะสามารถวินิจฉัยแยกจากโรคอื่นได้ เช่น โรคพยาธิในเม็ดเลือดบาบีเซีย หรืออนาพลาสโมซิส (Ellis,1984) การเกิดโรคในสัตว์มีความสำคัญคือ นอกจากจะทำให้สัตว์ที่ติดเชื้อป่วยและเป็นโรคแล้ว สัตว์นั้นจะเปลี่ยนสถานะเป็นสัตว์นำโรค (carrier) แพร่เชื้อสู่สัตว์และคนด้วยการขับเชื้อผ่านทาง

ปัสสาวะ และก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขและคุณภาพชีวิตของประชาชน รวมทั้งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ คือ มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตที่จะได้จากสัตว์ โดยเฉพาะในปศุสัตว์ เช่น ปริมาณน้ำนมลด น้ำนมที่ได้มีคุณภาพต่ำ อัตราการเจริญเติบโตต่ำ ลูกสัตว์สุขภาพอ่อนแอ ปัญหาการแท้ง โดยเฉพาะในฝูงสัตว์ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปร่า หากมีการติดเชื้อจะทำให้อัตราการแท้งของฝูงสูงขึ้น (abortion strom) (Thierman,1984) ก่อให้เกิดความสูญเสียรายได้และเศรษฐกิจของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์อย่างมาก

2.4.2.1 โค-กระบือ อาการที่พบโดยทั่วไปได้แก่ มีไข้สูง 103-106 องศาฟาเรนไฮน์ (°F) ซึม เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ปวดกล้ามเนื้อ เยื่อบุตาขาวอักเสบ และท้องเสีย ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบอาการปัสสาวะมีเลือดปน (haemoglobinuria) โลหิตจาง ภาวะดีซ่าน อาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในโคนมก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงคือภาวะการสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ลดลง ในแม่โคจะก่อให้เกิดกลุ่มอาการหยุดให้นม (milk drop syndrome) คือ มีอาการเต้านมอักเสบ น้ำนมมีลักษณะเป็นก้อนสีเหลืองคล้ายนมน้ำเหลือง (colostrum) และหยุดให้นมอย่างกะทันหัน (agalactia) เป็นเวลาประมาณ 2 -14 วัน หากเกิดการติดเชื้อในแม่โคที่ท้อง จะทำให้แม่โคแท้งซึ่งจะเห็นได้จากอัตราการแท้งหรืออัตราลูกตายแรกคลอดสูงขึ้น (Higgins et al.,1980; Smyth et al.,1992) ซึ่งอาจสูงถึง 30 % (Blood and Radostits,1989.) ทำให้เกิดให้ความสูญเสียทางเศรษฐกิจและรายได้ของเกษตรกรจากผลผลิตทั้งปริมาณ คุณภาพน้ำนมที่ลดลงและความสมบูรณ์พันธุ์ของสัตว์ลดลง ซึ่งวัดจากอัตราการแท้งของฝูง อัตราการกลับสัดของแม่โค อัตราลูกตายแรกคลอดสูงขึ้น (Faine et al., 1999) Higgins et al.(1980) รายงานผลกระทบเนื่องจากการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในฟาร์มโคนมขนาด 250 แม่ ส่งผลให้ปริมาณน้ำนมรวมลดลงกว่า 19,550 ลิตรในช่วงระยะเวลา 2 เดือน ในโค-กระบือที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการของโรค (subclinical) หรือที่หายจากอาการของโรคแล้วนั้น จะเปลี่ยนสถานะเป็นสัตว์นำโรค (carrier) ที่จะแพร่เชื้อได้โดยการขับเชื้อออกจากร่างกายทางปัสสาวะ แล้วไปปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่ทำให้เกิดวงจรการแพร่เชื้อและการติดต่อของโรคสู่สัตว์และคนต่อไป

2.4.2.2 สุกร สุกรที่ติดเชื้อโดยส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรคชัดเจน อาการที่พบได้แก่มีไข้ เบื่ออาหาร ร่างกายอ่อนเพลีย เยื่อบุตาขาวอักเสบ ภาวะดีซ่าน ปัสสาวะมีเลือดปน และชัก ปัญหาที่สำคัญของการเกิดโรคในสุกรคือก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร คือ ปัญหาการแท้งของแม่สุกร อัตราตายแรกคลอดสูง จำนวนลูกต่อครอกลดลง ลูกสุกรเกิดใหม่อ่อนแอ อัตราการเจริญเติบโตต่ำ หรือร่างกายแคระแกร็น (Torten,1982; Rocha and Vieira,1992) ทั้งนี้การแท้งของแม่สุกรมักเกิดขึ้นภายหลังเกิดการ

ติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน 14-30 วัน หรือเกิดการติดเชื้อในระยะสุดท้ายของการตั้งท้อง (last trimeter) (Radostits et al.,1994) ในระยะการติดเชื้อในกระแสเลือดของแม่สุกร เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถผ่านไปสู่ตัวอ่อนโดยผ่านทางรก ซึ่งจะมีผลทำให้ตัวอ่อนนั้นตายหรือเกิดการติดเชื้อมาแต่กำเนิด เนื่องจากมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อเลปโตสไปร่าได้จากเนื้อเยื่ออวัยวะภายในคือไต และของเหลวในร่างกายตัวอ่อนที่แท้ง (Rocha and Vieira,1992) จากการศึกษาของ Paz-Soldam et al. (1991) พบว่าปัญหาการแท้งของแม่สุกรในประเทศเปรู เกิดจากการติดเชื้อ *L. canicola* ที่เป็นสาเหตุทำให้แม่สุกรแท้ง ลูกตายแรกคลอด mummified piglet และ neonatal death

ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และ อรรณพ คุณาวงษ์กฤต (2000) รายงานผลการศึกษาผลกระทบของการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสต่อความสูญเสียด้านเศรษฐกิจของฟาร์มสุกรขนาดใหญ่ (2,600 แม่) ที่เกิดปัญหาการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิส ทำให้แม่สุกรมีอัตราการแท้ง 5% สูญเสียลูกสุกรกว่า 7,910 ตัว คิดเป็นมูลค่า 3,955,000 บาท และหากรวมค่าใช้จ่ายอื่นๆเพื่อใช้ในการรักษา การควบคุมและกำจัดโรคแล้ว เกษตรกรต้องสูญเสียรายได้กว่า 5 ล้านบาท ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลของการเกิดโรคในสุกรส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียด้านเศรษฐกิจและผลผลิตของสัตว์

2.4.2.3 สุนัข สุนัขเป็นรังโรคตามธรรมชาติของเชื้อ *L. canicola* และ *bataviae* (McDonough,2001) อาการที่พบโดยส่วนใหญ่ได้แก่ มีไข้ เยื่อบุตาขาวอักเสบ อาเจียน อ่อนเพลีย ร่างกายขาดน้ำอย่างรวดเร็ว เกิดจุดเลือดออกตามผิวหนังและอวัยวะภายในเช่น กระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้อุจจาระมีเลือดปน ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบว่าสุนัขมีไข้สูง อ่อนเพลียมาก อาเจียน พบมีจุดเลือดออกรอบริมฝีปาก เยื่อบุตาขาวอักเสบ ภาวะดีซ่านอย่างรุนแรง และอาจตายได้ภายใน 2-3 วัน ในรายที่มีอาการรุนแรงไม่มากนัก อาจมีชีวิตอยู่ได้นาน 7-10 วันหลังจากมีอาการและมีโอกาสหายจากโรคได้ (Faine et al., 1999) นอกจากนี้การติดเชื้อในสุนัขมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคในคน เนื่องจากสุนัขเป็นสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิดและคลุกคลีกับคนมากที่สุด และพบรายงานการติดเชื้อจากสุนัขสู่คนได้เสมอ (Farrington and Sulzer, 1982)

2.5 ระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย

การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย พบครั้งแรกเมื่อปีพ.ศ.2486 โดยนายแพทย์ใช้ ยูนิพันธ์ หลังเกิดภาวะน้ำท่วมครั้งใหญ่ในกรุงเทพมหานคร จากนั้นมีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสอยู่เสมอปีละ 100-300 ราย จึงถือว่าโรคเลปโตสไปโรสิส

เป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทย (endemic disease) ในปีพ.ศ. 2539 เริ่มมีรายงานจำนวนผู้ป่วยสูงขึ้น จากนั้นในปีพ.ศ.2540 การระบาดของโรครุนแรงขึ้นเมื่อพิจารณาจากรายงานผู้ป่วยที่สูงขึ้น และพบว่าพื้นที่การระบาดของโรคกระจายไปทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศที่มีรายงานจำนวนผู้ป่วยสูงสุด การระบาดของโรคพบสูงขึ้นในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมของทุกๆปี (กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข, อัดสำเนา) ทำให้กระทรวงสาธารณสุขจัดให้โรคนี้เป็นโรคอุบัติซ้ำ (re-emerging disease) ที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขระดับประเทศที่ต้องเร่งดำเนินการหามาตรการในการแก้ไขควบคุมป้องกันโรค และจากผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการเกิดโรคและเพื่อการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาทางซีโรโลยีพบว่า ผู้ป่วยโดยส่วนใหญ่พบมีแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *L.sejroe, bratislava, pyrogenes, australis, autumnalis, icterhaemirrhagiae, ballum* (กรมวิทยาศาสตร์สุขภาพ กระทรวงสาธารณสุข,ติดต่อส่วนตัว) ส่วนการเกิดโรคในสัตว์พบมีรายงานการเกิดโรคจำนวนน้อยมาก (กรมปศุสัตว์, ติดต่อส่วนตัว) เนื่องจากการติดเชื้อและการเกิดโรคในสัตว์นั้นโดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) ทำให้ไม่สามารถค้นหาสัตว์ป่วยหรือสัตว์ที่ติดเชื้อได้ ภายหลังการระบาดของโรคในคน ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และคณะ (2000) ได้สำรวจแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลป-โตสไปร่าในปศุสัตว์ในพื้นที่ 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ พบว่าโคเนื้อมีอัตราการติดเชื้อ 74.5% กระบือมีอัตราการติดเชื้อ 81.8% และสุกรมีอัตราการติดเชื้อ 61.3% โคและกระบือส่วนใหญ่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ *L.sarmin, ranarum, sejroe* และ *ballum* สุกรพบเป็นการติดเชื้อ *L. sarmin, ranarum, australis* และ *pomona* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการเกิดโรคในโคและกระบือ นอกจากนี้ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปร่าและการติดต่อของโรคเลปโตสไปโรสิสทั้งในสัตว์และคน ดังนี้

2.5.1 สัตว์ที่เป็นรังโรคและพาหะนำโรค

เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถก่อให้เกิดโรคในสัตว์ได้หลายชนิด ทั้งสัตว์น้ำ สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Farr,1994) จึงมีบทบาทสำคัญต่อลักษณะระบาดวิทยาของโรค เนื่องจากสัตว์เหล่านี้เป็นแหล่งโรคของเชื้อที่จะทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อไปสู่สิ่งแวดล้อมสู่สัตว์และคนได้โดยการขับเชื้อออกจากร่างกายเป็นระยะเวลานานและมีปริมาณเชื้อจำนวนมาก โดยเฉพาะจากสัตว์เลี้ยงและสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับคนทั้งในด้านการเลี้ยง การผลิตและการบริโภค จึงมีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อและการติดต่อโรคมาสู่คน เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าถูกจัดแบ่งออกได้มากกว่า 230 ซีโรวาห์ ซึ่งในเชื้อแต่ละซีโรวาห์มีความสามารถในการพัฒนาและปรับตัวในสัตว์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

2.5.1.1 สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคตามธรรมชาติ (maintenance or reservoir host) เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถที่จะพัฒนาและปรับตัวในร่างกายสัตว์นั้นได้ สัตว์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญในด้านระบาดวิทยาของโรคและการควบคุมโรค เนื่องจากการติดเชื้อของสัตว์กลุ่มนี้มักเป็นแบบการติดเชื้อไม่แสดงอาการ (subclinical infection) หรือแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน เป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง อาการที่พบเป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงผลผลิตของสัตว์หรือของฝูงลดลง เช่น อัตราการแท้งสูงขึ้น ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง ปริมาณน้ำนมลด นอกจากนี้สัตว์ที่ติดเชื้อยังขับเชื้อออกจากร่างกายได้เป็นเวลานานหรืออาจตลอดชีวิตของสัตว์นั้นก็ได้ เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเชื้อในร่างกายสัตว์นั้นได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้มาก ระดับแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อต่ำ ทำให้ยากในการวินิจฉัยโรค ในประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ อังกฤษ พบว่าโคเป็น maintenance host ของ *L. hardjo* ในประเทศสเปน โคเป็น maintenance host ของ *L.pomona* และ *grippotyphosa* (Epsi et al., 2000) สุกรและม้าเป็นแหล่งรังโรค *L. bratislava* สุนัข เป็นแหล่งโรคของ *L. canicola* หนูและสัตว์ฟันแทะโดยส่วนใหญ่เป็นแหล่งโรคของ *L.icterohaemorrhagiae, ballum* (Heath and Johnson,1994 และ Radostits et al., 1994)

Pereira et al. (1997) รายงานการศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรสิสในหมู่เกาะ Azorean พบว่าหนู (*R.rattus, R.norvegicus* และ*M.musculus*) เป็นสัตว์รังโรคตามธรรมชาติที่สำคัญของเชื้อเลปโตสไปร่า *L. ballum* และ *icterohaemorrhagiae* และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในคน

Ko et al. (1999) รายงานผลการสำรวจความชุกการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในเมือง Salvador ประเทศบราซิล พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่กว่า 87% เกิดจากการติดเชื้อ *L.copenhageni* โดยมีหนูบ้านและหนูท่อ (*Rattus rattus* และ *R.norvegicus*) เป็นสัตว์นำโรคที่สำคัญของเชื้อชนิดนี้ (Faine,1982)

ดวงพร พูลสุขสมบัติ และคณะ (1999) รายงานผลการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าจากหนูในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคในประเทศไทย พบว่าหนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) เป็นสัตว์นำโรคที่สำคัญ และเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคในคนภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปัจจุบัน

Lilenbaum และ Santos (1996) รายงานผลการสำรวจโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยาของโคนมในประเทศบราซิลจำนวน 405 ตัว จากทั้งหมด 21 ฟาร์ม พบว่าโคนมเป็นสัตว์นำโรคของเชื้อ*L. hardjo* (21%) *wolffi* (14%) *bratislava* (9%) และ *pomona* (5%)

ทั้งนี้ความชุกของการติดเชื้อยังขึ้นกับลักษณะการจัดการและระบบสุขาภิบาลภายในฟาร์มด้วย คือ ฟาร์มที่มีระบบจัดการดี มีการเลี้ยงไม่หนาแน่น พบมีอัตราการติดเชื้อต่ำกว่าฟาร์มที่มีระบบการจัดการที่ไม่ดี

ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาโดยการสุ่มเพาะเชื้อจากไตโค พบว่าโคเป็นสัตว์นำโรคของเชื้อ *L. hardjo* 83%, *pomona* 12.5% และ *grippotyphosa* 4.5% ซึ่งประมาณได้ว่ามีโคจำนวนกว่า 1 ล้านตัวทั่วประเทศเป็นสัตว์นำโรคของเชื้อเลปโตสไปร่า ที่จะก่อให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อและการติดต่อของโรคไปสู่คนได้ (Miller [a] et al.,1991) เช่นเดียวกับในประเทศออสเตรเลีย โคและโคนมส่วนใหญ่เป็นสัตว์นำโรคของเชื้อ *L. hardjo* ที่ก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุขในคน ปัญหาในระบบสืบพันธุ์และความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของแม่โค (Corney et al.,1996)

2.5.1.2 สัตว์ที่ติดเชื้อโดยบังเอิญ (incidental or accidental host) เชื้อเลปโตสไปร่าที่ติดเชื้อในสัตว์กลุ่มนี้ไม่สามารถที่จะพัฒนาและปรับตัวให้เข้ากับร่างกายของสัตว์นั้นได้ (non-host-adapted serovars of Leptospires) ลักษณะการเกิดโรคมักเป็นแบบเฉียบพลันและก่อให้เกิดอาการของโรครุนแรง เช่น การเกิดโรคในคน ซึ่งโดยส่วนใหญ่คนจะเป็น accidental host ของเชื้อเลปโตสไปร่าทุกซีโรวาห์ อาการของโรคจะมีความรุนแรงและทำให้เสียชีวิตได้ เช่น เกิดภาวะตับและไตวาย หรือกลุ่มอาการที่เรียกว่า Weil's disease การขับเชื้อออกจากร่างกายเกิดขึ้นได้น้อยและเป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ สัตว์นำโรคชนิดนี้จึงไม่มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่กระจายเชื้อ เช่น โคและสุกรที่ติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ม้าที่ติดเชื้อ *L. pomona* และ *hardjo* หนูและสัตว์ฟันแทะที่ติด *L. pomona* (Heath and Johnson,1994; Radostits et al.,1994)

Farrington and Sulzer (1982) ได้สำรวจภาวะการติดเชื้อเลปโตสไปร่าในสุนัขจรจัดในประเทศ Puerto Rico จำนวน 116 ตัว พบว่าสุนัขเหล่านี้มีอัตราการติดเชื้อ 62.9% ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบเป็นการติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* สุนัขเหล่านี้จึงเป็นสัตว์นำโรคที่สำคัญที่ควรต้องมีมาตราการในการควบคุมโรค เนื่องจากความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดระหว่างสัตว์และคนทำให้คนมีโอกาสติดเชื้อจากสุนัขนี้สูงขึ้น และหากเกิดการติดเชื้อจะส่งผลให้คนนั้นมีอาการของโรคที่รุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้หากติดเชื้อซีโรวาห์นี้

2.5.2 ระยะเวลาและปริมาณเชื้อเลปโตสไปร่าที่ถูกขับออกจากร่างกาย

จากลักษณะพยาธิกำเนิดของเชื้อเลปโตสไปร่า หลังจากที่ร่างกายติดเชื้อหรือแสดงอาการของโรคแล้วประมาณ 2 สัปดาห์ เชื้อเลปโตสไปร่าที่ยังคงเหลืออยู่จะสามารถเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มปริมาณเชื้อได้ที่บริเวณท่อไตส่วนต้น (proximal convoluted tubule) (Parker and Collier,1990; Alexander,1980) และเชื้อจะถูกขับออกจากร่างกายพร้อมกับปัสสาวะ (shedding) ไปปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสัตว์ที่ติดเชื้อจะเปลี่ยนสถานะเป็นสัตว์รังโรคและนำโรคต่อไป (carrier and reservoir) ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญด้านระบาดวิทยาของโรค เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อนั้นสามารถขับเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน โดยอาจเป็นเดือนเป็นปีหรือตลอดช่วงอายุของสัตว์นั้น ทั้งนี้ขึ้นกับซีโรวาห์ของเชื้อที่ร่างกายได้รับ (Babudieri,1958) เช่น ลูกสุกรหรือสุกรที่ติดเชื้อสามารถขับเชื้อได้นานประมาณ 2-24 เดือน นอกจากนี้ยังสามารถขับผ่านทาง น้ำเชื้อสุกรเพศผู้ รก และเนื้อเยื่อตัวอ่อน (Hanson and Ferguson,1975) โคขับเชื้อได้ประมาณ 10-118 วัน หรือเฉลี่ย 36 วัน (Radostits et al.,1994) หรือ 44 สัปดาห์ (Leonard et al.,1992) นอกจากนี้พบว่าโคสามารถที่จะขับเชื้อ *L. hardjo* ผ่านทางอวัยวะสืบพันธุ์ได้นานกว่า 8 วันหลังการแท้งหรือการคลอด และสามารถแยกเชื้อจากรังไข่ได้นานถึง 90 วันหลังการติดเชื้อโดยการทดลอง (Ellis,1985) ม้าขับเชื้อได้นานประมาณ 4 เดือน แกะขับเชื้อได้ประมาณ 1 เดือนหลังจากติดเชื้อ (Blood and Radostits,1989; Radostits et al.,1994.) Gerritsen et al. (1994) รายงานว่าแกะสามารถขับเชื้อ *L. hardjo* ได้นานอย่างน้อย 42 วัน Larsson et al. (1985) รายงานผลการศึกษาแมวที่ติดเชื้อโดยการทดลองพบว่าแมวขับเชื้อ *L. canicola* ได้นานกว่า 2-8 สัปดาห์ และคนก็สามารถขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะได้ พบว่าคนขับเชื้อ *L. hardjo* ได้นานกว่า 33 สัปดาห์ และ *L. australis* ได้นานกว่า 11 เดือน (Michna,1970) Bal et al. (1994) รายงานผลการศึกษาการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะคนด้วยเทคนิค PCR พบว่าคนสามารถขับเชื้อในปัสสาวะได้นานกว่า 1 ปี

2.5.3 สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการคงอยู่ของเชื้อเลปโตสไปร่า

เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่ามีคุณสมบัติที่สามารถเจริญเติบโตและดำรงชีพในสิ่งแวดล้อมภายนอกตัวสัตว์หรือคนได้เป็นเวลานาน โดยสิ่งแวดล้อมนั้นต้องมีความชื้นพอเหมาะ อุณหภูมิเหมาะสมประมาณ 28-30 °C มีระดับ pH เป็นด่างอ่อนๆ เช่น ในดินที่ชื้นแฉะหรือเป็นแอ่งน้ำ ดังนั้นน้ำหรือความชื้น อุณหภูมิ และสภาพความเป็นกรด-ด่างของสภาพพื้นที่หรือภูมิศาสตร์จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญของการแพร่เชื้อและการติดต่อของโรค และน้ำมีบทบาทในการเป็นตัวกลางหรือตัวนำที่ทำให้เชื้อแพร่กระจายไปสู่พื้นที่หรือบริเวณอื่นๆได้กว้างขวางขึ้น ซึ่งจะพบการระบาดของโรคภายหลังการเกิดภาวะน้ำท่วมหรือมีน้ำท่วมขังเป็นเวลานานๆ และพบว่า

อุบัติการณ์การเกิดโรคในคนสูงขึ้นในช่วงฤดูฝน (วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ,2542) เช่น การระบาดครั้งใหญ่ในประเทศนิคารากัว ในปี 1995 ที่เกิดเนื่องจากภาวะฝนตกหนักและเกิดน้ำท่วมครั้งใหญ่ (Trevejo et al., 1998) การระบาดในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลียในปีค.ศ. 1999 พบมีรายงานการเกิดโรคสูงขึ้นจากปีค.ศ. 1998 เป็นจำนวนมาก ซึ่ง WHO/FAO Collaborating Center for Reference and Research on Leptospirosis รายงานสาเหตุของการระบาดเนื่องจาก ปีค.ศ. 1999 เกิดภาวะฝนตกชุกและทำให้มีน้ำท่วมเป็นบริเวณกว้างทำให้การระบาดของโรคสูงขึ้น (Smyth et al., 2000) โดยภาวะฝนตกที่ทำให้น้ำท่วมขังทำให้โอกาสการอยู่รอดของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อมสูงขึ้น (Douglin et al., 1997) Hanson and Tripathy (1981) รายงานว่าเชื้อ *L. pomona* สามารถอยู่ในน้ำได้นานกว่า 10 วัน ในดินที่เปียกชื้นเชื้อคงอยู่ได้นานถึง 183 วัน แต่ในดินแห้งแล้งเชื้อจะคงอยู่ได้ 30 นาที น้ำที่มีอุจจาระปนเปื้อนอยู่เชื้อจะคงอยู่นาน 7-10 วัน และที่บริเวณผิวน้ำเชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ 22 วัน (Merchant and Packer, 1967; Radostits et al., 1994) และจากการศึกษาของ Kuriakose et al. (1997) พบว่าเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถอยู่ในดินหรือโคลนได้นานถึง 249 วัน โดยไม่สูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคได้ (pathogenicity)

ดังนั้นลักษณะทางระบาดวิทยาการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์และคน จึงมีความสัมพันธ์กับสภาพภูมิศาสตร์ของประเทศและฤดูกาล (Faine, 1982) ประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น การระบาดของโรคมักพบในช่วงฤดูฝนต่อฤดูหนาว ประมาณเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (วิชัย โชควัฒน, 1999) ซึ่งเป็นช่วงที่มีน้ำท่วมขังในพื้นที่นาไร่และที่ลุ่ม ในประเทศอินเดีย พบมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสสูงขึ้นในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงฤดูมรสุม (Kuriakose et al., 1997) ในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย พบว่าอัตราป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสสูงขึ้นในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมาก (Smyth et al., 2000) การระบาดครั้งใหญ่ในประเทศนิคารากัว เมื่อปีค.ศ.1995 พบว่าอุบัติการณ์การเกิดโรคสูงสุดในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงที่ฝนตกหนักและเกิดน้ำท่วมขังเป็นบริเวณกว้าง (Trevejo et al., 1998) ประเทศบาร์บาดอสพบอุบัติการณ์การเกิดโรคในคนสูงขึ้นในช่วงฤดูฝน เนื่องจากเกิดภาวะน้ำท่วมขังเป็นบริเวณกว้าง ซึ่งเป็นสาเหตุโน้มนำที่ทำให้คนมีโอกาสสัมผัสและรับเชื้อเลปโตสไปร่าที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Douglin et al., 1997) ประเทศที่อยู่ในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาวจะพบการระบาดของโรคสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน Miller[b] et al.(1991) ได้รายงานผลการสำรวจความชุกของการเกิดโรคเลปโตส-ไปโรสิสในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าความชุกของการเกิดโรคสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน และรัฐที่ตั้งอยู่ในภาคกลางตอนใต้และภาคใต้ฝั่งตะวันออกของประเทศ เช่น รัฐเท็กซัสรัฐฟลอริดา พบว่ามีความชุกของโรคสูงกว่ารัฐที่ตั้งอยู่ทางภาคเหนือหรือภาคกลาง เนื่องจากสภาพอากาศมีอุณหภูมิที่สูงกว่าและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อม

ลักษณะความเป็นกรด-ด่างของปัสสาวะสัตว์ที่ติดเชื้อ ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการคงอยู่และความอยู่รอดของเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสัตว์ซึ่งจะมีผลต่อปริมาณและการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม ในสัตว์กินเนื้อ (carnivores) ปัสสาวะจะมีค่า pH เป็นกรดอ่อนๆ เช่น สุนัข ปัสสาวะมีความเป็นกรดอ่อนๆ มี pH ประมาณ 5.2-6.8 (Bloxham,1999) ซึ่งไม่เอื้อต่อการอยู่รอดของเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะนั้นได้ (Babudieri,1958) ทำให้ปริมาณและโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมลดลง แต่ยังมีรายงานการเกิดโรคเนื่องจากการติดเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะสุนัขได้ (Feigin et al.,1973) ขณะเดียวกันสัตว์กินพืช (herbivores) เช่น โค กระบือ แพะ แกะ และม้า ที่ปัสสาวะมีค่า pH เป็นด่างอ่อนๆประมาณ 7-8.5 (Bloxham,1999) จึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเชื้อเลปโตส-ไปร่าในปัสสาวะนั้นได้ เชื้อที่ปะปนในปัสสาวะของสัตว์เหล่านี้สามารถที่จะคงทนและดำรงชีพได้เป็นเวลานานกว่า ดังนั้นเชื้อเหล่านี้จึงมีโอกาสที่จะปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดต่อของโรคไปสู่สัตว์อื่นๆและคนได้

ปัจจัยอื่นๆที่มีผลและความสำคัญต่อการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสทั้งในสัตว์และในคน ได้แก่ จำนวนและความหนาแน่นของสัตว์นำโรค ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณเชื้อเลป-โตสไปร่านั้นมีโอกาสปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่างๆได้มากขึ้น และมีโอกาสที่จะทำให้การแพร่กระจายเชื้อและการติดต่อของโรคสูงขึ้น (Pereira et al.,2000) ซึ่งปัจจุบันปัญหาการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสพบในเขตเมืองมากขึ้น เช่น ในประเทศอิสราเอล อาร์เจนติน่า และบราซิล สาเหตุเกิดจากความหนาแน่นของชุมชนและประชากรในเขตเมือง ที่ก่อให้เกิดปัญหาการจัดการด้านสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม ปัญหาขยะ ปัญหาการระบายน้ำและก่อให้เกิดน้ำท่วมขัง เหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่เอื้อให้สัตว์นำโรคโดยเฉพาะหนูมีจำนวนมากขึ้น เกิดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมมากขึ้น และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในคน (Ko et al. 1997; Barcellos and Sabroza, 2001; Kariv et al,2001)

ดังนั้นการควบคุมและป้องกันโรค ต้องดำเนินการกำจัดหรือควบคุมจำนวนสัตว์นำโรคของเชื้อเลปโตสไปร่า เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการปรับปรุงสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมทั้งในบ้านเรือนและพื้นที่เลี้ยงสัตว์ เพื่อทำลายและลดอัตราการปนเปื้อนของในสิ่งแวดล้อมและลดอัตราการแพร่กระจายของเชื้อ สุดท้ายจะทำให้ลดอัตราการเกิดโรคในคนและในสัตว์ได้ต่อไป

2.5.4 พฤติกรรมเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

จากคุณสมบัติของเชื้อเลปโตสไปร่าและวิธีการติดต่อของโรคที่มีแหล่งโรคโดยส่วนใหญ่เป็นสัตว์นำโรคและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงพบว่าพฤติกรรมการดำรงชีวิตของคนที่เกี่ยวข้องกับสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ของสัตว์ การสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่เปียกชื้นที่เหมาะสมต่อการคงอยู่ของเชื้อเลปโตสไปร่า เหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ดังนั้นกลุ่มคนที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า ได้แก่ คนงานโรงฆ่าสัตว์ คนงานฟาร์มเลี้ยงสัตว์ สัตวแพทย์ เกษตรกร ชาวนา (Lennette et al.,1980; Heath and Johnson,1994; Kuriakose et al.,1997; Campagnolo,2000; Kariv et al.,2001) จากรายงานการเกิดโรคเลป-โตสไปโรสิส ในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ในปี ค.ศ.1998 พบว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสจำนวน 83% มีประวัติเคยสัมผัสหรือคลุกคลีกับสัตว์ คือ ประวัติการสัมผัสกับโค 65.6% สัมผัสกับหนู 48.9% และ สัมผัสกับสุนัข 44.4% และเมื่อแยกผู้ป่วยตามกลุ่มอาชีพพบว่า ผู้ป่วยจำนวน 23.1% มีอาชีพตัดแต่งเนื้อสัตว์ 13.8% เป็นเกษตรกรฟาร์มโคนม และ12.9% มีอาชีพเป็นเกษตรกรปลูกกล้วย (Smyth et al, 2000) เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Simon และคณะ.(1999) ศึกษาหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส ในนักศึกษาสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยซารากาซ่า พบว่ากลุ่มนักศึกษาที่เรียนหรือฝึกงานในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เรียนวิชาเทคโนโลยีการตรวจเนื้อและมีสัตว์เลี้ยงหรือใกล้ชิดสัตว์ เป็นกลุ่มที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคสูงสุดเนื่องจากมีความใกล้ชิดและคลุกคลีกับสัตว์หรือปศุสัตว์มากกว่า ดังนั้นการสัมผัสกับสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ของสัตว์เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า

นอกจากนี้การดำเนินกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับน้ำหรือแหล่งน้ำ ก็เป็นพฤติกรรมเสี่ยงต่อการเกิดโรค เช่นกิจกรรมการเดินป่า การล่องแพ พายเรือ หรือว่ายน้ำ ในแหล่งน้ำที่มีเชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อน (Jevon et al.,1986; Reisberg et al.,1996) Anderson et al.(1978) รายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในรัฐเทนเนสซี่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อขณะว่ายน้ำในหนองน้ำ ซึ่งในบริเวณนั้นมีฟาร์มปศุสัตว์อยู่ใกล้ๆ และน่าจะเป็นแหล่งโรคที่ทำให้เชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อนในแหล่งน้ำนั้น เช่นเดียวกับการระบาดของโรคในประเทศไทย ซึ่ง วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ (1999) ได้รายงานผลการศึกษาหาปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิสของคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญได้แก่ การเดินย่ำน้ำ การไถนา ใส่ปุ๋ยและการถอนกล้าที่ต้องแช่ในน้ำขังนานกว่า 6 ชั่วโมง ซึ่งในพื้นที่นานั้นอาจมีเชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อนและการแช่น้ำนานๆมีผลทำให้ผิวหนังหรือเยื่อบุร่างกายเปื่อยยุ่ยง่ายต่อการติดต่อของโรค

ดังนั้นในการดำเนินการเพื่อการควบคุมและป้องกันโรค ต้องดำเนินการควบคู่กันไปพร้อมกันหลายๆด้าน ทั้งการลดและกำจัดสัตว์ที่เป็นรังโรค เพื่อลดการแพร่กระจายของเชื้อและการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคในคน เช่น การทำลายสัตว์ที่เป็นรังโรค การกำจัดสัตว์ที่เป็นพาหะของเชื้อเลปโตสไปร่าโดยเฉพาะหนู การสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันโรคในปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยง เพื่อลดอัตราการติดเชื้อ ลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจจากผลผลิตของสัตว์ที่ลดลง และที่สำคัญคือช่วยลดอัตราการขับเชื้อของสัตว์ที่ติดเชื้อ ในพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดของโรค ควรมีมาตรการในการจำกัดพื้นที่การเลี้ยงสัตว์ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม และลดอัตราการแพร่กระจายของเชื้อ ซึ่งจะทำให้การควบคุมและป้องกันโรคนั้นมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การป้องกันโรคในคนนั้นต้องดำเนินการเผยแพร่ถ่ายทอดความรู้ในแก่ประชาชนทั่วไป โดยเฉพาะเกษตรกรซึ่งเป็นประชากรกลุ่มเสี่ยงต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทย ให้รู้ถึงวิธีในการป้องกันโรค เช่น การสวมใส่ถุงมือ รองเท้าบู๊ทในการทำกิจกรรมต่างๆที่ต้องสัมผัสน้ำ การจัดสุขาภิบาลที่ดีในบ้านและโรงเรือนเลี้ยงสัตว์ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่า เป็นต้น

2.6 การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสมีประโยชน์อย่างมากต่อการวางแผนในการป้องกันและควบคุมโรค เนื่องจากการเกิดโรคในคนและในสัตว์ไม่แสดงอาการทางคลีนิกที่ชัดเจนทำให้ยากต่อการค้นหาผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย เนื่องจากการติดเชื้อในคนมีลักษณะอาการทางคลีนิคคล้ายคลึงกับโรคติดเชื้อฮานตาไวรัส (hanta virus infection) สครับไทฟัส หรือไข้หวัดใหญ่เป็นต้น และการติดเชื้อในสัตว์เฉพาะในรายที่เกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงและเฉียบพลันเท่านั้นจึงจะแสดงอาการของโรคชัดเจนซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับ โรคพยาธิในเม็ดเลือด (blood parasites) ดังนั้นในการวินิจฉัยโรคจึงมีความสำคัญมากต่อการค้นหาผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย การศึกษาทางระบาดวิทยา และการป้องกันโรค

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส แบ่งวิธีการวินิจฉัยได้ 2 ลักษณะที่สำคัญคือ การตรวจหาแอนติเจน (Antigen) เป็นการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งส่งตรวจโดยตรง และการตรวจทางซีโรโลยี (serology) เป็นการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อเลปโตส-ไปร่า

2.6.1 การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่า (Antigen detection)

2.6.1.1 การตรวจหาเชื้อจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง (direct examination) เป็นการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เลือด น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะหรือน้ำในช่องท้องโดยตรงผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด หรือการย้อมด้วยสารซิลเวอร์ (Silver impregnation) เป็นวิธีการตรวจที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน แต่ในสิ่งส่งตรวจนั้นต้องมีปริมาณเชื้อมากเพียงพอ (Alexander,1980) แต่การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มักก่อให้เกิดความผิดพลาดสูง เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อกับสิ่งปลอมปน (artifact) ในปัสสาวะได้ ซึ่งต้องใช้นักปฏิบัติการที่มีประสบการณ์และความเชี่ยวชาญในการตรวจ (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พูลสุขสมบัติ,1998; Plank and Dean,2000)

2.6.1.2 การเพาะเชื้อ (culture) การเพาะเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบคทีเรีย แต่เนื่องจากการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่านั้นทำได้ยาก ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายสูง จึงมิได้ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน (Faine et al., 1999) วิธีการเพาะเชื้อสามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าได้จากสิ่งส่งตรวจ เช่น อวัยวะภายในของร่างกาย ได้แก่ ตับ ปอด สมอง ของเหลวในร่างกาย เช่น เลือด น้ำนม น้ำไขสันหลัง น้ำในช่องอกหรือช่องท้อง โดยสามารถตรวจได้ในระยะที่มีการติดเชื้อในกระแสโลหิต ในช่วงเวลา 2-3 วันแรกของการติดเชื้อหรือในสัตว์ที่แสดงอาการของโรคแบบเฉียบพลัน (acute infection) แต่หากเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าได้จากไต น้ำปัสสาวะ น้ำเชื้อสัตว์เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์ เช่น มดลูก รังไข่ หรือเนื้อเยื่อตัวอ่อนหรือรกที่แท้ง นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิการเก็บรักษาอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแยกกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคและไม่ก่อโรคได้โดยกลุ่มเชื้อที่ไม่ก่อโรค (*L.biflexa)* จะเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 13 °C แต่เชื้อเลปโตสไปร่ากลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค (*L.interogans)* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมินี้ (Waitkins,1985) อีกทั้งในสิ่งส่งตรวจต้องมีปริมาณหรือความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เหมาะสมจึงจะทำให้การเพาะเชื้อนั้นประสบความสำเร็จ โดยในสิ่งส่งตรวจนั้นต้องมีความเข้มข้นอย่างน้อยประมาณ 10^8-4x10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Alexander, 1980) หรือ 6-9x10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Faine, 1982)

การเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าโดยส่วนใหญ่มักใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid media) เช่น Fletcher's medium, EMJH (Ellinghausen and McCullough medium) ที่มี rabbit serum ในปริมาณ 0.4-1% เป็นส่วนผสมที่สำคัญที่ช่วยทำให้เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถคงทนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้นานขึ้น (Faine et al., 1999) และต้องมีการควบคุมป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ โดยการเติมสารเคมีหรือยาปฏิชีวนะที่

เหมาะสม เช่น 5-fluorouracil, nalidixic acid, fosfomycin หรือส่วนผสมระหว่าง rifamycil, polymixin, neomycin, 5-fluorouracil, bacitracin และ actidione (OIE, 2000) แต่การใช้ยาหรือสารเคมีในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อนั้นอาจมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเลป-โตสไปร่าได้หากในสิ่งส่งตรวจนั้นมีจำนวนเชื้อเลปโตสไปร่าน้อย (Edler et al.,1986) หลังจากทำการเพาะเชื้อแล้วต้องเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 29-30 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 12-26 สัปดาห์ หรือ 28 สัปดาห์ เนื่องจากเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ช้ามาก (Gochenour et al.,1958) และต้องนำออกมาตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดทุกๆ 1-2 สัปดาห์ ซึ่งจะเห็นว่าการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่านั้นเป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานานเนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าเจริญได้ช้าและต้องเลือกระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปเพาะเชื้อที่เหมาะสม เนื่องจากในสัตว์หรือคนที่ติดเชื้อในระยะแรก จำนวนเชื้อที่อยู่ในกระแสเลือดจะมีระดับต่ำ ประมาณ 20,000 เซลล์ต่อปริมาณเลือด 1 มิลลิลิตร หากปล่อยให้เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น คือประมาณในวันที่ 3 หลังการติดเชื้อ จำนวนเชื้อในกระแสเลือดจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้น ประมาณ 200,000 เซลล์ต่อปริมาณเลือด 1 มิลลิลิตร จะทำให้โอกาสเพาะเชื้อประสบความสำเร็จมากขึ้นมากขึ้น แต่ต้องไม่เกิน 10 วันหลังการติดเชื้อ เนื่องจากเชื้อในกระแสเลือดจะถูกภูมิคุ้มกันร่างกายกำจัดไปและจะคงเหลืออยู่เฉพาะเชื้อที่อยู่ในไต โดยในระยะนี้สามารถเพาะเชื้อได้จากปัสสาวะหรือไตเท่านั้น (Farr, 1994)

2.6.1.3 การตรวจทางอณูชีวภาพ (molecular microbiology) เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่า โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโดยอาจเป็นดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอนเอ (RNA) ของเชื้อเลปโตสไปร่า ซึ่งสามารถตรวจได้จาก เนื้อเยื่อสมอง อวัยวะภายในของร่างกาย เช่น ไต ตับ น้ำในช่องท้องและช่องอก น้ำปัสสาวะ น้ำจาก aqueous humor น้ำไขสันหลัง และน้ำเชื้อของสัตว์เพศผู้ได้ โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่จำเพาะของเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านๆเท่าในเวลาอันสั้น หลักการสำคัญของ PCR คือ การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ที่เป็นเกลียวคู่ให้เป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน และเมื่อทำให้อุณหภูมิของปฏิกิริยาลดลง สายDNA primer ซึ่งเป็นสายที่มีลำดับนิวคลีไทด์ที่ต้องการและมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสใน DNA template ก็จะเข้ามาจับกับสาย DNA template อย่างจำเพาะ ทำให้ได้สายนิวคลีโอไทด์ 4 สาย จากนั้นเอนไซม์ DNA Polymerase จะเข้าทำปฏิกิริยาโดยเร่งปฏิกิริยาเพิ่มเบสที่ปลายข้าง 3′-end ของ primer ทำให้เกิดเป็น DNA เส้นคู่ใหม่ 2 ชุด ที่มีลำดับสารพันธุกรรมเหมือนสาย DNA template เทคนิคนี้เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA แบบทวีคูณในปริมาณ 2^n เมื่อ n เป็นรอบของปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ DNA จำนวน 2^{20} หรือประมาณ 1 ล้านเท่าของ DNA เริ่มต้น (Nuovo,1992)

เทคนิคการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูงกว่าเทคนิคอื่นๆ (Bal, et al.,1994; Merien et al, 1995; Masri et al,1997) จึงให้ผลตรวจมีความแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจวินิจฉัยโรคได้ตั้งแต่ในระยะแรกๆของการติดเชื้อ (Ramadass et al.,1997) Kee et al. (1994) สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเลปโตสไปร่าจากตัวอย่างเลือดได้ภายหลังการติดเชื้อเพียง 2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค MAT (Microscopic Agglutination Test) ที่ตรวจหาภูมิคุ้มกันของร่างกายได้หลังการติดเชื้อแล้ว 7 วัน หรือ Bal et al. (1994) สามารถตรวจหาเชื้อจากปัสสาวะได้ภายหลังการติดเชื้อ 7 วัน ซึ่งเทคนิคการตรวจด้วยวิธีนี้มีความสำคัญและมีประโยชน์มาก โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคประจำถิ่น เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยทางซีรั่มวิทยามักให้ผลระดับแอนติบอดีต่ำ ทำให้การวิเคราะห์แปรผลทำได้ยาก และเทคนิคนี้สามารถตรวจได้ตั้งแต่ในระยะแรกๆของการติดเชื้อจะทำให้การค้นหาผู้ป่วยได้รวดเร็วขึ้น และสามารถให้การรักษาได้อย่างรวดเร็วก่อนที่จะเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงขึ้น (Merien et al., 1995) การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์จะช่วยในการค้นหาสัตว์ที่เป็นสัตว์นำโรคได้ เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อโดยส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการควบคุมและกำจัดโรคในฝูง แต่เนื่องจากการตรวจด้วยเทคนิคนี้เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ต้องใช้อุปกรณ์การตรวจที่จำเพาะ มีราคาแพง และต้องใช้การตรวจในห้องปฏิบัติการเท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดในการพิจารณาเลือกใช้เทคนิคในการวินิจฉัยโรค

2.6.2 การตรวจทางซีโรโลยี (serology diagnosis)

การตรวจทางซีโรโลยีเป็นการตรวจหาระดับภูมิคุ้มกันของร่างกายหรือระดับแอนติบอดี้ (antibody) ที่มีต่อเชื้อเลปโตสไปร่า โดยสามารถตรวจพบแอนติบอดี้ชนิด IgM ได้ภายใน 7 วันหลังจากติดเชื้อ จากนั้นระดับของแอนติบอดี้จะเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในสัปดาห์ที่ 3 ระดับแอนติบอดี้นี้จะคงอยู่ได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ หลายเดือนหรือเป็นปี โดยเฉพาะแอนติบอดี้ชนิด IgG สามารถตรวจพบเป็นเวลานานหลังการติดเชื้อ พบว่าอาจอยู่ได้นานตั้งแต่ครึ่งปีจนถึง 20 ปี (Chapman et al.,1991) โคที่ติดเชื้อ *L. hardjo* สามารถตรวจระดับไตเตอร์ที่ 100-800 ได้นานกว่า 20 เดือน (Radostits et al.,1994) ซึ่งโดยทั่วไปในการตรวจเพื่อวินิจฉัยการเกิดโรคจะต้องตรวจอย่างน้อย 2 ครั้งห่างกัน 5-7 วัน (pair serum) เพื่อเปรียบเทียบระดับของแอนติบอดี้ที่เพิ่มขึ้น ในการตรวจหาระดับแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่านั้น เทคนิคที่ใช้ได้แก่ MAT (Microscopic Agglutination Test) ซึ่งองค์การอนามัยโลกถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์และคน (gold standard) เทคนิคนี้อาศัยหลักการการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน ซึ่งก็คือเชื้อเลปโตส-ไปร่าที่มีชีวิต (lived antigen) หรือเชื้อเลปโตสไปร่าที่ถูกทำให้ตายแล้วด้วยฟอร์มาลินหรือความร้อน (killed antigen) กับแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในซีรั่มที่ส่งตรวจ ผลของปฏิ

กิริยาจะทำให้เกิดการรวมกลุ่มและตกตะกอนเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดจะมีลักษณะเป็น lysis ball, star ในการใช้แอนติเจนที่มีชีวิตนั้นจะให้ผลการตรวจที่มีความไว (sensitivity) สูงกว่าการใช้แอนติเจนชนิดเชื้อตาย (Waitkins, 1985)

ในการวินิจฉัยว่าสัตว์หรือคนเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส จะพิจารณาจากระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่า ซึ่งเกณฑ์ในการตัดสินว่าสัตว์หรือคนนั้นเป็นโรค โดยทั่วไปมักตั้งเกณฑ์ที่ระดับไตเตอร์ 1:100 (Heath and Johnson,1994) เช่น Prescott et al. (1988) และ Epsi et al. (2000) สำรวจโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีโรโลยีในโคกำหนดให้โคที่เป็นโรคต้องมีระดับไตเตอร์ >1:80 ทั้งนี้ระดับแอนติบอดี้นี้ก็จะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดสัตว์และซีโรวาห์ที่ร่างกายได้รับ โดยหากเป็นการติดเชื้อเลปโตสไปร่าที่มีสัตว์นั้นเป็น maintenance host ระดับไตเตอร์ที่ได้จะมีระดับต่ำ เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าสามารถปรับตัวให้เหมาะสมต่อการอยู่รอดในร่างกายของสัตว์นั้น ทำให้การเกิดปฏิกิริยาต่อต้านหรือการกำจัดเพื่อทำลายเชื้อในร่างกายสัตว์เกิดได้น้อย เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถคงอยู่ในร่างกายนั้นได้นานและเพิ่มปริมาณเชื้อได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้นการขับเชื้อได้ของสัตว์กลุ่มนี้จะเกิดได้เป็นระยะเวลานาน แต่หากเป็นการติดเชื้อเลปโตสไปร่าในสัตว์ที่เป็น accidental host ระดับไตเตอร์ที่วัดได้จะมีระดับสูง เช่น โคที่ติด *L. icterohaemorrhagiae* ซึ่งโคเป็น accidental host ของเชื้อดังกล่าวพบว่าระดับไตเตอร์ที่วัดได้มีขนาดตั้งแต่ 1:20 ถึง 1:30,000 แต่หากเป็นการติดเชื้อ *L. hardjo* ระดับไตเตอร์ที่พบจะมีขนาดต่ำลง (Faine et al.,1999)

ทั้งนี้ในการตรวจทางซีโรโลยีเพื่อวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสนั้นยังมีข้อจำกัดหลายประการเช่น หากเป็นการติดเชื้อในระยะแรก ภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นยังมีระดับไตเตอร์ที่ต่ำทำให้ยากต่อการแปรผล หรือหากสัตว์นั้นได้รับการรักษาด้วยการฉีดยาปฏิชีวนะมาก่อน ระดับไตเตอร์ที่ได้จะมีระดับค่อนข้างต่ำ และการตรวจด้วยวิธีนี้ไม่สามารถแยกได้ว่าระดับไตเตอร์ที่ร่างกายสร้างขึ้นนั้นเกิดจากการติดเชื้อหรือการได้รับวัคซีนหรือการได้รับ passive immune จากแม่ผ่านทางนมน้ำเหลือง (Faine et al., 1999) นอกจากนี้เทคนิคการตรวจที่ต้องใช้เชื้อเลปโตสไปร่าที่มีชีวิต (live antigen) ทำให้มีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียมและการเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปร่า และอาจเป็นอันตรายต่อนักปฏิบัติการได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์ ซึ่งมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนเป็นเวลา 2-3 ปีอย่างต่อเนื่องโดยมีสมมุติฐานว่าแหล่งโรค (source of infection) ยังคงมีการวนเวียนของเชื้อเลปโตสไปร่าอยู่ในพื้นที่ ซึ่งได้แก่สัตว์ที่เป็นสัตว์รังโรคและเป็นพาหะของโรค และทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อมตามมา โดยการสำรวจหาสัตว์นำโรคเลปโตสไปโรสิส ด้วยการ

ตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสัตว์ ได้แก่ โค กระบือ สุกร สุนัข หนู และแหล่งน้ำในหมู่บ้านที่อาจมีเชื้อปนเปื้อนอยู่ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคในคนได้ โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลสำคัญในการพิจารณาแผนการควบคุมป้องกันโรคเลปโตสไปโร-สิสทั้งในสัตว์และในคนต่อไป

2.7 จุดประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสำรวจหาแหล่งโรค (source of infection) ที่เป็นสาเหตุของการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนในจังหวัดบุรีรัมย์ ทั้งในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ แหล่งน้ำต่างๆ และสัตว์ที่คาดว่าจะเป็นสัตว์นำโรคของเชื้อเลปโตสไปร่า ได้แก่ โค กระบือ สุกร สุนัข หนู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

3.1 สถานที่วิจัยและประชากรศึกษา

การเลือกพื้นที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ใช้เทคนิคการเลือกพื้นที่แบบจำเพาะเจาะจง โดยเลือกพื้นที่อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นตัวแทนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากจังหวัดบุรีรัมย์เป็นจังหวัดที่มีอัตราผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสสูงสุดเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ ที่เกิดการระบาดต่อเนื่องเป็นเวลา 4 ปีและมีแนวโน้มการระบาดรุนแรงมากขึ้น อำเภอห้วยราช มีรายงานผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสตั้งแต่ปีพ.ศ. 2539 เป็นต้นมา จากนั้นก็มีรายงานการเกิดโรคประจำทุกปีและมีอัตราการเกิดโรคสูงขึ้น โดยเฉพาะในปีพ.ศ.2542-2543 มีผู้ป่วยจำนวน 238 และ 392 รายตามลำดับ คิดเป็นอัตราป่วย 671.0 รายต่อประชากรแสนคน และ 1105.4 รายต่อประชากรแสนคน และถือว่าเป็นอัตราการป่วยที่สูงมาก (ตาราง 1) โดยเฉพาะในปีพ.ศ. 2543 ซึ่งเป็นปีที่มีอัตราการป่วยสูงสุด และมีรายงานการเกิดโรคเลปโตส-ไปโรสิสในทุกๆตำบลของอำเภอห้วยราช (สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์, อัดสำเนา)

จากการลงพื้นที่เพื่อสำรวจประชากรสัตว์และเก็บตัวอย่าง พบว่าอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ มีประชากรโคจำนวน 2,782 ตัว กระบือจำนวน 645 ตัว สุกรจำนวน 484 ตัว สุนัขจำนวน 184 ตัว ในการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาในครั้งนี้ใช้เทคนิคการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย โดยแบ่งเก็บ 2 ครั้ง ครั้งแรกในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2544 จำนวน 268 ตัวอย่าง ครั้งที่ 2 ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544 จำนวน 132 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลจำนวนผู้ป่วยและตายด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสของอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ ปี พ.ศ. 2539-2543

พ.ศ.	จำนวนป่วย	อัตราป่วยต่อประชากรแสนคน	จำนวนตาย	อัตราป่วยตาย
2539	4	11.5	0	0
2540	27	73.3	2	7.4
2541	14	40	4	28.6
2542	238	671	4	1.6
2543	392	1105.4	6	1.53

ที่มา : สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนประชากรตัวอย่างของการศึกษา

ชนิดสัตว์	จำนวน (ตัว)	ชนิดตัวอย่าง			
		ซีรั่ม	ปัสสาวะ	ไต	น้ำ
โค	188	188	98	-	-
กระบือ	89	89	47	-	-
สุกร	20	20	-	-	-
สุนัข	43	43	40	-	-
หนู	50	-	-	50	-
ตัวอย่างน้ำ	10	-	-	-	10
รวม	**400**	**340**	**185**	**50**	**10**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นที่และสภาพแวดล้อมของอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์

ภาพที่ 2 รูปแบบการดำรงชีวิตและการประกอบอาชีพที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรค

ภาพที่ 3 ลักษณะโรงเรือนและการเลี้ยงสุกรของเกษตรกรรายย่อย ในพื้นที่อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในเทคนิคลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

3.2.1.1 น้ำกลั่น

3.2.1.2 1 mM EDTA

3.2.1.3 1M TE

3.2.1.4 2.5 mM $MgCl_2$ (MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.5 10 × PCR buffer without $MgCl_2$ (MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.6 200 µM dNTPs (MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.7 10 mM Primer Lepto F (Life Technoliges,Germany)

3.2.1.8 10 mM Primer Lepto R (Life Technoliges, Germany)

3.2.1.9 Tag DNA polymerase (MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.10 Loading dye (0.2% Orange G in 50%glycerol; MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.11 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas,Germany)

3.2.1.12 TBE buffer (Solon Ind, USA)

3.2.1.13 Agarose media (FMC Bioproducts,USA)

3.2.1.14 Ethidium Bromide (0.5 mg per ml)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะสัตว์

3.2.2.1 น้ำกลั่น

3.2.2.2 Fletcher's Medium base (Difco Laboratorirs, USA)

3.2.2.3 Rabbit Serum

3.2.2.4 5-fluorouracil

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี โดยเทคนิค Microscopic Agglutination Test (MAT)

3.2.3.1. น้ำกลั่น

3.2.3.2 EMJH media (ภาคผนวก)

3.2.3.3 เชื้อเลปโตสไปร่า 24 ซีโรวาห์

3.2.3.4 PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7.4)

3.2.3.5 Rabbit Serum

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิค PCR

3.3.1.1 กระบอกเก็บปัสสาวะ ขนาด 100 มิลลิลิตร

3.3.1.2 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.1.3 Microcentrifuge tube

3.3.1.4 Single autopipette

3.3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง Centrifuge

3.3.1.6 เครื่อง Thermal cycle
(Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK.)

3.3.1.7 Microtiterflat plate

3.3.1.8 เครื่องชั่งมาตรฐาน

3.3.1.9 หลอดแก้ว ขนาด 200 มิลลิลิตร

3.3.1.10 ขวดแก้ว ขนาด 200 มิลลิลิตร

3.3.1.11 Gel box

3.3.1.12 ซี่ฟันพลาสติก

3.3.1.13 Electrophoresis chamber

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

3.3.1.15 Vortex mixer

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะของสัตว์

3.3.2.1 กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร

3.3.2.2 หลอดแก้วที่มีฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.3.2.3 ถุงพลาสติกสีดำ

3.3.2.4 กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (Darkfield microscope)

3.3.2.5 glass slide

3.3.2.6 water bath

3.3.2.7 pH meter

3.3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิค MAT

3.3.3.1 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.3.3.2 Single autopipette

3.3.3.3 Multichanel pipette

3.3.3.4 Microtiterflat plate

3.3.3.5 กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

3.3.3.6 หลอดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.3.7 เครื่องชั่งมาตรฐาน

3.3.3.8 ขวดแก้ว ขนาด 1000 มิลลิลิตร

3.3.3.9 Boiler

3.3.3.10 เครื่องอบไอน้ำความดัน

3.3.3.11 เครื่องวัด pH

3.3.3.12 Water bath

3.3.3.13 หลอดแก้ว ขนาด 5 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีการศึกษา

3.4.1 สอบถามชื่อ นามสกุล บ้านเลขที่ ของเจ้าของสัตว์ ได้แก่ โค กระบือ สุกร สุนัข พร้อมบันทึกรายละเอียดอื่นได้แก่ อายุ เพศ ลักษณะการเลี้ยง ประวัติการเจ็บป่วย แล้วทำบันทึกลงในแบบฟอร์มรายละเอียด (ภาคผนวก)

3.4.2 การเก็บตัวอย่าง

3.4.2.1 การเก็บน้ำปัสสาวะจากโคจำนวน 98 ตัวอย่าง กระบือ จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยมีวิธีทำดังนี้

ฉีดยาขับปัสสาวะ furosemide ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Nervig and Garrett,1979) เข้าเส้นเลือดจากนั้นประมาณ 20 นาทีเก็บน้ำปัสสาวะในช่วงกลาง (midsteam) ปริมาณ 60 มิลลิลิตรในกระบอกเก็บปัสสาวะ แล้วหยดน้ำปัสสาวะปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อทำการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่า น้ำปัสสาวะที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรค ด้วยเทคนิค PCR ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

3.4.2.2 การเก็บน้ำปัสสาวะจากสุนัขจำนวน 40 ตัวอย่าง โดยมีวิธีทำดังนี้

ฉีดยาขับปัสสาวะ furosemide ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Nervig and Garrett,1979) เข้าเส้นเลือดจากนั้นประมาณ 10 นาทีใช้ท่อสวนปัสสาวะ (catheter) สวนผ่านทางท่อปัสสาวะเพื่อเก็บน้ำปัสสาวะจากกระเพาะปัสสาวะ เป็นปริมาตร 60 มิลลิลิตรในกระบอกเก็บปัสสาวะ แล้วหยดน้ำปัสสาวะปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้เพื่อทำการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่า น้ำปัสสาวะที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรค ด้วยเทคนิค PCR ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

3.4.2.3 การเก็บตัวอย่างซีรั่มจากโคจำนวน 188 ตัวอย่าง กระบือ จำนวน 89 ตัวอย่าง และสุกรจำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค Microscopic Agglutination Test (MAT) โดยการเจาะเลือดที่เส้นเลือดใหญ่บริเวณลำคอ (jugular vein) ปริมาณ 10 มิลลิลิตรในหลอดพลาสติกที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บซีรั่ม ซีรั่มที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อตรวจในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.4.2.4 การเก็บตัวอย่างซีรั่มจากสุนัขจำนวน 43 ตัวอย่าง เพื่อตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT โดยการเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำของขาหน้า (cephalic vein) ปริมาณ 10 มิลลิลิตรในหลอดพลาสติกที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บซีรั่ม ซีรั่มที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 °C เพื่อตรวจในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.4.2.5 การเก็บตัวอย่างไตหนู ซึ่งเป็นหนูหริ่งนาหางสั้นจำนวน 50 ตัวอย่าง เพื่อนำมาเพาะเชื้อและตรวจ PCR หาเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรค ดังนี้

ทำให้หนูตายโดยการดมสลบด้วยสารละลายอีเธอร์ จากนั้นเปิดผ่าหน้าท้องด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ตัดเก็บไตทั้ง 2 ข้างมาบดกับสารละลาย PBS ให้เนื้อไตแตก จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที ดูดสารละลายด้วย pasture pipette หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อตรวจ PCR ในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.4.2.6 การเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อเพาะเชื้อและตรวจ PCR หาเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรค ดังนี้

สุ่มเก็บน้ำจากแหล่งน้ำสาธารณะ แอ่งน้ำตามบริเวณทุ่งนา รอบๆหมู่บ้าน ซึ่งเป็นแหล่งน้ำที่สงสัยว่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะสัตว์นำโรค แหล่งละ 1 ตัวอย่าง จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเก็บในช่วงเช้าตรู่ของวัน เก็บในบริเวณริมหรือขอบบ่อและมีร่มเงาจากต้นไม้บัง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาเชื้อเลปโตสไปร่าตายจากความร้อน และเก็บแหล่งละ 2-3 จุดให้มีปริมาตรน้ำรวมกัน 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดน้ำปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อตรวจ PCR ในห้องปฏิบัติการต่อไป

3.5 การตรวจวิเคราะห์

3.5.1 Microscopic Agglutination Test (MAT)

3.5.1.1 วิธี screening test

3.5.1.1.1 เจือจางซีรั่มให้เป็น 1: 10 ด้วยสารละลาย PhosphateBuffer Saline (PBS) pH 7.4

3.5.1.1.2 ใส่ซีรั่มที่เจือจางแล้วใน Microtitreflat plate 24 หลุม (ภาพที่ 4)

3.5.1.1.3. เติมแอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าที่ใช้ทดสอบจำนวน24 ซีโรวาห์ (ตารางที่ 3) โดยแอนติเจนเหล่านี้ถูกเพาะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH media ที่มีอายุประมาณ 4-7 วัน ที่ความเข้มข้น 1-2×10^8 leptospire/ml

3.5.1.1.4. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 90 นาที

3.5.1.1.5. อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดดังนี้

ผลบวก : จะเกิดปฏิกิริยาลักษณะการเกาะกลุ่มตั้งแต่ 50% ขึ้นไป (ภาพที่ 6) (โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ) หลังจากนั้นนำไปทดสอบหาไตเตอร์ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดนั้นต่อไป (Titer test)

3.5.1.2 การตรวจวิธี Titer test

3.5.1.2.1. เจือจางซีรั่มให้เป็น 1:20, 1:40, 1:80, 1:160… (ภาพที่ 5) จากนั้นเติมซีรั่มที่เจือจางแล้วปริมาตร 25 ไมโครลิตรใน Microtitreflat plate

3.5.1.2.2. เติมแอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดที่ให้ปฏิกิริยาเกาะกลุ่มในการทดสอบ screening test ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

3.5.1.2.3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 90 นาที

3.5.1.2.4. อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเชื้อผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด โดยมีเกณฑ์การพิจารณาตาม OIE (2000) ดังนี้

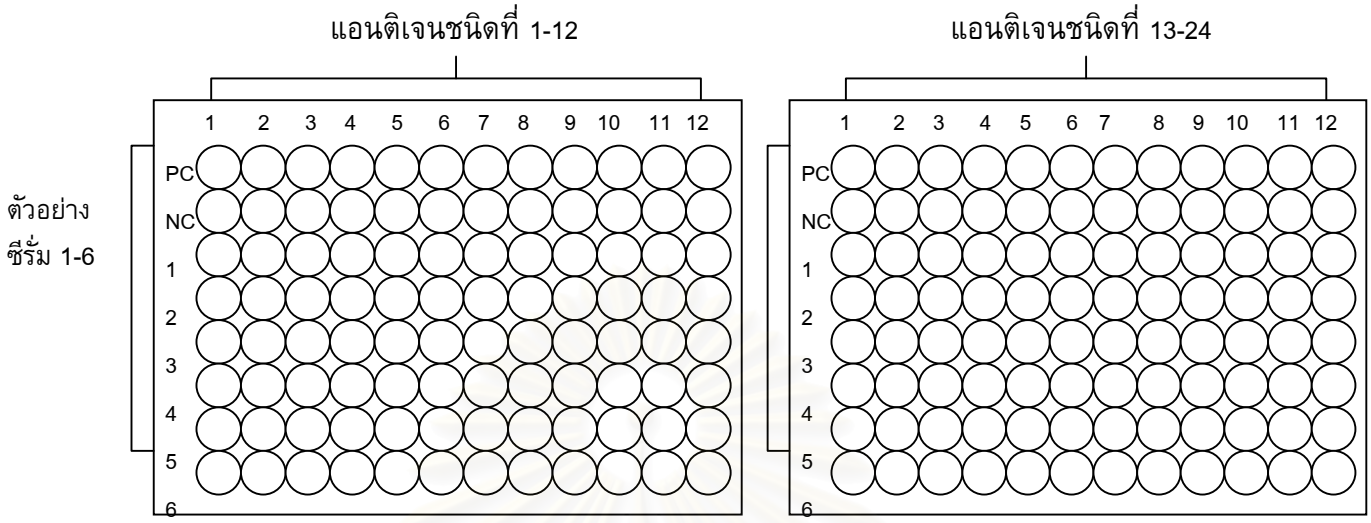
4+ = เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม 100% โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ

3 + = เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม 75% ขึ้นไปโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ

2+ = เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม 50% ขึ้นไปโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ

1+ = เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม 25% โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ

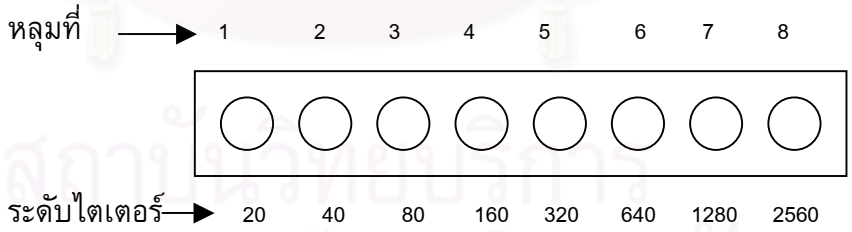
ผลบวก : ซีรั่มที่เกิดปฏิกิริยาระดับ 2+ ขึ้นไปและซีรั่มเจือจางสูงสุดที่ให้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอนถือว่าเป็นค่า end point



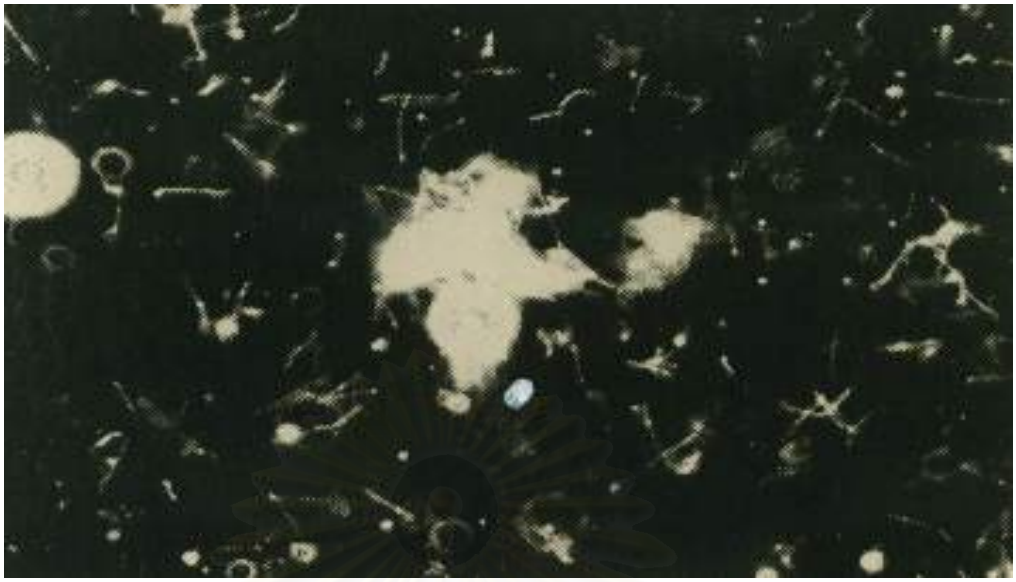
PC : ตัวควบคุมบวก (Positive control)

NC: ตัวควบคุมลบ (Negative control)

ภาพที่ 4 แสดงการทำ screening test ด้วยเทคนิค MAT



ภาพที่ 5 แสดงการทำ Titer Test ด้วยเทคนิค MAT



ภาพที่ 6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและตกตะกอนของเชื้อเลปโตสไปร่า ด้วยเทคนิค MAT

ภาพที่ 7 แสดงผลการไม่เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มและตกตะกอนของเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT

ตารางที่ 3 แสดงชนิดซีโรวาร์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจ MAT ที่ใช้ในการตรวจทางห้องปฏิบัติการสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ (ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ, 2000)

ซีโรวาห์ (serovar)	ซีโรกรุ๊ป (serogroup)
1. bratislava	1. Australis
2. autumnalis	2. Autumnalis
3. ballum	3. Ballum
4. batavia	4. Batavia
5. canicola	5. Canicola
6. celledoni	6. Celledoni
7. cynopteri	7. Cynopteri
8. djasiman	8. Djasiman
9. grippotyphosa	9. Grippotyphosa
10. hebdomadis	10. Hebdomadis
11. icterohaemorrhagiae	11. Icterohaemorrhagiae
12. javanica	12. Javanica
13. louisiana	13. Louisiana
14. manhao	14. Manhao
15. mini	15. Mini
16. panama	16. Panama
17. pomona	17. Pomona
18. pyrogenes	18. Pyrogenes
19. ranarum	19. Ranarum
20. samin	20. Samin
21. sejroe	21. Sejroe
22. shermani	22. Shermani
23. tarassovi	23. Tarassovi
24. patoc	24. Semanranga

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.5.2.1.การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปัสสาวะ

3.5.2.1.1 เทตัวอย่างปัสสาวะในกระบอก Centrifuge tube ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.5.2.1.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.5.2.1.3 เทน้ำที่เป็นส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1 mM EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

3.5.2.1.4 นำไปปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.5.2.1.5 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

3.5.2.1.6 นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.5.2.1.7 เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย 1M TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นาน 1 นาที

3.5.2.1.8 ต้มหลอดตัวอย่างในน้ำเดือดที่ 100 °C นาน 10 นาที และตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการตรวจในขั้นต่อไปและลดปฏิกิริยาของสารยับยั้งตามธรรมชาติ (natural inhibitor)

3.5.2.2.การทำ PCR Product

3.5.2.2.1 เตรียม Polymerase Chain Reaction reaction mixture ปริมาตร 18 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบสารละลายดังนี้

- น้ำกลั่น	12.3 ไมโครลิตร
- 2.5 mM $MgCl_2$	2.0 ไมโครลิตร
- 10 XPCR buffer	2.0 ไมโครลิตร
- 5 mM dNTPs	0.8 ไมโครลิตร
- 10 mM Primer Lepto F	0.4 ไมโครลิตร
- 10 mM Primer Lepto R	0.4 ไมโครลิตร
- Tag DNA polymerase	0.1 ไมโครลิตร

3.5.2.2.2 เติมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างปัสสาวะ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงใน Microcentrifuge tube นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากันโดยการใช้ autopipette ดูดขึ้นลงหลายครั้ง

3.5.2.2.3 นำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycle ซึ่งตั้งอุณหภูมิและเวลาการทำงานไว้ดังนี้

เริ่มต้นที่ initial denaturation 94 °C นาน 3 นาที

จากนั้นเริ่ม PCR cycle ดังนี้

- Denaturation 94 °C นาน 1 นาที
- Primer annealing 60 °C นาน 1 นาที
- Primer extension 72 °C นาน 1 นาที

จำนวน 30 รอบรอบสุดท้ายจะคงอุณหภูมิอยู่ที่ 72 °C นาน 10 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยา extension สมบูรณ์ขึ้นแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการลดอุณหภูมิเป็น 4 °C โดย primer ที่ใช้มีความจำเพาะ (specificity) ต่อลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic *Leptospira spp.)* 27 ซีโรวาห์ (ภาคผนวก) ซึ่ง primer นี้มีลำดับเบสดังนี้

Lepto-R : 5’-TCY-GAG-TCT-GGG-ATA-ACT-TTC-C

Lepto-F : 5’-GTA-CCA-TCA-CAT-YGC-TG

3.5.2.3 การตรวจวิเคราะห์ PCR Product โดยการแยกขนาด DNA ในเจลภายใต้กระแสไฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis)

3.5.2.3.1 เตรียม Agarose gel เข้มข้น 0.8% ในสารละลาย TBE โดยต้มเจลจนละลายหมด จากนั้นเทเจลขณะกำลังเดือดลงใน chamber ให้ท่วมและให้เจลมีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร

3.5.2.3.2 ดูด DNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วจาก PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิน แล้วหยอดส่วนผสมทั้งหมดในช่องของเจลที่เตรียมไว้ในข้อ 1

- ช่องแรก หยอด DNA มาตรฐานเพื่อให้เป็น marker ในการศึกษานี้ใช้ λHind ||| ขนาด 100 bp

- ช่องก่อนสุดท้ายและช่องสุดท้าย ทำ positive control และ negative control

3.5.2.3.3 ต่อกระแสไฟฟ้าตรงเข้ากับ chamber ให้ด้านที่มีตัวอย่าง DNA อยู่ทางขั้วลบ ปรับกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์คงที่ ที่ 100 โวลต์ ใช้เวลาประมาณ 45 นาที เมื่อสีของ loading dye วิ่งไปอยู่ริมด้านตรงข้าม ให้หยุดกระแสไฟฟ้า

3.5.2.3.4 ตักเจลออกจาก chamber นำไปแช่ในสารละลาย Ethidium bromide นานประมาณ 15 นาที ตักออกแล้วน้ำไปล้างในน้ำกลั่น

3.5.2.3.5 ตรวจดูแถบของ DNA โดยการดูการเรืองแสงภายใต้แสง UVบันทึกผลโดยการถ่ายภาพโพลารอยด์

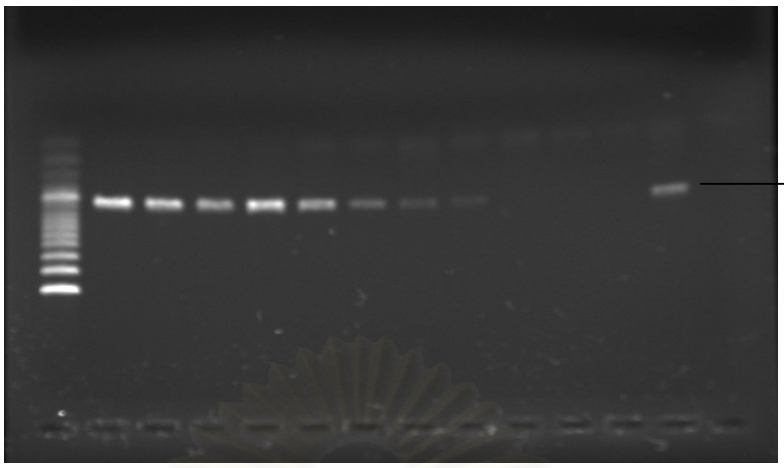
การอ่านผล : ผลบวก พบ specific band ที่ 343 bp เปรียบเทียบขนาดกับ DNA size marker

ผลลบ ไม่พบ specific band ที่ 343 bp เปรียบเทียบขนาดกับ DNA size marker (อลงกร อมรศิลป์, อัดสำเนา)

การทดสอบความไวในการตรวจ (sensitivity test)

ด้วยการใช้เชื้อ *L.icterohaemorrhagiae* ATCC 43642 นำมาวัดจำนวนเซลล์ โดยทำ ten-fold dilution ให้สารละลายนั้นมีเชื้อเลปโตสไปร่าในขนาด 5×10^{8}, 5×10^{7}, 5×10^{6},5×10^{5}, 5×10^{4}, 5×10^{3}, 5×10^{2}, 50, 5, 0.5, 0.05 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร (ภาพที่ 8) จากนั้นนำไปสกัด DNA และวิเคราะห์หา PCR product ตามวิธีข้างต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



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

ภาพที่ 8 แสดงผลการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *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 ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่างๆกัน ตามลำดับดังนี้ 5×10^{8}, 5×10^{7}, 5×10^{6}, 5×10^{5}, 5×10^{4}, 5×10^{3}, 5×10^{2}, 50, 5, 0.5, 0.05 เซลล์ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร โดยเรียงจากซ้ายไปขวา

Lane + คือ ตัวควบคุมชนิดบวก

Lane - คือ ตัวควบคุมชนิดลบ

3.5.3 การเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะสัตว์

3.1 หยดน้ำปัสสาวะปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว Fletcher´s semisolid medium ทันที ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3.2 ปิดหลอดฝาเกลียวให้สนิท จากนั้นใช้ถุงดำคลุมเพื่อป้องกันแสง เก็บไว้ที่ห้องอุณหภูมิ 28-30 °C

3.3 ตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยดูลักษณะรูปร่างและการเคลื่อนที่ของเชื้อเลปโตสไปร่า

การอ่านผล :

ผลบวก คือ เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด จะพบเชื้อเลปโตสไปร่าที่มีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ เคลื่อนไหวรวดเร็ว

ผลลบ คือ ไม่พบการเจริญเติบโตและไม่พบมีเชื้อเลปโตสไปร่าในอาหารเลี้ยงเชื้อนับตั้งแต่วันเริ่มเพาะแยกเชื้อจนถึงสัปดาห์ที่ 12

3.6 สถิติที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา (Descriptive Study) ซึ่งประกอบไปด้วยการหาความถี่ของการเกิดโรค ความชุกของโรค และระดับภูมิคุ้มกันต่อโรคเลปโตสไปโรสิสในโค กระบือ สุกร สุนัข และหนู จะสามารถเสนอข้อมูลในลักษณะของ Geometric Mean นอกจากนี้ยังสามารถอธิบายลักษณะการเกิดโรคได้ในรูปแบบของการกระจายตัวของโรคในพื้นที่ ไม่ว่าจะเป็น คน สัตว์หรือสิ่งแวดล้อมเพื่อนำมาประกอบการอธิบายการระบาดของโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

จากการสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างในบริเวณ อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ พบว่าลักษณะพื้นที่โดยทั่วไปเป็นที่ราบ ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพเกษตรกรรมทำนาและเลี้ยงสัตว์ปศุสัตว์ที่เลี้ยงได้แก่ โค กระบือ จุดประสงค์ของการเลี้ยงเพื่อเสริมรายได้จากการทำนา ซึ่งแตกต่างจากอดีตที่มีจุดประสงค์ของการเลี้ยงเพื่ออาศัยแรงงาน แต่ปัจจุบันการทำไร่นาอาศัยเครื่องจักรกลเป็นส่วนใหญ่ การใช้โค กระบือในการทำนามีให้เห็นเป็นส่วนน้อยมาก การเลี้ยงจะเลี้ยงกันครอบครัวละประมาณ 3-4 ตัว จะมีน้อยรายที่เลี้ยงอย่างจริงจังเป็นฝูงใหญ่ๆ เกษตรกรจะทำโรงเรือนหรือคอกสัตว์อยู่ในบริเวณบ้านหรือใต้ถุนบ้าน ในฤดูทำนา โค กระบือจะถูกเลี้ยงแบบขังคอกมากกว่าการเลี้ยงปล่อยในทุ่งหญ้า ทั้งนี้เพื่อป้องกันความเสียหายของนาไร่จากการถูกเหยียบย่ำ ดังนั้นโค กระบือเหล่านี้จะถูกเลี้ยงในบริเวณบ้าน และพื้นที่สาธารณะเป็นส่วนใหญ่ การเลี้ยงในพื้นที่นามักทำกันหลังฤดูกาลเก็บเกี่ยว เกษตรกรในบริเวณพื้นที่ที่ทำการศึกษานี้จะเลี้ยงสุกรเป็นอาชีพเสริมจากการทำนา โดยเฉลี่ยครอบครัวละ 4-5 ตัว มีลักษณะการเลี้ยงสุกรเป็นแบบหลังบ้าน (backyard) ส่วนสุนัขจะถูกเลี้ยงปล่อยตามธรรมชาติได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าปีละครั้ง ไม่เคยได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส

4.1 ผลการศึกษาในโค การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และตรวจวัดระดับไตเตอร์ด้วยเทคนิค MAT

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะของโคด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ ให้ผลลบทั้งหมด ส่วนการตรวจหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT นั้นพบผลบวกอยู่จำนวน 21 ตัวอย่างจากตัวอย่างจากตัวอย่างโคทั้งหมด 188 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.1 (ตารางที่ 4) โดยระดับไตเตอร์ที่พบอยู่ในระหว่าง 1:20 ถึง 1:40

จาก 21 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกพบว่าโคมีแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตส-ไปร่า *L. ballum* 42% (9/21) รองลงมาได้แก่ *L. bratislava* 19% (4/21) *L. sejroe* 14.2%(3/21) เท่ากับ *L. patoc* นอกจากนี้ยังพบมีแอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อ *L. hebdomaldis* 4.7%(1/21) และ *L. tarassovi* 4.7%(4/21) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะโคด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
MAT	188	21	11.1
การเพาะเชื้อ	93	0	0
PCR	98	0	0

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของโคด้วยเทคนิค MAT

ซีโรวาห์ที่ตรวจพบ	ระดับไตเตอร์			รวม	ร้อยละชนิด
	1:20	1:40	1:80		
L.bratislava	4	0	0	4	19
L.ballum	8	1	0	9	42
L.hebdomadis	1	0	0	1	4.7
L.sejroe	0	3	0	3	14.2
L.tarassovi	1	0	0	1	4.7
L.patoc	2	1	0	3	14.2
รวม	**16**	**5**	**0**	**21**	**100**

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 ผลการศึกษาในกระบือ การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และตรวจวัดระดับไตเตอร์ด้วยเทคนิค MAT

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะของกระบือด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อนั้น ให้ผลลบทั้งหมด สำหรับการตรวจเพื่อหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT นั้นพบว่ามีผลบวกจำนวน 12 ตัวอย่างจากตัวอย่างกระบือจำนวน 89 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.48 (ตารางที่ 6) ระดับไตเตอร์ที่พบอยู่ในระดับ 1:20,1:40,1:80 และ 1:160

จาก 12 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกพบว่ากระบือมีแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่า *L. ballum* 42%(8/12) รองลงมาได้แก่ *L. bratislava, autumnalis, mini* และ *patoc* 5.2%(1/12) (ตารางที่ 7) และผลการตรวจพบว่ากระบือที่ให้ผลบวกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า 4 ซีโรวาห์ มีจำนวน 1 ตัวอย่าง 3 ซีโรวาห์ 1 ตัวอย่าง 2 ซีโรวาห์ 2 ตัวอย่าง นอกนั้นให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ 1 ซีโรวาห์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะกระบือด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
MAT	89	12	13.48
การเพาะเชื้อ	48	0	0
PCR	47	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของกระบือ ด้วยเทคนิค MAT

ซีโรวาห์ที่ตรวจพบ	ระดับไตเตอร์				รวม	ร้อยละชนิด
	1:20	1:40	1:80	1:160		
L.bratislava	0	1	0	1	2	10.5
L.autumnalis	1	1	0	0	2	10.5
L.ballum	5	2	1	0	8	42.1
L.bataviae	0	0	1	0	1	5.2
L.hebdomadis	1	0	0	0	1	5.2
L.icterohaemorrhagiae	1	0	0	0	1	5.2
L.javanica	2	0	0	0	2	10.5
L.mini	1	0	0	0	1	5.2
L.patoc	1	0	0	0	1	5.2
รวม	**12**	**4**	**2**	**1**	**19**	**100**

ตารางที่ 8 แสดงผลการตรวจภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าในกระบือด้วยเทคนิค MAT ที่ระดับไตเตอร์ ≥ 1:20

จำนวนซีโรวาห์ที่ตรวจพบในสัตว์ 1 ตัว	จำนวน (ตัว)	ร้อยละ
ตรวจพบ 1 ซีโรวาห์	8	66.6
ตรวจพบ 2 ซีโรวาห์	2	16.6
ตรวจพบ 3 ซีโรวาห์	1	8.3
ตรวจพบ 4 ซีโรวาห์	1	8.3
รวม	**12**	**100**

4.3 ผลการศึกษาในสุกร การตรวจหาแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT

การศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถเก็บปัสสาวะของสุกรได้เนื่องจากปัสสาวะถูกปนเปื้อนด้วยดิน โคลน และอุจจาระสุกรจากพื้นคอกจำนวนมาก ดังนั้นการศึกษาในสุกรจึงเป็นการศึกษาวัดระดับของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าเท่านั้น และตรวจพบว่าให้ผลบวกต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT 3 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราการติดเชื้อ 15% มีระดับไตเตอร์ 1:20 เท่านั้น แอนติบอดี้ที่พบเป็นแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *L.hebdomadis* และ *mini* (ตารางที่ 9 และ ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 แสดงผลอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุกร

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
MAT	20	3	15

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุกร ด้วยเทคนิค MAT

ซีโรวาห์ที่ตรวจพบ	ระดับไตเตอร์				รวม	ร้อยละชนิด
	1:20	1:40	1:80	1:160		
L.hebdomadis	2	0	0	0	2	66.6
L.mini	1	0	0	0	1	33.3
รวม	**3**	**0**	**0**	**0**	**3**	**100**

4.4 ผลการศึกษาในสุนัข การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT

การตรวจเพื่อหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสุนัขด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ ให้ผลลบทั้งหมด แต่ในการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT นั้นพบว่าให้ผลบวก 2 ตัวอย่างคิดเป็นอัตราการติดเชื้อ 4.65%(2/43) โดยเป็นการติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* ทั้งหมดและมีระดับไตเตอร์ที่ค่อนข้างสูง คือ 1:80 ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยมี 1 ตัวอย่างที่ติดเชื้อ 3 ซีโรวาห์ คือ *L.icterohaemorrhagiae, autumnalis* และ *ballum* (ตารางที่ 11 และตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสุนัขด้วยเทคนิค PCR การเพาะเชื้อ และ MAT

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
MAT	43	2	4.65
การเพาะเชื้อ	40	0	0
PCR	39	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุนัข ด้วยเทคนิค MAT

ซีโรวาห์ที่ตรวจพบ	ระดับไตเตอร์				รวม	ร้อยละ
	1:20	1:40	1:80	1:160		
L.icterohaemorrhagiae	0	0	2	0	**2**	50
L.autumnalis	1	0	0	0	**1**	25
L.ballum	0	1	0	0	**1**	25

4.5 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในไตหนูด้วยเทคนิค PCRและการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างหนูทั้งหมด 50 ตัว เป็นหนูหริ่งนาหางสั้น (*Mus cervicolor*) เป็นหนูขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ตามยุ้งฉางข้าว (ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ,1988) ในการตรวจหาเชื้อเลป-โตสไปร่าในไตหนูด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อนั้น ให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด

ตารางที่ 13 แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในไตหนูด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
การเพาะเชื้อ	50	0	0
PCR	50	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ผลการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าในน้ำด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ

ตัวอย่างน้ำที่ได้เป็นการสุ่มเก็บจากแหล่งน้ำที่สงสัย ได้แก่บริเวณที่เป็นน้ำขังตามแอ่งรอบๆคันนา บ่อหรือหนองน้ำสาธารณะ คลองชลประทาน ปลักควาย จำนวนทั้งหมด 10 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรคและอาจมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรือแหล่งน้ำเหล่านั้น ผลการตรวจด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อพบให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด

ตารางที่ 14 แสดงผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในน้ำด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ

เทคนิคการตรวจ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนผลบวก	ร้อยละ
การเพาะเชื้อ	10	0	0
PCR	10	0	0

4.7 ผลการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT

จากผลการตรวจเพื่อหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่านั้น พบว่าจากจำนวนตัวอย่างที่ตรวจทั้งหมด 340 ตัวอย่าง ให้ผลบวกต่อการตรวจ 38 ตัวอย่าง เฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 11.1 และพบว่าสุกรมีอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่าสูงสุด 15% รองลงมาได้แก่ กระบือ 13.4% โค 11.1% สุนัข 4.6% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 แสดงผลการตรวจหาอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT

ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	ผลบวก	ร้อยละ
โค	188	21	11.1
กระบือ	89	12	13.4
สุกร	20	3	15
สุนัข	43	2	4.6
รวม	**340**	**38**	**11.1**

สัตว์ในพื้นที่ส่วนใหญ่มีอัตราการติดเชื้อ *L. ballum* สูงสุด 38.7%(18/340) รองลงมาได้แก่ *L bratislava* 12.7%(6/340) *L. hebdomadis, patoc* เท่ากันคือ 8.5%(4/340) และการติดเชื้อเลปโตสไปร่าซีโรวาห์อื่นๆเช่น *L. autumnalis*, *bataviae*, *javanica*, *mini*, *icterohaemorrhagiae*, *sejroe* และ *tarassovi* มีอัตราการติดเชื้อค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 16) ซึ่งระดับไตเตอร์ที่พบโดยส่วนใหญ่มีระดับไตเตอร์ที่ 1:20 คิดเป็น 68% ระดับไตเตอร์ที่ 1:40 คิดเป็น 21.3% ระดับไตเตอร์ที่ 1:80 คิดเป็น 8.5 % ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก พบเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่มีระดับไตเตอร์ที่ 1:160 คิดเป็น 2.1 % ของจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดงชนิดซีโรวาห์และระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค MAT

ชนิดซีโรวาห์	จำนวนตัวอย่าง	ระดับไตเตอร์				รวม	ร้อยละ
		1:20	1:40	1:80	1:160		
L.bratislava	340	4	1	0	1	6	12.7
L.autumnalis	340	2	1	0	0	3	6.3
L.ballum	340	13	4	1	0	18	38.2
L.bataviae	340	0	0	1	0	1	2.1
L.hebdomadis	340	4	0	0	0	4	8.5
L.icterohaemorrhagiae	340	1	0	2	0	3	6.3
L.javanica	340	2	0	0	0	2	4.2
L.mini	340	2	0	0	0	2	4.2
L.sejroe	340	0	3	0	0	3	6.3
L.tarassovi	340	1	0	0	0	1	2.1
L.patoc	340	3	1	0	0	4	8.5
ร้อยละ		68	21.2	8.5	2.1	100	

4.8 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะและน้ำด้วยเทคนิค PCR

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดที่ก่อให้เกิดโรค (*Leptospira interogans*) จากปัสสาวะสัตว์ ไตหนูและตัวอย่างน้ำ ให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมดจากตัวอย่างจำนวน 244 ตัวอย่าง (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 แสดงผลการตรวจเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสัตว์ด้วยเทคนิค PCR

ชนิดสัตว์	จำนวนตัวอย่าง	ผลบวก	ร้อยละ
โค	98	0	0
กระบือ	47	0	0
สุนัข	39	0	0
หนู	50	0	0
น้ำ	10	0	0
รวม	**244**	**0**	**0**

4.9 ผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะด้วยเทคนิคเพาะเชื้อ

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดที่ก่อให้เกิดโรค (*Leptospira interogans*) โดยการเพาะเชื้อจากปัสสาวะและเนื้อเยื่อของสัตว์และตัวอย่างน้ำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Fletcher's semisolid media) ให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด จากตัวอย่างจำนวน 244 ตัวอย่าง รายละเอียดตามตารางที่ 18 โดยตัวอย่างทั้งหมดนำมาตรวจหาเชื้อด้วยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศ์พื้นมืดทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

ตารางที่ 18 แสดงผลการตรวจเชื้อเลปโตสไปร่าจากปัสสาวะด้วยเทคนิคเพาะเชื้อ

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ผลบวก	ร้อยละ
โค	93	0	0
กระบือ	48	0	0
สุนัข	40	0	0
หนู	50	0	0
น้ำ	10	0	0
รวม	**241**	**0**	**0**

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การสำรวจพื้นที่ที่ศึกษาเพื่อเก็บตัวอย่างจากสัตว์นั้น จำเป็นต้องได้รับความร่วมมือจากเจ้าหน้าที่ปศุสัตว์ในพื้นที่และเกษตรกรเจ้าของสัตว์ การนัดหมายกับบุคคลเหล่านี้เพื่อเก็บตัวอย่างจากพื้นที่จึงเป็นข้อจำกัดและส่งผลให้ผู้วิจัยไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้หลายช่วง

จำนวนโคที่ศึกษาทั้งหมดจำนวน 188 ตัว เก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยการเพาะเชื้อ 93 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคPCR 98 ตัวอย่าง สาเหตุเนื่องจากโคบางตัวมีนิสัยตื่นกลัวทำให้เก็บปัสสาวะไม่ได้ หรือได้ในปริมาณน้อยไม่สามารถที่จะตรวจด้วยเทคนิค PCR ได้และบางตัวอย่างปัสสาวะเก็บไว้นานเกิน 6 ชั่วโมง มีผลทำให้เชื้อเลป-โตสไปร่าในปัสสาวะตายไม่สามารถเพาะเชื้อได้ เช่นเดียวกับในกระบือที่ศึกษาทั้งหมด 89 ตัว สามารถเก็บปัสสาวะเพื่อตรวจการเพาะเชื้อ 48 ตัวอย่าง และเทคนิค PCR 47 ตัวอย่าง สุนัขจำนวน 43 ตัว เก็บปัสสาวะเพื่อเพาะเชื้อได้ 40 ตัวอย่าง เนื่องจากเป็นสุนัขเพศเมีย เทคนิคการสวนปัสสาวะทำได้ยาก และตรวจด้วยเทคนิค PCR 39 ตัวอย่างเนื่องจากมี 1 ตัวอย่างที่ปริมาณปัสสาวะน้อยเกินไปที่จะตรวจได้ การเก็บปัสสาวะในสุกรไม่สามารถทำได้เลย เนื่องจากมีการปนเปื้อนของดินโคลนและอุจจาระจากพื้นคอกมาก สามารถเก็บซีรั่มได้ 20 ตัวอย่าง สำหรับหนูที่ศึกษาทั้งหมดเป็นหนูหริ่งหางสั้นที่อาศัยตามยุ้งฉางบริเวณบ้าน ไม่สามารถจับหรือดักหนูชนิดอื่นได้ ประกอบกับในหลายปีที่ผ่านมาชาวบ้านต่างตระหนักถึงอันตรายของโรคไข้ฉี่หนู ต่างร่วมมือในการกำจัดหนูทั้งในบ้านและตามไร่นา เช่น ปล่อยงูในท้องนาปรับระบบนิเวศน์ในพื้นที่ (ผู้ใหญ่บ้านบ้านพลวง อำเภอห้วยราช,ติดต่อส่วนตัว) ทำให้ประชากรหนูในพื้นที่มีจำนวนลดลงไม่สามารถเก็บตัวอย่างตามจำนวนที่ต้องการได้

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะสัตว์ด้วยเทคนิคการเพาะเชื้อและเทค-นิค PCR ผลการตรวจทั้ง 2 วิธีให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 17 และ 18) อาจเกิดจากในช่วงเวลาที่ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างปัสสาวะ สัตว์เหล่านั้นไม่อยู่ในช่วงระยะเวลาที่กำลังขับเชื้อออกมาโดยการขับเชื้อของสัตว์ที่ติดเชื้อโดยส่วนใหญ่จะขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะ ซึ่งจะพบได้หลังการติดเชื้อแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ (Radostits et al.,1994) และจะขับเชื้อเป็นระยะเวลานาน ลักษณะการขับเชื้อของสัตว์นำโรคจะพบเป็นช่วงๆ (intermittent period) (Lennette, 1980) ไม่ได้ขับเชื้อหรือปล่อยเชื้อพร้อมปัสสาวะได้ตลอดเวลา โดยเชื้อเลปโตสไปร่าที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นจะหลุดลอยอยู่ในท่อไตจากนั้นจะถูกขับออกจากร่างกายพร้อมปัสสาวะ (Faine, 1982; Faine et al., 1999)

ระยะเวลาที่สัตว์ขับเชื้อหรืออยู่ในระยะแพร่เชื้อนั้นแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดสัตว์ ชนิดซีโรวาห์ของเชื้อที่ร่างกายได้รับ และระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปร่า (Faine et al.,1999.) โคที่ติดเชื้อสามารถขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะได้นาน 14-241 วัน หลังการติดเชื้อ (Hellstrom and Blackmore, 1979) หรือ 542 วัน (Theirmann, 1982) หรือ 10-118 วัน (Radostits et al.1994) และจากการรายงานของ Leonard et al.(1992) ที่ศึกษาการขับเชื้อเลปโตสไปร่าของโคที่ติดเชื้อ *L. hardjo* ตามธรรมชาติและโคที่ติดเชื้อด้วยการทดลองฉีดเชื้อ พบว่าโคที่ติดเชื้อตามธรรมชาติสามารถขับได้นานประมาณ 28-40 สัปดาห์หลังการติดเชื้อและนานกว่าโคที่ติดเชื้อด้วยการทดลองที่มีระยะเวลาขับเชื้อประมาณ 26-32 สัปดาห์ สุกรสามารถขับเชื้อได้นาน 2-24 เดือน (Hanson and Ferguson,1975) ซึ่งจะเห็นว่าสัตว์ชนิดใดที่ขับเชื้อได้เป็นระยะเวลานานจะมีผลต่อระยะเวลาการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อมได้นานขึ้นและทำให้มีโอกาสแพร่เชื้อได้มากขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการขับเชื้อของสัตว์นำโรค ได้แก่การได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาและการควบคุมโรค โดยหน่วยงานในภาครัฐที่เกี่ยวข้องได้ดำเนินมาตรการต่างๆเพื่อควบคุมโรคในสัตว์ด้วยการฉีดยาปฏิชีวนะ เช่น Shotapen® LA (Benzathin Penicillin G 10^5 I.U., Procaine Penicillin G 10^5 I.U และ Dihydrostreptomycin sulfate 200 mg) (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดบุรีรัมย์, ติดต่อส่วนตัว) ยาปฏิชีวนะนั้นมีผลทำลายหรือกำจัดเชื้อเลปโตสไปร่าที่อยู่ในร่างกายและท่อไต ส่งผลให้อัตราการขับเชื้อหรือปริมาณเชื้อลดน้อยลง ทำให้ไม่สามารถเพาะเชื้อหรือตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อได้ ซึ่งในการรักษาโค กระบือ ด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น streptomycin ขนาด 12.5 mg/kg; 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน หรือการใช้ tetracycline ขนาด 10-15 mg/kg; 2 ครั้งต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 3-5 วัน นอกจากนี้อาจใช้ streptomycin ร่วมกับ ampicillin หรือ penicillin G ในการรักษาสัตว์สามารถลดอัตราการขับเชื้อได้ หรือการใช้ streptomycin ขนาด 25 mg/kg เพียงครั้งเดียวก็ทำให้มีผลลดอัตราการขับเชื้อ *L. pomona* ได้ (Gerritsen et al., 1993; Gerritsen et al., 1994) ซึ่งในการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าวทำให้ปริมาณเชื้อเลปโตสไปร่าที่ถูกขับออกมากับปัสสาวะลดลงหรือมีความเข้มข้นของเชื้อในปัสสาวะน้อยเกินไปที่จะเพาะเชื้อได้ ซึ่งในการเพาะเชื้อนั้นในสิ่งส่งตรวจควรมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปร่าประมาณ 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Faine, 1982) และ Prescott et al. (1987) รายงานว่าการเพาะเชื้อเลปโตสไปร่าจากไตโค ในไตโคต้องมีความเข้มข้นของเชื้ออย่างน้อย 10^5-10^6 เซลล์ต่อไต 1 กรัม จึงจะสามารถเพาะเชื้อได้ และเนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่าเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ช้ามาก หากมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น จะทำให้สภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเปลี่ยนไป เช่น มีความเป็นกรดหรือด่างสูงขึ้น ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปร่าและทำให้เชื้อตายในที่สุด การศึกษาในครั้งนี้พบว่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมีการปน

เปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆเป็นจำนวนมากเมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเพาะเชื้อไม่ประสบความสำเร็จ โดยการปนเปื้อนนั้นอาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็น normal flora ตามธรรมชาติในสิ่งส่งตรวจนั้นอยู่แล้วทั้งในตัวอย่างน้ำและในปัสสาวะ วิธีการป้องกันเพื่อลดอัตราการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียอื่นๆด้วยการทำ serial dilution ในสิ่งส่งตรวจเพื่อลดความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียอื่นที่ปนเปื้อน (dilution culture technique) (Smith et al,1994) กำลัง ชุมพลบัญชร (1991) พบว่าการเจือจางปัสสาวะลง 10 เท่า ทำให้เชื้อเลปโตสไปร่าเจริญเติบโตได้ดีและมีโอกาสทำให้การเพาะเชื้อประสบความสำเร็จมากกว่าปัสสาวะที่ไม่ได้เจือจาง

ผลการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส หรือ PCR ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบต่อการตรวจเช่นกัน การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าด้วยเทคนิค PCR นี้ เลือกใช้ primer ที่มีจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรค (pathogenic leptospires) จำนวน 25 ซีโรวาห์ (specificity) (ภาคผนวก) ที่พบมีการระบาดในประเทศไทย และมีความไวต่อการตรวจหาเชื้อ (sensitivity) ในปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ ≥ 50 เซลล์ต่อปัสสาวะหรือน้ำ 1 มิลลิลิตร (อลงกร อมรศิลป์ และคณะ, อัดสำเนา) ดังนั้นผลลบที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุจาก ปริมาณเชื้อเลปโตสไปร่าที่ปนเปื้อนในปัสสาวะนั้นมีปริมาณความเข้นข้นของเชื้อน้อยกว่า 50 เซลล์ต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร และในตัวอย่างน้ำที่ตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าปริมาณเลปโตสไปร่าถูกเจือจางด้วยน้ำจำนวนมาก ทำให้ความเข้มข้นของเชื้อในตัวอย่างน้ำนั้นลดลงและทำให้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้ หรือตัวอย่างน้ำหรือสัตว์นั้นเกิดการติดเชื้อเลปโตสไปร่าในซีโรวาห์อื่นๆที่มีลำดับของสารนิวคลีโอไทน์หรือลำดับของสารพันธุกรรมที่แตกต่างจาก primer ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ไม่สามารถตรวจได้ และผลการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าทั้ง 2 วิธีข้างต้น ให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถยืนยันการติดเชื้อของสัตว์นั้นได้ จึงไม่สามารถหาสัตว์ที่เป็นแหล่งแพร่กระจายโรคนี้ได้

การสำรวจภาวะการติดเชื้อเลปโตสไปโรสิสของสัตว์ทางซีรั่มวิทยา โดยการตรวจวัดระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี้ของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า เนื่องจากสัตว์ที่ติดเชื้อเลปโตสไปร่าไม่แสดงอาการของโรคชัดเจนทำให้ยากต่อการค้นหาสัตว์ป่วยหรือสัตว์นำโรค ดังนั้นการวัดระดับแอนติบอดี้ของร่างกายจะสามารถบอกได้เพียงภาวะการติดเชื้อของร่างกายอยู่ในขณะนั้นหรือเคยติดเชื้อมาก่อน โดยทั่วไปเกณฑ์ที่ใช้เพื่อตัดสินการติดเชื้อหรือการเกิดโรคของสัตว์ นิยมวัดที่ระดับไตเตอร์ 1:100 เป็นจุดตัด (cut-off point) (Faines, 1982; Heath and Johnson, 1994) หรือการทำ pair serum เพื่อเปรียบเทียบระดับของแอนติบอดี้หรือระดับไตเตอร์ของร่างกาย ซึ่งหากระดับไตเตอร์ที่วัดได้สูงขึ้นกว่า 4 เท่า ถือว่าอยู่ในระยะการติดเชื้อหรือการเกิดโรค แต่ในการศึกษาครั้งนี้เริ่มวัดที่ระดับไตเตอร์ 1:20 เนื่องจากสัตว์นั้น

อาจเป็นการติดเชื้อในระยะแรก ทำให้แอนติบอดี้ที่ร่างกายสร้างขึ้นยังมีระดับต่ำหลังจากนั้นร่างกายจะสร้างแอนติบอดีสูงขึ้นเรื่อยๆและสูงสุดหลังการติดเชื้อ 2-3 สัปดาห์ (Chapman et al.,1991) หรือเนื่องจากการติดเชื้อในระยะเรื้อรังซึ่งมักจะพบว่าสัตว์มีระดับแอนติบอดี้ต่ำ เนื่องจากพื้นที่ที่ศึกษานั้นเป็น endemic area สัตว์เคยติดเชื้อมาก่อนทำให้ตรวจพบแอนติบอดี้ในระดับต่ำๆ (Faine et al., 1999) การศึกษาวิจัยครั้งนี้สัตว์ที่ทำการศึกษาทั้งหมดไม่ได้รับการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส ดังนั้นระดับไตเตอร์ที่วัดได้จึงแสดงถึงภาวะการติดเชื้อจากธรรมชาติ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาคือ MAT เป็นเทคนิคที่องค์การอนามัยโลกถือว่าเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส เทคนิคนี้อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มตกตะกอนระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ โดยเฉพาะแอนติบอดี้ชนิด IgM และ IgG แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดต่อการแปลผลคือ ทำให้ไม่ทราบช่วงเวลาที่เกิดการติดเชื้อของร่างกาย เพราะแอนติบอดี้ทั้ง 2 ชนิดที่ร่างกายสร้างขึ้นหลังการติดเชื้อนั้น จะคงอยู่และสามารถตรวจพบได้เป็นเวลานาน Chapman et al.(1991) รายงานว่าสามารถตรวจพบ IgG ได้นาน 0.6-20 ปีหลังการติดเชื้อ ทำให้ไม่สามารถประมาณช่วงเวลาของการติดเชื้อในสัตว์ได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าโคและกระบือมีอัตราการติดเชื้อที่ใกล้เคียงกัน คือ โคมีอัตราการติดเชื้อ 11.1% กระบือมีอัตราการติดเชื้อ 13.48% พบว่าโคมีความชุกต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า *L. ballum* สูงสุด 42% รองลงมาเป็น *L. bratislava* 19%, *L. sejroe* 14.2% นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อเลปโตสไปร่าอื่นๆอีกได้แก่ *L. hebdomadis* และ *tarassovi* (ตารางที่ 4 และ 5) โดยส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในระดับไตเตอร์ที่ค่อนข้างต่ำ คือ 1:20 (76%) และสูงสุดเพียง 1:40 (24%) เท่านั้น (ตารางที่ 5) เช่นเดียวกันกับการติดเชื้อในกระบือ พบเกิดการติดเชื้อ *L. ballum* สูงสุด 42.1% รองลงมาเป็น *L.bratislava*, *autumnalis,* และ *javanica* เท่ากันคือ 10.5% นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อเลปโตสไปร่าอื่นๆอีกได้แก่ *L. bataviae,hebdomadis, icterohaemorrhagiae, mini* และ *patoc* (ตารางที่ 6 และ 7) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อในระดับไตเตอร์ที่ค่อนข้างต่ำ คือ 1:20 (63%) เนื่องจากลักษณะการเลี้ยงโคและกระบือของเกษตรกรมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันหรือเลี้ยงรวมฝูงเดียวกัน อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ดังนั้นการติดเชื้อของโคและกระบืออาจเกิดจากแหล่งโรคเดียวกัน แต่พบว่าในกระบือมีการติดเชื้อเลปโตสไปร่าหลายซีโรวาห์ในเวลาเดียวกันมากกว่าในโค ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะพฤติกรรมของกระบือที่ชอบนอนแช่ในปลักหรือแอ่งน้ำขัง จึงเป็นพฤติกรรมที่ทำให้กระบือมีโอกาสสัมผัสและได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมาก (ตารางที่ 8) โดยปกติแล้วร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปร่าที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละซีโรวาห์เท่านั้น (Faine et al.,1999) ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่าสิ่งแวดล้อมหรือพื้นที่ที่เป็นแหล่งโรคของการติดเชื้อในกระบือนั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าหลายซีโรวาห์

ในกระบือ 1 ตัวอย่างพบมีระดับไตเตอร์ 1:160 เป็นการติดเชื้อ *L. bratislava* ซึ่งถือว่าเป็นระดับไตเตอร์ที่ค่อนข้างสูงและแปลผลได้ว่ากระบือตัวนั้นเป็นโรคเลปโตสไปโรสิส (Smith et al.1994) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับประวัติอาการไม่พบว่ากระบือนั้นมีอาการของโรคหรือมีประวัติการแท้ง และตรวจไม่พบเชื้อในปัสสาวะ อธิบายได้ว่ากระบือตัวนั้นมีการติดเชื้อเลปโตสไปร่า *L. bratislava* หรือเชื้อนั้นอาจถูกกำจัดหรือถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงสัตว์นั้นจึงไม่แสดงอาการของโรค หรือเชื้อนั้นอาจยังคงอยู่ในร่างกายแต่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้เนื่องจากในช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะเป็นช่วงเวลาที่ไม่มีเชื้อถูกขับออกมา ในการตรวจทางซีโรโลยีด้วยเทคนิค MAT เป็นการตรวจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่า แต่ระดับไตเตอร์นั้นไม่สามารถอธิบายได้ว่าสัตว์นั้นได้รับเชื้อมากน้อยเพียงใด หรือช่วงเวลาใดที่สัตว์นั้นได้รับเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อเลป-โตสไปร่าถูกจัดแบ่งได้มากกว่า 200 ซีโรวาห์ที่มีลักษณะจำเพาะต่อการติดเชื้อในสัตว์แต่ละชนิด ทำให้การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของสัตว์นั้นแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามระดับไตเตอร์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับการขับเชื้อ ซึ่ง Miller[a] et al (1991) ได้รายงานผลการสำรวจหาความชุกของการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของโคในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าผลการตรวจทางซีโรโลยีด้วยเทคนิค MAT ให้ผลบวก 49% แต่สามารถเพาะเชื้อได้เพียง 1.7% แต่ Prescott et al. (1987) พบว่าโคที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วย MAT และมีระดับไตเตอร์สูง คือ ≥ 1:640 สามารถเพาะเชื้อจากไตได้ถึง 80% ระดับไตเตอร์ 1:20-1:320 แยกเชื้อได้ 60% และระดับไตเตอร์ ≤ 1:10 ไม่สามารถเพาะเชื้อได้เลย จากความสัมพันธ์ดังกล่าวบ่งบอกได้ว่าผลการตรวจทางซีโรโลยีไม่สามารถบอกได้ถึงภาวะการเป็นสัตว์นำโรคของโค

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกับผลการศึกษาของเสาวพักตร์ อิ้นจ้อย (2001) ที่ทำการสำรวจสภาวะโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยาของโค กระบือ ในอำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ในปีพ.ศ 2542 (1999) ภายหลังการระบาดของโรคในคน พบว่าโค กระบือ มีอัตราการติดเชื้อเลปโตสไปร่า 28.6% โดยเป็นการติดเชื้อ *L. tarassovi* สูงสุด 56.25%, *sejroe* 37.50%, *ballum, pomona, autumnalis, copenhagein* มีอัตราการติดเชื้อต่ำเพียง 6.25% และการศึกษาของดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และคณะ (2000) ที่ทำการสำรวจแอนติ-บอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในปศุสัตว์ในพื้นที่ 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี พ.ศ. 2542 ผลการศึกษาของจังหวัดบุรีรัมย์ พบว่าโคเนื้อมีอัตราการติดเชื้อ 78.9% กระบือ 78.5% ที่ระดับไตเตอร์เริ่มต้น 1:20 โค กระบือแอนติบอดี้ทีพบมาก คือ *L. ranarum, sarmin, sejroe* จากการศึกษาทั้งหมดพบว่าในประเทศไทยโคและกระบือ เป็น maintenance host ของเชื้อ *L. sejroe*

ผลการตรวจทางซีโรโลยีในสุนัข พบมีอัตราการติดเชื้อ 4.65% (2/43) ทั้ง 2 ตัวอย่างให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* และมีระดับไตเตอร์สูง คือ 1:80 โดยมี 1 ตัวอย่างที่ติดเชื้อร่วมกับ *L. ballum* และ *autumnalis* (ตารางที่ 11 และ 12) สุนัขทั้งหมดที่ศึกษาไม่มีประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส ดังนั้นแอนติบอดี้ที่พบจึงเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ แอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุนัขพบมีความคล้ายคลึงกับการติดเชื้อในโคและกระบือ คือ การติดเชื้อ *L. ballum* และ *autumnalis* ความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเกิดจากสุนัขและโค กระบือ มีแหล่งโรคเดียวกันเช่นจากแหล่งน้ำหรือในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ปกติจะพบว่าสุนัขเป็น maintenance host ของเชื้อ *L. canicola* เช่น ในประเทศญี่ปุ่น (Arimitsu et al.,1989) และประเทศอังกฤษ (Broek et al., 1991) แต่การติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* มีสาเหตุเกิดจากการสัมผัสหรือได้รับเชื้อจากหนู เช่น การศึกษาในประเทศเปอโตริโก สุนัขส่วนใหญ่พบแอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* 72.6% น่าจะมีสาเหตุการติดเชื้อจากหนู (Farrington and Sulzer., 1982) ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในสุนัขที่มีประวัติการได้รับวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส โดยพบเป็นการติดเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* และยังพบว่าสุนัขนั้นสามารถขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะได้ ซึ่งการติดเชื้อในสุนัขนั้นเกิดจากการติดเชื้อจากหนูที่อยู่รอบ ๆบ้าน (Feigin et al, 1973) เช่นเดียวกับ Broek et al. (1991) ได้รายงานว่าการใช้วัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์ไม่สามารถป้องกันการขับเชื้อได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรวจพบแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าไม่มีความสัมพันธ์กับการขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะของสัตว์ เช่น การศึกษาในประเทศทรินิแดด พบว่าสุนัขส่วนใหญ่มีแอนติบอดี้ต่อเชื้อ *L. canicola* และ *icterohaemorrhagiae* แต่ในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าในปัสสาวะด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อ ให้ผลลบต่อการตรวจทั้งหมด (Everard et al., 1979) และ Broek et al. (1991) รายงานผลการตรวจทางซีโรโลยีด้วยเทคนิค MAT ระดับไตเตอร์ที่ได้ไม่สัมพันธ์กับการขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะ ดังนั้นผลการตรวจทางซีโรโลยีจึงไม่สามารถบอกภาวะการเป็นสัตว์นำโรคของสุนัขได้

การศึกษาการติดเชื้อในสุกรว่าพบมีอัตราการติดเชื้อ 15% แอนติบอดี้ที่พบเป็นการติดเชื้อ *L. hebdomaldis* 66.6% และ *mini* 33.3% มีระดับไตเตอร์ต่ำ 1:20 (ตารางที่ 10 และ 11) ต่างจากการศึกษาของดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และคณะ (2000) รายงานผลการสำรวจแอนติบอดี้ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในปศุสัตว์ในพื้นที่ 5 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ.ศ.2542 พบว่าจังหวัดบุรีรัมย์ สุกรมีอัตราการติดเชื้อ 47.1% (8/17) ที่ระดับแอนติบอดี้มากกว่าหรือเท่ากับ 1:20 โดยสุกรมีแอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อ *L. samin, ranarum* และ *pyrogenes* ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศ ที่พบแอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อ *L. sejroe, hardjo* และ *bratislava* (ดวงใจ สุวรรณ์

เจริญ และ อรรณพ คุณาวงษ์กฤต,2000) ปกติจะพบว่าสุกรเป็น maintenance host ของเชื้อ *L. pomona, tarassovi, bratislava* และ *grippotyphosa* (Faine et al., 1999) จากการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างพบว่าเกษตรกรเลี้ยงสุกรเป็นอาชีพเสริมจากการทำนา สุกรทุกตัวไม่มีประวัติการรับวัคซีนป้องกันโรคเลปโตสไปโรสิส ดังนั้นแอนติบอดี้ที่ตรวจพบจึงเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ การเลี้ยงสุกรในพื้นที่มีลักษณะการเลี้ยงเป็นแบบดั้งเดิม (backyard) โรงเรือนแยกเป็นสัดส่วนจากสัตว์เลี้ยงอื่นๆมีรูปแบบง่ายๆไม่มิดชิด อาหารที่เลี้ยงเป็นผลผลิตที่เหลือจากการเกษตร เช่น รำ ปลายข้าว หรือเศษอาหาร ดังนั้นการติดเชื้อเลปโตสไปร่าของสุกรเหล่านี้อาจเกิดจากติดเชื้อในธรรมชาติ จากการปนเปื้อนของเชื้อในสิ่งแวดล้อม เช่น จากน้ำหรืออาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อเลปโตสไปร่าจากสัตว์นำโรคชนิดอื่นๆ เช่น หนู เป็นต้น

โดยทั่วไปหนูท่อและหนูนา นับว่าเป็นสัตว์รังโรคที่สำคัญและมีบทบาทในด้านระบาดวิทยาของการแพร่เชื้อโรคเลปโตสไปโรสิส แต่จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในหนูหริ่งนาหางสั้นที่อาศัยในยุ้งฉางข้าวของเกษตรกร ซึ่งไม่ใช่แหล่งโรคหลักจึงให้ผลลบต่อการตรวจด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อในประเทศไทย ดวงพร พูลสุขสมบัติ และคณะ(1999) รายงานผลการศึกษาหาหนูที่เป็นสัตว์นำโรคของเชื้อเลปโตสไปร่าในจังหวัดนครราชสีมา พบว่าหนูพุกใหญ่ (*Bandicola indica*) เป็นสัตว์นำโรคโดยพบการติดเชื้อในไตหนูแต่ยังไม่สามารถระบุชนิดสายพันธุ์ของเชื้อได้ ซึ่งหนูชนิดนี้เป็นหนูขนาดใหญ่ตัวโตอาศัยตามไร่นาโดยการขุดรูตามคันนา และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่เชื้อและการระบาดของโรคในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยการปล่อยเชื้อไปปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจากนั้นเชื้อจะแพร่ไปสู่สัตว์และคนต่อไป ในประเทศเกาหลีพบว่าหนู *Apodemis agrarius* เป็นสัตว์นำโรคที่สำคัญและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคในคน และพบว่าโดยส่วนใหญ่มีแอนติบอดี้ต่อการติดเชื้อ *L. Icterohaemorrhagiae* serovar *lai* (Cho et al.,1998) การเกิดโรคในประเทศโปรตุเกสปัญหาหรือสาเหตุของการระบาดของโรคเกิดจากหนูเป็นสำคัญโดยส่วนใหญ่พบว่าหนูบ้าน *Mus domesticus* เป็นสัตว์รังโรคของ *L. ballum* หนูท่อหรือ *Rattus norvegicus* เป็นสัตว์รังโรคของ *L. icterohaemorrhagiae* และ *Rattus rattus* เป็นสัตว์รังโรคของ *L. ballum* และ *icterohaemorrhagiae* (Pereira et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่สำคัญที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคคือ ปริมาณและความหนาแน่นของสัตว์รังโรค เนื่องจากพบว่าปัจจุบันพบการระบาดของโรคในเขตเมืองหรือเขตชุมชนหนาแน่นมากขึ้น อาจเป็นเพราะปัญหาขยะที่ทำให้หนูชุกชุมมีจำนวนมากขึ้น ทำให้เกิดการแพร่กระจายและการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่าในสิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น (Ko et al., 1997; Barcellos and Sabroza, 2001; Kariv et al., 2001)

สิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการแพร่กระจายเชื้อและการติดต่อของโรค (Faine, 1982) โดยเฉพาะในแหล่งน้ำหรือที่มีน้ำท่วมขัง เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปร่ามีคุณลักษณะที่สามารถคงอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เปียกชื้นได้นานหลายวันหรือหลายสัปดาห์โดยไม่สูญเสียความสามารถในการก่อโรค ทำให้เชื้อเลปโตสไปร่ามีโอกาสแพร่กระจายเชื้อได้มากขึ้นและเป็นวิธีสำคัญของการแพร่เชื้อ ซึ่งจะพบว่าการระบาดของโรคหลายๆครั้งมีสาเหตุจากการสัมผัสหรือรับเชื้อจากสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะจากแหล่งน้ำ เช่น การระบาดของโรคในรัฐเทนเนสซี่ในปี 1975 (Anderson et al., 1978) การระบาดในรัฐมิสซูรี่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี1985 (Jevon et al., 1986) การระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศบาร์บาดอส (Douglin et al, 1997) เหล่านี้ล้วนมีปัจจัยเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำทั้งสิ้น การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าที่ปนเปื้อนในน้ำตามแหล่งน้ำต่างๆที่สงสัยว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปร่า ได้แก่ น้ำในบ่อน้ำสาธารณะหมู่บ้าน คลองชลประทานขนาดเล็ก แอ่งน้ำขังตามบริเวณทุ่งนา ซึ่งเป็นแหล่งน้ำเพื่ออุปโภคบริโภคและเพื่อเกษตรกรรม ของประชาชนในพื้นที่ด้วยการเพาะเชื้อ และการทำ PCR ซึ่งผลการตรวจทั้ง 2 วิธีให้ผลลบทั้งหมด อาจมีสาเหตุจากปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปร่าในน้ำนั้นอาจมีจำนวนน้อยเกินไปที่จะสามารถตรวจได้ และในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าโดยการเพาะเชื้อจากแหล่งน้ำโดยตรงนั้นมีโอกาสประสบความสำเร็จได้น้อย ทั้งนี้เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆจำนวนมาก (Henry et al., 1978)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแหล่งโรคในสัตว์ชนิดต่างๆและในแหล่งน้ำที่สงสัยหลังการระบาดของโรค (outbreak investigation) โดยพิจารณาข้อมูลระบาดวิทยาการเกิดโรคในคนในช่วงระยะเวลา 2-3 ปีเป็นตัวกำหนด ซึ่งต่างจากการศึกษาของเสาวพักตร์ อิ้นจ้อย (2001) ที่ทำการสำรวจสภาวะโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยาของโค กระบือ ในอำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ ในปีพ.ศ 2542 (1999) ภายหลังการระบาดของโรคในคนทันที โดยเป็นการศึกษาการเกิดโรคในคนและสัตว์พร้อมกัน และพบสาเหตุของการระบาดดังกล่าวเกิดจากการลอกคูคลองซึ่งเป็นแหล่งรังโรคร่วมกันระหว่างสัตว์และคน ปัจจุบันอำเภอห้วยราชจังหวัดบุรีรัมย์ถือว่าโรคเลปโตสไปโรสิสเป็นโรคประจำถิ่นที่มีอุบัติการณ์การเกิดโรคสูง แต่เมื่อศึกษาหาสัตว์นำโรคในพื้นที่โดยการหาเชื้อในปัสสาวะและการตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อไม่พบว่ามีสัตว์ชนิดใดที่ขับเชื้อออกมาขับเชื้อและไม่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจทางซีโลโรยี พบว่าสัตว์มีการติดเชื้อในธรรมชาติหรือเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง เนื่องจากมีระดับไตเตอร์ต่ำ ปัจจุบันยังพบว่ามีรายงานการเกิดโรคของคนในพื้นที่ยังสูงอยู่ ดังนั้นแหล่งรังโรคหรือสาเหตุของการระบาดของโรคอาจเกิดจากรังโรคในสัตว์ชนิดอื่นนอกเหนือจากสัตว์เลี้ยงที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ หรืออาจเกิดจากระบบการรายงานโรคในพื้นที่ ซึ่งส่วนใหญ่การวินิจฉัยโรคในคนเป็นการวินิจฉัยตามอาการทางคลีนิค อาจก่อให้เกิดความผิดพลาด

จากโรคอื่นๆได้ เช่น โรคสครับไทฟรัส ไข้เลือดออกชนิดเดงกี่ ได้ เนื่องจากมีลักษณะอาการคล้ายคลึงและใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับการรายงานของ Ko et al.(1990) พบว่าในประเทศบราซิลผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรสิสกว่า 42% ถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรคไข้เลือดออกชนิดเดงกี่ และจากข้อมูลของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ติดต่อส่วนตัว) พบว่าในปีพ.ศ.2542 มีจำนวนผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการเพียง 187 ราย ในปี พ.ศ. 2543 มีผู้ป่วยยืนยันเพียง 875 ราย จากรายงานผู้ป่วยทั่วประเทศกว่า 14,287 ราย ดังนั้นข้อมูลรายงานโรคอาจผิดพลาดได้เนื่องจากการตรวจยืนยันการเกิดโรคน้อย

จากการสำรวจพื้นที่ที่ทำการศึกษาพบว่า ลักษณะพื้นที่โดยส่วนใหญ่เป็นที่ราบ ประชากรส่วนใหญ่มีอาชีพทำนา ทำไร่ เลี้ยงสัตว์ โดยอาศัยแหล่งน้ำเพื่อการเกษตรกรรมจากธรรมชาติ ทั้งน้ำฝน แหล่งน้ำสาธารณะ เช่น บ่อ หรือคลองชลประทานขนาดเล็ก การเลี้ยงสัตว์ส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย เลี้ยงสัตว์ครอบครัวละ 3-4 ตัวจุดประสงค์ของการเลี้ยงเพื่อการออมทรัพย์และเป็นอาชีพเสริมจากการทำนา ไม่ได้เป็นการเลี้ยงเพื่อใช้แรงงานในภาคเกษตรกรรมเหมือนในอดีตที่ผ่านมา เพราะปัจจุบันเกษตรกรใช้เครื่องจักรกลมากขึ้น เช่น รถไถนา ควายเหล็ก มีเกษตรกรน้อยรายที่จะเลี้ยงเป็นฝูงใหญ่ 20-30 ตัว ลักษณะการเลี้ยงโค กระบือเป็นการเลี้ยงแบบปล่อยรวมฝูง หากินอาหารตามทุ่งหญ้าสาธารณะ ในช่วงฤดูการทำนาและฤดูกาลเก็บเกี่ยว โค กระบือเหล่านี้จะถูกเลี้ยงขังคอกหรือปล่อยหากินหญ้าตามทุ่งหญ้าสาธารณะทั่วไป หลังฤดูกาลเก็บเกี่ยวไปแล้วโค-กระบือเหล่านี้จึงจะได้ลงในนาข้าวเพื่อเล็มกินฟางข้าวและวัชพืชก่อนที่จะเริ่มฤดูกาลเพาะปลูกต่อไป และจากการศึกษาของ วราลักษณ์ ตังคณะกุล (1999) พบว่าน้ำในนาข้าวเป็นแหล่งรังโรคซึ่งมีเชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อนและถ่ายทอดเชื้อมาสู่คนโดยมีปัจจัยเสี่ยงจากการสัมผัสหรือแช่น้ำเป็นเวลานาน แต่จากผลการสำรวจในพื้นที่และลักษณะการเลี้ยงสัตว์ของเกษตรกร โอกาสที่แหล่งน้ำในนาข้าวจะมีการปนเปื้อนของเชื้อจากโค กระบือ สุกร หรือสุนัข นั้นมีโอกาสน้อยมากเพราะในฤดูกาลทำนาสัตว์เหล่านี้ไม่มีโอกาสที่จะเหยียบย่ำไปหากินในท้องนาและปล่อยปัสสาวะได้เลย นอกจากในฤดูแล้งซึ่งเชื้อไม่น่าอยู่รอดและเป็นสาเหตุการระบาดได้เนื่องจากอากาศร้อนและแดดจัดมาก ทำให้เชื้อถูกทำลายอย่างรวดเร็ว

สรุป ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสัตว์เลี้ยงและปศุสัตว์ในอำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์ มีภาวะการติดเชื้อเลปโตสไปร่าค่อนข้างน้อย (11.1%) ซึ่งทั้งหมดน่าจะเกิดจากการติดเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติ การติดเชื้อในโค กระบือ อาจมีสาเหตุหรือแหล่งโรคเดียวกัน เนื่องจากสภาพการเลี้ยงมีความคล้ายคลึงกันและมีการติดเชื้อบางซีโรวาห์ที่เหมือนกัน การติดเชื้อในสุกรและสุนัข น่าจะเกิดการติดเชื้อในธรรมชาติที่มีเชื้อเลปโตสไปร่าปนเปื้อนอยู่ และน่าจะรับเชื้อมาจากหนูเนื่องจากแอนติบอดี้ที่พบเหมือนกับในหนูซึ่งเป็น

maintenance host ที่สำคัญของโรคนี้ผลของการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสัตว์ทั้งหมดไม่ใช่สัตว์นำโรคที่ปล่อยเชื้อเลปโตสไปร่าสู่สิ่งแวดล้อมและเป็นต้นเหตุของการระบาดในช่วงปี พ.ศ.2540-2543 ที่ผ่านมา แต่สามารถบอกได้ว่าปัจจุบันอัตราการขับเชื้อของสัตว์เหล่านั้นลดน้อยลงจนไม่สามารถที่จะตรวจวัดได้ เนื่องจากผลการตรวจทางซีโรโลยีที่ได้มีระดับไตเตอร์ต่ำโดยส่วนใหญ่พบระดับไตเตอร์ที่ 1:20 (68%) ทำให้ไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าสัตว์ตัวนั้นเกิดการติดเชื้อและเป็นโรคได้หรือไม่ ซึ่งการตรวจหาแอนติเจนด้วยเทคนิค PCR และการเพาะเชื้อจะช่วยให้การวินิจฉัยการเกิดโรคในสัตว์แม่นยำขึ้นโดยเฉพาะการตรวจด้วยเทคนิค PCR ที่ให้ผลการตรวจที่แม่นยำ รวดเร็วและตรวจวินิจฉัยการเกิดโรคได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการค้นหาผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยเพื่อให้การรักษาที่รวดเร็วหรือในสัตว์เพื่อให้การควบคุมโรคและการกำจัดโรคมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่เทคนิคการตรวจด้วยวิธีนี้ยังมีข้อเสียคือไม่สามารถแยกชนิดซีโรวาห์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรคได้ ทำให้ข้อมูลด้านระบาดวิทยาไม่เพียงพอซึ่งจะมีผลสืบเนื่องถึงการเฝ้าระวังโรคในพื้นที่ ในการศึกษาเพื่อหาสาเหตุที่เกิดจากสัตว์นำโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคในคนนั้น ควรมีการตรวจยืนยันการเกิดโรคในคนและสัตว์ทางห้องปฏิบัติการควบคู่กันไป เพื่อหาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคและอุบัติการณ์การเกิดโรคที่แท้จริงทั้งในสัตว์และในคน เพื่อการวางแผนและการควบคุมโรคที่ถูกต้อง ปัจจุบันการควบคุมและป้องกันโรคทั้งในคนและในสัตว์ ทำได้โดยปรับปรุงสุขาภิบาลสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ทั้งในบ้านและโรงเรือนเลี้ยงสัตว์ให้มีความสะอาด เพื่อลดอัตราการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตส-ไปร่า ปัจจุบันประชาชนในพื้นที่ต่างตระหนักถึงปัญหาการระบาดของโรคในพื้นที่และให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการควบคุมและป้องกันโรค เช่น การกำจัดหนูทั้งในบ้านเรือนและไร่นาและการป้องกันตนเองจากการติดเชื้อด้วยการใส่ถุงมือหรือรองเท้าบูทส์ ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะช่วยลดปัญหาการเกิดโรคในคนได้ ในการควบคุมโรคในสัตว์โดยการใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคนั้นควรต้องมีการศึกษาด้านระบาดวิทยาต่อไปอีกเพื่อหาซีโรวาห์ที่เป็นปัญหาที่แท้จริงของการระ - บาดของโรคในพื้นที่ เนื่องจากแอนติบอดี้ของร่างกายต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในแต่ละซีโรวาห์ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อข้ามชนิดกันได้ จึงมีผลต่อการพิจารณาเลือกวัคซีนเพื่อใช้ในการควบคุมป้องกันโรคในคน อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้หนูที่ดักจับได้ไม่ใช่หนูที่เป็นปัญหาและก่อให้เกิดการระบาดของโรคได้ เนื่องจากเป็นหนูที่ไม่เสี่ยงต่อการเกิดโรค ดังนั้นควรต้องมีการศึกษาในหนูต่างชนิดและเพิ่มขนาดตัวอย่างให้มากขึ้น เนื่องจากหนูในพื้นที่มีหลายชนิดและมีวิถีหรือมีระบบนิเวศน์ที่แตกต่างกัน ทำให้ลักษณะการแพร่เชื้อไม่เหมือนกัน รวมทั้งควรทำการศึกษาทางซีโรโลยีเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ของแอนติบอดีต่อการติดเชื้อในคนในสัตว์เลี้ยงและหนูชนิดต่าง ๆให้มากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางระบาดวิทยาและหาสัมพันธ์ของการเกิดโรคทั้งในสัตว์และในคนต่อไป

รายการอ้างอิง

กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. การประชุมคณะกรรมการวิจัยและพัฒนาเพื่อป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส. (อัดสำเนา). 2001.

กำลัง ชุมพลบัญชร. การแยกเชื้อเลปโตสไปร่าจากตัวอย่างปัสสาวะของโค. ในรายงานการวิจัยการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 18 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. หน้า 251-258. 4-6 พฤศจิกายน 2543 ณ โรงแรมเอเชีย กรุงเทพมหานคร,1999.

ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และ อรรณพ คุณาวงษ์กฤต. ปัญหาการระบาดของโรคเลปโตสไปโร-ซีสในฟาร์มพ่อแม่พันธุ์สุกร : การชันสูตร การรักษาและผลกระทบทางเศรษฐกิจ. เวชชสารสัตวแพทย์.30 (2000) : 25-32.

ดวงใจ สุวรรณ์เจริญ และคณะ.การสำรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในปศุสัตว์ในพื้นที่ 5 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. สัตวแพทยสาร. 51(2000):9-18.

ดวงพร พูลสุขสมบัติ, วราลักษณ์ ตังคณะกุล, ดาริกา กิ่งเนตร,นภดล แสงจันทร์, ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และ เกรียงศักดิ์ หามฤต. การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปร่าในหนู จังหวัดนครราชสีมา พ.ศ. 2541. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 8(1999):361-369.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. การป้องกันกำจัดหนูในนาข้าวและบ้านเรือน. ใน วิชัย โชควิวัฒน (บรรณาธิการ).คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส.หน้า77-95.กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.,1998.

วิชัย โชควิวัฒน. ธรรมชาติของโรคเลปโตสไปโรซิส. ใน วิชัย โชควิวัฒน (บรรณาธิการ),คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส, หน้า7-23.กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.,1999.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล. การรักษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส. ใน วิชัย โชควิวัฒน (บรรณาธิการ).คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส.หน้า24-28.กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.,1998.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ.ปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลปโตสไปโรซีสในประชากรเขตชนบทภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.วารสารวิชาการสาธารณสุข. 8(1999): 352-359.

พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พูลสุขสมบัติ.การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ. ใน วิชัย โชควิวัฒน (บรรณาธิการ), คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส, หน้า 32-45. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.,1999.

เสาวพักตร์ อิ้นจ้อย. การสำรวจสภาวะของโรคเลปโตสไปโรสิสทางซีรั่มวิทยา และแหล่งรังโรคในโค กระบือ ในเขตพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรสิสในคนที่ตำบลคูเมือง อำเภอคูเมือง จังหวัดบุรีรัมย์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2002.

สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดบุรีรัมย์. สรุปสถานการณ์โรคเลปโตสไปโรซิส จังหวัดบุรีรัมย์. บุรีรัมย์.(อัดสำเนา), 2001.

อลงกรณ์ อมรศิลป์ และคณะ. การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อโรคด้วยเทคนิคลูกโซ่โพลิเมอเรส. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาสัตวแพทยศาสตรสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (อัดสำเนา), 1999.

Alexander,A.D. Leptospira. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler. and J.P.Truant.(ed). Manual of Clinical Microbiology.3rd , pp.376-382. USA :American Society for Microbiology., 1980.

Anderson, D.C., D.S.Folland, M.D.Fox, C.M.Patton and A.F.Kaufmann.Leptospirosis: A common-source outbreak due to Leptospires of the Grippotyphosa serogroup. American Journal of Epidemiology.107(1978): 538-544.

Arimitsu, Y., K.Fukumura. and Y.Shingaki. Distribution of leptospirosis among stray dogs in the Okinawa Islands, Japan: Comparison of the microcapsule and microscopic agglutination test. British Veterinary Journal. 145(1989):473-477.

Babudieri, B. Animal reservoirs of Leptospires. In Otto. V. St. Whitelock.; F. N. Furness. And P. A. Sturgeon. (ed), Annuals of the New York Academy of Science, pp.393-413. New York, 1958.

Bal,A.E. et al. Detection of Leptospires in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology. 32(1994):1894-1898.

Barcellos C. and P.C. Sabroza. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad.Saude Publica,Rio de Janeiro. 17(2001):59-67.

Biberstein, E.L. Leptospirae. In: E.L.Biberstein and Y.C.Zee.(ed.) Review of Vet Microbiology. pp.237-242. USA: Blackwell Scientific Publication., 1990.

Blood, D.C. and O.M. Radostits. Disease caused by *LEPTOSPIRA* spp. In D.C. Blood, O.M. Radostits and J.A.Henderson. (ed.) Vet medicine.7th ed. USA:. Baillise Tindall., 1989.

Bloxham.H. Clinical pathology and laboratory diagnostic aids. In D.R. Lane and B.Cooper. (ed.) Veterinary Nursing. 2 ed. ENG.Butterworth-Heinemann., 1999.

Bolin, C.A. and P. Koellner. Human-to-Human Transmission of Leptospira interogans by milk. The Journal of Infectious Disease. 158(1988):246-247.

Broek, A.H.M., M.V.Thrusfield, G.R.Dobbie and W.A.Ellis. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. Journal of Small Animal Practice.32(1991):118-124.

Cacciapuoti et al. A Waterborne Outbreak of Leptospirosis. American Journal of Epidemiology. 126(1987):535-545.

Campagnolo et al. Analysis of the 1998 outbreak of Leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. JAVMA. 216(2000):676-682.

Chapman A. C. Antigens recognized by the human immune response to severe leptospirosis in Barbados. Epidemiol Infect. 107(1991):143-155.

Cho, M.K.et al. Infection rate of Leptospira interrogans in the field rodent, *Apodemus agrarius*, In Korea. Epidemiol.Infect. 121(1998):685-690.

Corney, B. G., C.S. McClintock, J. Colley, and J.K. Elder. Genotype of Leptospira isolated from Queensland cattle. Australia Veterinary Journal. 73(1996):75-76.

Douglin,C.P., C.Jordan, R.Rock, A.Hurley and P.N.Levett. Risk Factors for Severe Leptospirosis in the Parish of St.Andrew, Barbados. Emerging Infectious Disease. 3(1997).

Elder,J.K.,G.M.McKeon.,F.Duncalfe., W.H.Ward. and R.D.Leutton. Epidemiological studies on the ecology of *Leptospira interrogans* serovar *pomona* and *hardjo* in Queensland. Preventive Veterinary Medicine.3(1986):501-521.

Ellis, W.A. Bovine Leptospirosis in tropics: Prevalence, Pathogenesis and Control. Preventive Veterinary Medicine. 2(1985): 411-421.

Ellis, W.A. and A.B. Thiermann. Isolation of leptospites from the genital tracts of Iowa cows.American Journal Veterinary Research. 47(1986):1694-1696.

Everard, C.O.R., E.P.I.Cazabon, D.W.Dreesen, and C.R.Sulzer. Leptospirosis in dogs and cata on the island of Trinidad: West Indies. Int.J.Zoon. 6(1979):33-40.

Faine, S. Guidelines for the control of Leptospirosis. WHO offset publication no.67 World Health Organization,Geneva, Switzerland., 1982.

Faine, S., B. Adler, C. Bolin, and P. Perolat. Leptospira and Leptospirosis. 2nd ed. pp. 1-272. AUS:Monash University Print Service., 1999.

Farr, R.W. State of the art clinical article. Clinical Infectious Disease.21(1994):1-8.

Farrington, N. L. and K. R. Sulzer. Canine Leptospirosis in Puerto Rico. Int. J. Zoon. 9(1982):45-50.

Feigin, R.D., L.A.Lobes Jr., D.Anderson. and L.Pickering. Human Leptospirosis from Immunized Dogs. Annual of Internal Medicine. 79(1973): 77-785.

Gerritsen, M.J., M.J. Koopmans, and T.Olyhoek. Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to Leptospira interogans serovar hardjo subtype hardjobovis in experimentally infected cows. Veterinary Microbiology.38(1993):129-135.

Gerritsen, M.J., M.J. Koopmans,T.C.Dekker,M.C.De Jong, A.Moerman, and T.Olyhoek.Effective treatment with dihydrostreptomycin of naturally infected cows shedding Leptospira interogans serovar hardjo subtype hardjobovis. American Journal of Veterinary Research.55(1994):339-343.

Gochenour, W. S., A. G. Chester. and K. W. Martha. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. In Otto. V. St. Whitelock.; F. N. Furness. and P. A. Sturgeon. (ed), Annuals of the New York Academy of Science, pp.393-413. New York, 1958.

Hanson, L.E. and L.C. Ferguson. Leptospirosis. In H.W.Dunne and A.D.Lenan. (ed.) Disease of Swine.4th ed. pp.476-485., 1975.

Hanson, L.E. Leptospirosis. In H.E. Amststz. (ed.) Bovine Medicine and Surgery. Vol.1. USA: American Veterinary. Santa Barbara.,1980.

Hanson,L.E. and D.N. Tripathy.Disease of swine. 5th ed. USA:Iowa State University Press., 1981.

Heath, S.E. and R. Johnson. Leptospirosis. JAVMA. 205(1994):1518-1523.

Hellstrom, J.S. and D.K.Blackmore. Proc 2nd internal Symp Vet Epidem Econ. Australian Government Publishing Service. Canbera. P214., 1979.

Higgins, R.I., J.F. Harbourne, T.W.A. Little. and A.E. Stevens. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of the serotype hardjo. The Veterinary Record. 27(1980):307-310.

Hungerford, T.G. Disease of Livestock. 9th ed. New York:Mc Graw-Hill Book., 1990.

Jevon,T.R., M.P.Knudson, P.A.Smith, P.S.Whitecar and R.L.Blake. A point-source epidemic of leptospirosis . Postgraduate Medicine. 80(1986):121-129.

Kariv, R., R.Klempfner, A.Barnea, Y.Sidi and E.Schwartz. The Changing Epidemiology of Leptospirosis in Israel. [online] CDC. Available from: http://www.cdc.gov .[2002,Dec 1],2001.

Katz,A.R.,S.J.Manea. and D.M.Sasaki. Leptospirosis on Kauai: Investigation of a Common Source Waterborne Outbreak. American Journal of Public Health. 81(1991):1310-1312.

Ko,A.I., G.R.Mitermayer.R.D. Cibele M, D J. Warren, Jr., W. R. Lee, and the Salvador Leptospirosis Study Group. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. THE LANCET. 354(1990):820-825.

Kuriakose, M., C.K.Eapen. and R. Paul. Leptospirosis in Kolenchery, Kerala, India: Epidemiology, prevalent local serogroups and serovars and a new serovar. European Journal of Epidemiology. 13(1997):691-698.

Larsson et al. Laboratory and clinical features of experimental feline Leptospirosis. Int. J. Zoon.12(1985):111-119.

Lennette et al.1980. In E.H.Lennette.(ed). Manual of Clinical Microbiology. USA:American Society for Microbiology., 1985.

Leonard, F.C., P.J. QuinnW.A. Ellis. and K. O′Farrel. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interogans* serovar *hardjo*. The Veterinary Record. 131(1992): 435-439.

Lilenbaum, W and M. R. C. Santos. Effect of management systems on the prevalence of bovine leptospirosis. The Veterinary Record. 8(1996): 570-571.

Masri, S.A., P.T.Nguyen, S.P.Gale, C.J. Howard and S.C. Jung. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. In Bovine Semen. Can J Vet Res. 61(1997):15-20.

McClintock, C.S.et al. Isolation of Leptospira interogans serovars hardjo and Zanoni from a dairy herd in north Queensland. Australian Veterinary Journal.70(1993):393-394.

McDonoUgh, P.L. Leptospirosis in Dogs- Current Status.[online] Recent Advances in Canine Infectious Disease. Available from:http://www.ivis.org. [2002,Dec 1], 2001.

Merchant,I.A. and R.A. Packer. In I.A.Merchant and R.A.Packer. (ed) Veterinary Bacteriology and Virology. USA.:The Iowa State University., 1967.

Merien,F., G.Baranton, and P.perolat. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination Test and culture for Diagnosis of Leptospirosis. The Journal of Infectious Disease. 172(1995):281-285.

Michna, S.W. Leptospirosis.The Veterinary Record. 86(1970):484-496.

Miller[a], D.A., M.A. Wilson and G.W. Beran. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interogans* infection in mature cattle in the United States. American Journal Veterinary Research. 52(1991):1761-1765.

Miller[b], D.A., M.A. Wilson. and G.W. Beran. Relationships beteween prevalence of *Leptospira interogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. American Journal Veterinary Research. 52(1991):1766-1768.

Nedunchelliyan, S. and A.T Venugopalan. Blood transfusion and leptospirosis. Indian Vet.J. 74(1997): 790-791.

Nervig,R.M. and L.A. Garrett. American Journal Veterinary Research.40(1979):1197.

Nuovo, G. I. PCR in sito hybridization : Protocols and applications. USA. Raven Press., 1992.

Office International des Epizooties (OIE). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. (4th).Paris:OIE, 2000.

Parker, M. T. and L. Collier. In M.T.Parker and L.H.Collier.(ed). Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity.8th ed. USA.: Philiadephia: Decker'St.Louis., 1990.

Paz-Soldan, Soledad Valdivia., Milagro Teran Dianderas. and R. S.Windsor. Leptospira interogans serovar canicola: A causal agent of sow abortion in Arequipa, Peru. Trop.Anim.Hlth.Prod. 23(1991):233-240.

Pereira, M.C.et al. First epidemiological data on pathogenic leptospires islolated on the Azorean islands. European Journal of Epidemiology13(1997): 435-441.

Pereira, M.C., M.L.Mathias., M.Santos-Reis., M.G.Ramalhinho. and P.Duarte-Rodrigues. Rodent and Leptospira transmission risk in Terceira island (Azores). European Journal of Epidemiology 16(2000):1151-1157.

Plank,R. and D. Dean. Overview of the epidemiology,microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp*.in humans. Microbes and Infection. 2(2000):1265-1276.

Prescott, J.F., R.B.Miller and V.M.Nichoson. Isolation of Leptospira hardjo from Kidneys of Ontario Cattle at Slaughter. Can J Vet Res.51(1987):229-231.

Radostits, O.M., D.C. Blood. and C.C. Gay. Diseases caused by Leptospira spp. In O.M.Radostits, D.C.Blood and C.C.Gay.(ed) Veterinary Medicine.8th ed. pp.884-898.UK.:Bailliere Tindall.London.. 1994.

Ramadass, P.S, A. Senthil Kumar, M.D. Venkatesha. And K.Nachimuthu. Rapid diagnosis of leptospirosis by polymerase chain reaction. Indian Vet.J. 74(1997): 457-460.

Rocha,T. and R. Perestrelo Vieira. Experimental infection of pregnant gilts with Leptospira interogans serovar mozdok. The Veterinary Record. 131(1992):197-199.

Rodina VN. Transmission of leptospirosis by artificial insemination. Trudy Vses Inst Eksp Vet. 37(1970): 168-171.

Simon, M.C., C. Ortega, J.L. Alonso, O. Girones, Muzquiz. And Garcia, J. Risk factors associated with the seroprevalence of leptospirosis among students at the veterinary school of Zaragaza University. The Veterinary Record .144(1999):287-291.

Smith, C.R., P.J. Ketterer, M.R. McGowan and B.G. Corney. A Review of laboratory technique and their use in the diagnosis of Leptospira interogans serovar hardjo infection in cattle. Australia Veterinary Journal. 71(1994): 290-294.

Smyth, J.A., P.T. McNamee., D.G.Kennedy., S. J. McCullough., E.F. Logan. and W.A. Ellis. Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: preliminary pathological, microbiological and biochemical findings. The Veterinary Record. 21(1992): 237-240.

Smyth. L. et al. Review of leptospirosis notifications in Queensland and Australia: January 1998-June 1999.[online] Communicable Diseases Intelligence.24No6.Available from:http://www.health.gov.au. [2002,Dec 1],2000.

Thierman, A.B. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the Hebdomadis serogroup. American Journal Veterinary Research. 43(1982):780-784.

Thierman, A.B. Leptospirosis: Current development and trends. JAVMA. 184(1984):722-725.

Trevejo, R.T. et al. Epidemic Leptospirosis Associated with Pulmonary Hemorrhage-Nicaragua.1995. The journal of Infectious Disease. 178(1998):1457-63.

Waitkins, S. A. Leptospires and Leptospirosis. In C.H. Collins. (ed). Isolation and Identification of microorganism of medical and veterinary importance. pp 251-273. New York: Academic Press., 1985.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว Fletcher's semisolid medium (Difco®)

ประกอบด้วย

1.1 Fletcher medium	2.5	กรัม
1.2 น้ำกลั่น	920	มิลลิลิตร
1.3 inactivate rabbit serum	80	มิลลิลิตร

วิธีทำ

1 นำ Fletcher medium 2.5 กรัมใส่น้ำกลั่นจำนวน 920 มิลลิลิตร

2. นำไปต้มในน้ำเดือดจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.9 $\pm$0.1 ด้วย NHCl หรือ NaOH

3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

4. เติม inactivate rabbit serum 80 มิลลิลิตร ที่แช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที จากนั้นผสมให้เข้ากัน

5. แบ่งใส่หลอดเล็กๆละ 5 มิลลิลิตร นำไป inactivate ที่ 56 องศาเซลเซียส วันละ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 2 วัน ติดต่อกัน

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH

อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

2.1 EMJH basal medium มีส่วนประกอบดังนี้

- Disodium hydrogen phosphate	1.0	กรัม/ลิตร
- Potassium dihydrogen phosphate	0.3	กรัม/ลิตร
- Sodium chloride	1.0	กรัม/ลิตร
- Ammonium chloride	0.25	กรัม/ลิตร
- Thiamine	0.005	กรัม/ลิตร
- Glycerol	0.1	กรัม/ลิตร

2.2 EMJH enrichment broth มีส่วนประกอบดังนี้

- Bovine albumin	100	กรัม/ลิตร
- Calcium chloride	0.1	กรัม/ลิตร
- Magnesium chloride	0.1	กรัม/ลิตร

นำ EMJH basal medium ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหมอนึ่งความดันทีอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที และ EMJH enrichment broth ไปฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำส่วนผสมทั้ง 2 ส่วนมาผสมกันในอัตราส่วน 9:1 (base:medium) จากนั้นปรับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า pH ที่ 7.4

3..การเตรียม 0.8% Agarose gel

3.1 เตรียมสารละลาย TBE โดยการใช้สารละลาย 5×TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตรผสมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.2 ชั่ง agarose 0.4 กรัม ใส่ลงในสารละลาย TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.3 นำไปต้มจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่ใน gel box แล้วใส่ซี่ฟัน เพื่อให้เกิดหลุมหลังเจลแข็งตัว

3.4 ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ที่อุณหภูมิห้อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง แสดงเชื้อเลปโตสไปร่าที่ทำให้เกิดโรค และไม่ทำให้เกิดโรครวมทั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

Species	Serogroup	Serovar	Stain	PCR
L.interogans	Australis	australis	Unknow	+
L.interogans	Autumnalis	autumnalis	Unknow	+
L.interogans	Autumnalis	new	Heusden p2062	+
L.interogans	Hyos	hyos	Mitis Johnson	+
-	Lousiana	Saigon	L 79	+
L.biflexa	Unknow	P 136	P 136	-
L.biflexa	Unknow	P 138	P 138	-
L.biflexa	Semanranga	Patoc	Patoc I	-
L.borgpetersenii	Ballum	ballum	Mus 127	+
L.borgpetersenii	Javanica	javanica	Veldrat Bataviae46	+
L.borgpetersenii	Javanica	poi	Poi	+
L.borgpetersenii	Sejroe	sejoe	M 84	+
L.interogans	Australis	bangkok	Bangkok D92	+
L.interogans	Australis	australis	Ballico	+
L.interogans	Australis	bratislava	Jez Bratislava	+
L.interogans	Autumnalis	akiyami A	Akiyami A	+
L.interogans	Autumnalis	rachmati	Rachmati	+
L.interogans	Bataviae	bataviae	Swart	+
L.interogans	Canicola	canicola	Hond UtrechtIV	+
L.interogans	Djasiman	djasiman	Djasiman	+
L.interogans	Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V	+
L.interogans	Hebdomaldis	hebdomaldis	Hebdomaldis	+
L.interogans	Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA(ATCC 43642)	+
L.interogans	Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M 20	+
L.interogans	Pomona	pomona	Pomona	+
L.interogans	Pyrogenes	pyrogenes	Salinem	+
L.interogans	Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno	+
L.interogans	Sejroe	wolffii	Wolffii	+
L.kirschneri	Cynopteri	cynopteri	3522 C	+
L.weilii	Celledoni	celledoni	Celledoni	+
Enterobacter cloacae			DMST 3557	-
Enterococcus faecalis			ATCC 33186	-
E.coli			ATCC 35218	-
Proteus mirabilis			DMST 8211	-
Proteus vulgaris			DMST 0557	
Pseudomonas aeroginosa			ATCC 27853	-
Serratia marcescens			ATCC 8100	-
Staphylococcus aureus			ATCC 12715	-
Staphylococcus epidermidis			ATCC 12228	-
Staphylococcu hyicus			DMST 4008	-
Staphylococcus intermedius			DMST 3784	-
Staphylococcus saprophyticus			DMST 3558	-
Alcaligenes faecalis			ATCC 35655	-
Klebsiella pneumoniae			ATCC 27736	-
Streotococcus milleri			DMST 4956	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบบันทึกการเก็บตัวอย่างการศึกษา

การหาแหล่งโรคและปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์

อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์

.No	ชนิดสัตว์	เพศ	อายุ (ปี)	เจ้าของ	serum	urine	culture	ลักษณะการเลี้ยง		
								ขังคอก	เลี้ยงปล่อย	ขังชั่วคราว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบสอบถามเกษตรกร

โครงการศึกษา

การสำรวจแหล่งโรคและปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรสิสในจังหวัดบุรีรัมย์

อำเภอห้วยราช จังหวัดบุรีรัมย์

ตัวอย่างเลขที่.....ชื่อสัตว์.....

เพศ ☐...ผู้ ☐ เมีย อายุ (ปี).....

1. ชื่อเจ้าของสัตว์.....

   บ้านเลขที่.....

2. จำนวนสัตว์เลี้ยง

   โคจำนวน.....ตัว กระบือจำนวน.....ตัว

   สุกรจำนวน.....ตัว สุนัขจำนวน.....ตัว

3. ลักษณะการเลี้ยง

   ☐ เลี้ยงปล่อยตลอดเวลา ☐ เลี้ยงขังคอกตลอดเวลา

   ☐ เลี้ยงปล่อยบางเวลา

4. ลักษณะโรงเรือน

   ☐ ใต้ถุนบ้าน ☐ คอกอยู่ในบริเวณบ้าน

5. สิ่งแวดล้อมบริเวณบ้านและโรงเรือน

   ☐ มีหนูชุกชุม ☐ ไม่มีหนู

   ☐ มีแอ่งน้ำขัง ☐ ไม่มีแอ่งน้ำขัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางธรรมวรรณ หนุนไธสง เกิดวันที่ 19 เมษายน พ.ศ. 2514 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีการศึกษา 2537 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตร วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวแพทยสาธารณสุข จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2542

ปัจจุบันรับราชการตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ 5 กลุ่มงานควบคุมโรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย