

การศึกษามลของการใช้ยาฆ่าแมลงต่อโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูตะเภาที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง



พันธรี นพดล แสงจันทร์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

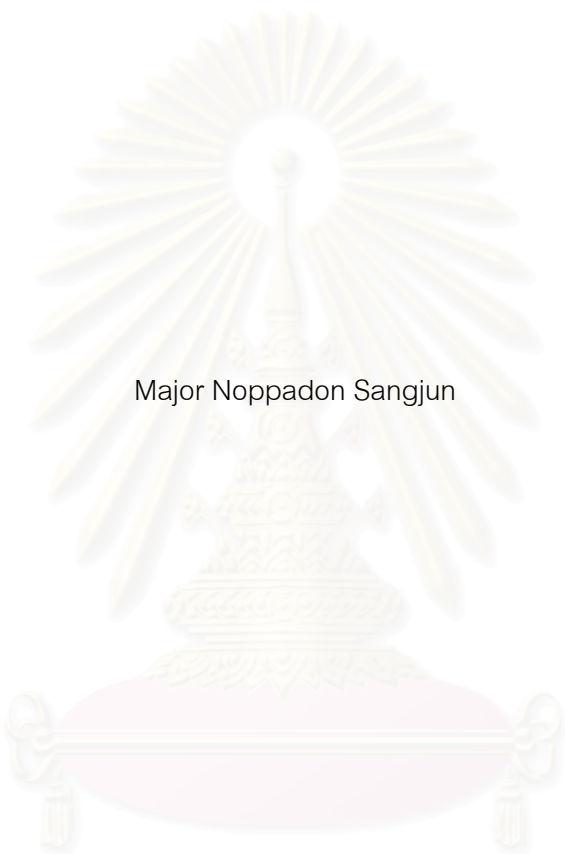
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF RAPAMYCIN ON SEVERE PULMONARY LEPTOSPIROSIS IN GUINEA PIGS MODEL



Major Noppadon Sangjun

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

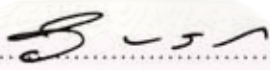
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษากลไกของการใช้ยารักษาไมซินต่อโรคเลปโตสไปโรซิสใน หนูตะเภาที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง
โดย	พันตรี นพดล แสงจันทร์
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. วิจิตร บรรลุนารา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณัฐวีร์ ประภัสระกุล

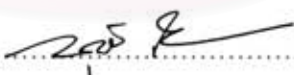
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

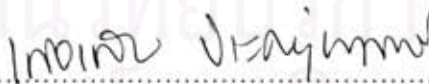
 คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อัจฉรียา ไสละสูต)

 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. วิจิตร บรรลุนารา)

 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ณัฐวีร์ ประภัสระกุล)

 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์)

 กรรมการ
(พันเอกหญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ)

นพดล แสงจันทร์ : การศึกษาผลของการใช้ยารักษาไมซินต่อโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูตะเภาที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง (THE EFFECT OF RAPAMYCIN ON SEVERE PULMONARY LEPTOSPIROSIS IN GUINEA PIGS MODEL) อ.ที่ปรึกษา : รศ. น.สพ. ดร. วิจิตร บรรณานารา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. น.สพ. ดร. อนุวีร์ ประภัสระกุล, 106 หน้า

การศึกษาผลของการใช้ยารักษาไมซินต่อโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูตะเภาที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง โดยแบ่งหนูตะเภาอายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 36 ตัว ออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้คือ กลุ่ม 1 (Normal) เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่ม 2 (Rapa) เป็นกลุ่มที่ได้รับการป้อนยา rapamycin ขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก กลุ่ม 3 (Lepto) เป็นกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar pyrogenes ปริมาณ 0.5×10^8 ตัว และ กลุ่มที่ 4, 5 และ 6 (Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈) เป็นกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ปริมาณ 0.5×10^8 ตัว และได้รับการป้อนยา rapamycin ขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ในช่วงเวลาที่ 0, 24 และ 48 ภายหลังการฉีดเชื้อ สุ่มหนูตะเภาจำนวน 2 ตัวในแต่ละกลุ่ม ในวันที่ 2, 4 และ 6 ทำการศึกษาทางพยาธิวิทยา การตรวจค่าทางโลหิตวิทยา การตรวจค่าชีวเคมีคลินิก เทคนิคฮิสโตเคมี Warthin-Starry การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน และเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence antibody technique; IFAT) ผลการศึกษาพบว่าภายหลังการฉีดเชื้อ 6 วัน หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง และพบปื้นเลือดออกอย่างรุนแรงที่ผนังช่องท้อง ในขณะที่กลุ่ม Lepto เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างปานกลาง และพบจุดเลือดออกที่ผนังช่องท้องอย่างอ่อน ผลทางจุลพยาธิวิทยาที่ปอดพบว่าหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรง ในขณะที่กลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ เกิดภาวะเลือดออกที่ปอดปานกลาง ที่ดับพบว่ากลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบเพียงการบวมของเซลล์ตับ ในขณะที่ กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการตายของเซลล์ตับเป็นหย่อมๆ ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ และหลอดเลือดแดง และกลุ่ม Lepto พบการคั่งเลือดของ hepatic sinusoids อย่างรุนแรง สำหรับที่ไตพบว่ากลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบภาวะเลือดออกที่ไตเล็กน้อย ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบเลือดออกทั้งรอบๆหน่วยกรองไต และท่อไต ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต และกลุ่ม Lepto พบการตายของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต ร่วมกับการแทรกตัวของนิวโทรฟิลจำนวนมากรอบๆหน่วยกรองไต และท่อไต ผลการศึกษาด้วยวิธี IFAT พบว่ากลุ่ม Lepto พบการสะสมของ IgM ที่ผนังงูลมของปอด และที่หน่วยกรองไตอย่างชัดเจน กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบการสะสมของ IgM ที่ปอด และไตเล็กน้อย ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ ไม่พบการสะสมของ IgM จากผลการทดลองสรุปว่ายา rapamycin สามารถลดการสะสมของ IgM ตลอดจนลดรอยโรคที่ปอด ตับ และไตในหนูตะเภาได้ เมื่อหนูตะเภาได้รับยา rapamycin ภายหลังการฉีดเชื้อทันที แต่ยา rapamycin ไม่สามารถป้องกันการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอด และเมื่อได้รับยา rapamycin ภายหลังการฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง ทำให้เกิดรอยโรคที่อวัยวะเหล่านั้นอย่างรุนแรงมากขึ้น

ภาควิชาพยาธิวิทยา
สาขาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4775562531 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD: LEPTOSPIROSIS / RAPAMYCIN / GUINEA PIG / EFFECT / LUNG

NOPPADON SANGJUN : THE EFFECT OF RAPAMYCIN ON SEVERE PULMONARY LEPTOSPIROSIS IN GUINEA PIGS MODEL. THESIS ADVISOR : WIJIT BANLUNARA, Ph.D, THESIS COADVISOR: NUVEE PRAPASARAKUL, Ph.D, 106 pp.

To study the effect of rapamycin on severe pulmonary leptospirosis, thirty-six, 3-week-old guinea pigs were divided into 6 groups (n = 6 in each group) namely. Group 1 (Normal) was a control group. Group 2 (Rapa) was fed with rapamycin (1 mg/kg/day). Group 3 (Lepto) was challenged with *Leptospira interrogans* serovar pyrogenes about 0.5×10^8 bacteria. Group 4, 5 and 6 (Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ and Lepto rapa hr₄₈) were challenged with *Leptospira interrogans* serovar pyrogenes about 0.5×10^8 bacteria and started to feed with rapamycin (1 mg/kg/day) on 0, 24 and 48 hours post inoculation and followed once daily. Two animals of each group were euthanized on 2, 4 and 6 days post inoculation. Pathology, hematology, blood chemistry, Warthin-Starry method, transmission electron microscopy and immunofluorescence antibody technique (IFAT) were studied. Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ and Lepto rapa hr₄₈ revealed severe thrombocytopenia and severe ecchymotic peritoneal hemorrhage while Lepto revealed moderate thrombocytopenia and mild petechial peritoneal hemorrhage. Histopathology of lung, Lepto rapa hr₄₈ revealed severe multifocal pulmonary hemorrhage while Lepto, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ revealed moderate multifocal pulmonary hemorrhage. Histopathology of liver, Lepto rapa hr₀ revealed cloudy swelling of hepatic parenchymal cells while Lepto rapa hr₂₄ and Lepto rapa hr₄₈ shown multifocal hepatocellular necrosis with the infiltration of neutrophils and lymphocytes around the portal veins and hepatic arteries and Lepto revealed severe hepatic sinusoid congestion. Histopathology of kidney, Lepto rapa hr₀ revealed mild interstitial hemorrhage with renal tubular cell swelling while Lepto rapa hr₂₄ and Lepto rapa hr₄₈ revealed moderate interstitial hemorrhage with renal tubular cell swelling and Lepto revealed moderate interstitial hemorrhage and renal tubular necrosis. The IFAT results of the alveolar basement of lung and glomerulus of kidney, Lepto revealed high IgM deposition while Lepto rapa hr₄₈ revealed few IgM deposition. Whereas Lepto rapa hr₀ and Lepto rapa hr₂₄ revealed the absence of IgM deposition. The study concluded that rapamycin reduced IgM deposition and alleviated lesions in lung, liver and kidney when rapamycin were concurrently fed. However, rapamycin could not prevent pulmonary hemorrhage and if guinea pigs were fed rapamycin after 48 hours post inoculation, the severity of lesions were increased in those organs.

Department of Veterinary Pathology
Field of study Veterinary Pathobiology
Academic year 2007

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ. น.สพ. ดร. วิจิตร บรรณานารายณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. น.สพ. ดร. ญูวีร์ ประภัสระกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผศ. นพ. เกื้อเกียรติ ประดิษฐ์พรศิลป์ และ พ.อ.หญิง ดวงพร พูลสุขสมบัติ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และความกรุณาในการช่วยตรวจทาน แก้ไข ต้นฉบับวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ

พลตรีสีปพงศ์ สังขมัย อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร และพลตรีพิวัฒน์ โปษยานนท์ อดีตรองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารที่อนุญาตในการลาศึกษาต่อ และอนุมัติทุนการศึกษา

ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยส่วนหนึ่ง

นักวิทยาศาสตร์และบุคลากรหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน และนายสุประดิษฐ์ หวังในธรรม ที่ให้ความร่วมมือและคำแนะนำในการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

รศ. น.สพ. ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช หัวหน้าหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ และน.สพ. รชฎ ดันติเลิศเจริญ หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ และความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยือกแข็ง

ดร.เจตสุมน ประจำศรี และคุณน้องนุช ยี่มอำนวยการโชค แผนกกีฏวิทยา หน่วยวิจัยฝ่ายสหรัฐอเมริกา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่ให้คำแนะนำ และความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ตลอดจนอุปกรณ์ถ่ายภาพ

พ.อ.หญิง สุภาณี มีศิริ อดีตผู้อำนวยการกองวิเคราะห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย สารเคมี และอุปกรณ์ จ.ส.อ.ยุทธพงษ์ สุดสวาท ส.อ.อนุภาพ อีชา นายสุรินทร์ ผูกเพทาย และนายมานะ มรกตจรัสรุ่ง บุคลากรแผนกสัตว์ทดลองที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

แผนกชีวเคมี และบุคลากรทุกท่านของแผนกฯ ที่ความอนุเคราะห์ในการตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณนายทวิ แสงจันทร์ นางจินตนา แสงจันทร์ บิดา มารดา ขอขอบคุณนางศรีวรรณ แสงจันทร์ ภรรยา และขอขอบใจด.ญ.นลินรัตน์ แสงจันทร์ และด.ญ.วรรณกร แสงจันทร์ บุตรสาวทั้งสองคนที่เป็นกำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบาญ.....	ช
สารบาญตาราง.....	ฌ
สารบาญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 คำถามสำหรับงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิส.....	4
2.2 สาเหตุของโรค.....	5
2.3 พยาธิกำเนิดของเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i>	5
2.4 ผลของการติดเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> ต่อ การกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์.....	6
2.5 อาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซิส.....	7
2.6 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิส.....	7
2.7 การรักษาโรค.....	8
2.8 ยารักษาไม่ขึ้น.....	9
3 ระเบียบวิธีวิจัย.....	11
3.1 สัตว์ทดลอง.....	11
3.2 เชื้อเลปโตสไปรา.....	11
3.3 ยา และขนาดยา.....	11
3.4 วิธีการทดลอง.....	12

บทที่	หน้า
4 ผลการศึกษา.....	18
4.1 นำหนักตัว.....	18
4.2 ผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง.....	18
4.3 ผลทางมหาวิทยาลัย.....	20
4.4 ผลทางพยาบาลวิทยาคลินิก.....	33
4.5 ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอด ตับ และไต.....	43
4.6 ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องผ่าน.....	62
4.7 ผลการตรวจการสะสมของสารอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT	68
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	87
รายการอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก.....	100
ภาคผนวก ข.....	103
ภาคผนวก ค.....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	106

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในสัตว์เก็บกักโรคชนิดต่างๆ.....	4
2 แสดงการให้ระดับคะแนนความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาของภาวะเลือดออกที่ปอด.....	15
3 แสดงผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH.....	19
4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	33
5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	34
6 แสดงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	35
7 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	36
8 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเกล็ดเลือดของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	37
9 แสดงค่าเฉลี่ย BUN ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	38
10 แสดงค่าเฉลี่ย Creatinine ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	39
11 แสดงค่าเฉลี่ย AST ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	40
12 แสดงค่าเฉลี่ย ALT ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	41
13 แสดงค่าเฉลี่ย ALP ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	41
14 แสดงการตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Warthin-Starry method.....	57
15 แสดงการสะสมของ IgM ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี IFAT.....	69
16 แสดงการสะสมของ IgG ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี IFAT.....	75
17 แสดงการสะสมของ IgA ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี IFAT.....	79
18 แสดงการสะสมของ C3 ในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธี IFAT.....	83

สารบัญภาพ

ภาพประกอบที่	หน้า
1 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 2 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	21
2 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 2 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	22
3 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 2 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	23
4 แสดงรอยโรคที่ตับในวันที่ 2 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	24
5 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 4 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	25
6 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 4 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	26
7 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 4 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	27
8 แสดงรอยโรคที่ตับในวันที่ 4 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	28
9 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 6 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	29
10 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 6 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	30
11 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 6 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	31
12 แสดงรอยโรคที่ตับในวันที่ 6 ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	32
13 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	33
14 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	34
15 แสดงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	35
16 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	36
17 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเกล็ดเลือดของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	37
18 แสดงค่าเฉลี่ย BUN ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	38
19 แสดงค่าเฉลี่ย Creatinine ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	39
20 แสดงค่าเฉลี่ย AST ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	40
21 แสดงค่าเฉลี่ย ALT ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	41
22 แสดงค่าเฉลี่ย ALP ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่ม.....	42
23 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal.....	45
24 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal.....	45
25 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal.....	46
26 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa.....	46
27 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa.....	47
28 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa.....	47

ภาพประกอบที่	หน้า
29	แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....48
30	แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....49
31	แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....50
32	แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....51
33	แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....52
34	แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....53
35	แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....54
36	แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....55
37	แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ , Lepto rapa hr ₂₄ , Lepto rapa hr ₄₈ และ Lepto.....56
38	แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₄₈ ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ, Warthin-Starry method.....58
39	แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ, Warthin-Starry method.....59
40	แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₀ ในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ, Warthin-Starry method.....60
41	แสดงการตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราที่ไตของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr ₄₈ วันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ, Warthin-Starry method.....61
42	แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ปอดของหนูตะเภา Lepto d ₆ , TEM.....63
43	แสดงปอดของหนูตะเภา Lepto d ₆ , TEM.....64
44	แสดงปอดของหนูตะเภา Lepto rapa hr ₀ -d ₆ , TEM.....64

ภาพประกอบที่	หน้า
45	แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ติดของหนูตะเภา Lepto d ₆ , TEM.....65
46	แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ไตของหนูตะเภา Lepto d ₆ , TEM.....66
47	แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ไตของหนูตะเภา Lepto rapa hr ₀ -d ₆ , TEM.....67
48	แสดงผลการตรวจพบการสะสม IgM ในปอด ด้วยวิธี IFAT.....70
49	แสดงผลการสะสมของ IgM ที่ผนังถุงลม ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 4, IFAT.....71
50	แสดงผลการสะสมของ IgM ที่ผนังถุงลม ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 6, IFAT.....71
51	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgM ในไต ด้วยวิธี IFAT.....72
52	แสดงผลการสะสมของ IgM ที่กลอเมอรูลัส ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 4, IFAT..73
53	แสดงผลการสะสมของ IgM ที่กลอเมอรูลัส ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 6, IFAT...73
54	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgM ในตับ ด้วยวิธี IFAT.....74
55	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในปอด ด้วยวิธี IFAT.....76
56	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในไตด้วยวิธี IFAT.....77
57	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในตับ ด้วยวิธี IFAT.....78
58	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในปอด ด้วยวิธี IFAT.....80
59	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในไตด้วยวิธี IFAT.....81
60	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในตับ ด้วยวิธี IFAT.....82
61	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในปอด ด้วยวิธี IFAT.....84
62	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในไตด้วยวิธี IFAT.....85
63	แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในตับ ด้วยวิธี IFAT.....86

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Leptospira interrogans* เป็นโรคสัตว์ติดต่อกับคนที่สำคัญและพบได้ทั่วโลก (Bharti *et al.*, 2003) และเป็นโรคติดเชื้อที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย กล่าวคือระหว่างปี พ.ศ.2515-2524 มีรายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทยเพียงปีละ 10-20 รายต่อปี และระหว่างปี พ.ศ.2525-2537 มีรายงานผู้ป่วยสูงขึ้นเป็น 55-272 รายต่อปี ต่อมาระหว่างปี พ.ศ.2538-2546 มีรายงานผู้ป่วยสูงมากขึ้นเรื่อยๆ ระหว่าง 143-14,285 รายต่อปี (Tangkanakul *et al.*, 2005)

การติดเชื้อก่อโรคเลปโตสไปโรซิส อาจทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญ คือ ภาวะไตวายเฉียบพลัน และภาวะการหายใจล้มเหลว (Plank and Dean, 2000; Thammakumpee *et al.*, 2005) ปัจจุบันพบอุบัติการณ์ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง (severe pulmonary Leptospirosis) แทรกซ้อนสูงขึ้นในประเทศต่างๆ ได้แก่ นิการากัว จีน บราซิล ออสเตรเลีย อาร์เจนตินา เกาหลี อินเดีย และไทย (Pereira *et al.*, 2005) และพบว่าผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากภาวะเลือดออกในปอด (pulmonary haemorrhage) อย่างรุนแรงเพิ่มสูงขึ้น (Wagenaar *et al.*, 2007; Dolhnikoff *et al.*, 2007) โดยเฉพาะประเทศไทยพบว่าภาวะเลือดออกในปอดนี้เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทยเสียชีวิต (Panaphut *et al.*, 2002; Tangkanakul *et al.*, 2005) ทำให้มีการศึกษาถึงกลไกการเกิดโรคที่ทำให้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเกิดภาวะดังกล่าว ตลอดจนวิธีการรักษาโรคนี้อย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามยังคงมีรายงานของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่เสียชีวิตจากภาวะเลือดออกในปอดในหลายๆ ประเทศ เช่น ไต้หวัน (Yang and Hsu, 2005), เกาะรียูเนียน (reunion island) ซึ่งเป็นอาณานิคมของประเทศฝรั่งเศส (Paganin *et al.*, 2007) รวมทั้งประเทศไทย (ฐิติพงษ์ และคณะ, 2550)

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กลไกทางภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค อาจเป็นปัจจัยสำคัญต่อกลไกของการเกิดโรค โดยเชื้อเลปโตสไปราสามารถกระตุ้นทำให้เกิดการอักเสบของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไต ปอด และระบบประสาทส่วนกลาง โดยพบการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6 และ IL-10 เป็นต้น (Levett, 2001; Dorigatti *et al.*, 2005) ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอดจากผู้ที่เสียชีวิตจากโรคเลปโตสไปโรซิส ที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรงด้วยวิธี immunofluorescence (IFA) โดย Yang และ Hsu (2005) พบการสะสมของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin, Ig) ที่ผนังถุงลม และในถุงลม สอดคล้องกับ

การศึกษาของ Nally และคณะ (2004) ซึ่งพบว่าหนูตะเภาที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar copenhageni จะเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรง ร่วมกับภาวะไตอักเสบที่มีการตายของเซลล์เยื่อบุท่อไต และพบ IgM, IgG, IgA และคอมพลีเมนต์ตัวที่ 3 (C3) ที่ผนังถุงลม ซึ่ง Nally และคณะ (2004) ได้อธิบายการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรงว่า อาจเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย กล่าวคือมีการจับกับระหว่าง IgM, IgG และ IgA กับ แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา (Leptospiral antigen) ชนิดใดชนิดหนึ่งเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (immune complex) ที่ผนังถุงลม เป็นผลให้เกิดการตรึงคอมพลีเมนต์ตัวที่ 3 ที่เยื่อผนังถุงลม ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อผนังถุงลม มีผลให้เกิดเลือดออกในถุงลมเป็นจำนวนมาก

โดยอาศัยสมมุติฐานของการเกิดพยาธิสภาพของโรคเลปโตสไปโรซิสที่ปอดดังกล่าว โดยผ่านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยตรง หรือแอนติเจนชนิดต่างๆ ของเชื้อเลปโตสไปรา ทำให้นำไปสู่คำถามงานวิจัยว่า การลดหรือยับยั้งกลไกทางภูมิคุ้มกันของร่างกายที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อโดยตรง หรือแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา จะสามารถเปลี่ยนแปลงพยาธิกำเนิดของโรคในหนูตะเภาซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่ไวต่อเชื้อ (susceptible host) ของเชื้อเลปโตสไปรา (Merien *et al.*, 1998) ได้หรือไม่ การลดหรือการยับยั้งกลไกทางภูมิคุ้มกันของร่างกายอาจทำได้โดยการให้ยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ยาราปาไมซิน (Rapamycin) เป็นต้น

ยาราปาไมซิน เป็นยากดภูมิคุ้มกันที่ออกฤทธิ์ยับยั้งวงจรการเจริญของเซลล์ (cell cycle) ในช่วงกลางถึงช่วงท้ายของระยะ G_1 จึงมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของทั้ง ลิมโฟไซต์ ชนิดที (T lymphocyte) และลิมโฟไซต์ ชนิดบี (B lymphocyte) ตลอดจนยับยั้งการทำงานของ interleukin ชนิดต่างๆ ได้แก่ IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 และ IL-15 (Sehgal, 1998; Sehgal, 2003; Abbas and Lichtman, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง IL-2 และ IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่เหนี่ยวนำการเปลี่ยนลิมโฟไซต์ ชนิดบี เป็น antibody-producing cells ฉะนั้นยาราปาไมซินจึงมีผลการสังเคราะห์หิโมโกลบินชนิดต่างๆ ได้แก่ IgM, IgG และ IgA (Sehgal, 2003; Abbas and Lichtman, 2004) และลดกระบวนการตรึงคอมพลีเมนต์ที่ผนังถุงลมในที่สุด ซึ่งอาจช่วยบรรเทาความรุนแรงของภาวะเลือดออกในปอดได้

แนวความคิดในการใช้ยาราปาไมซินในโรคเลปโตสไปโรซิสนี้ เป็นแนวความคิดใหม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาในสัตว์ทดลองก่อน การศึกษานี้อาศัยการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูตะเภาซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่เป็นตัวแบบของรอยโรคเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรง ที่เกิดจากเชื้อเลปโตสไปรา (Nally *et al.*, 2004)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้ยารักษาไมซินต่อโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูตะเภา ที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเลือดออกในปอดของหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค

1.3 คำถามสำหรับงานวิจัย

1. ยารักษาไมซินสามารถบรรเทาความรุนแรงของรอยโรคที่ปอดของหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ได้หรือไม่
2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรงในหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคคืออะไร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ข้อมูลทางพยาธิวิทยาคลินิก ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา ตลอดจนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลองในการศึกษานี้ จะสร้างความเข้าใจในกลไกการเกิดภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรงในหนูตะเภาที่ติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคมมากขึ้น
2. แนวความคิดการใช้ยากดภูมิคุ้มกัน อาจเป็นแนวทางใหม่ในการรักษาโรคเลปโตสไปโรซิส เพื่อลดภาวะแทรกซ้อนของโรค ได้แก่ ภาวะเลือดออกในปอด

บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิส

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคสัตว์ติดต่อสู่คนที่สำคัญและพบทั่วโลก มีรายงานการระบาดทั้งในทวีปเอเชีย ยุโรป ออสเตรเลีย และอเมริกาใต้ โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีฝนตกชุก สภาพดินและอากาศมีความชื้นสูง เนื่องจากมีความเหมาะสมในการดำรงชีพของเชื้อชนิดนี้ (Visith and Karkiat, 2005) สำหรับประเทศไทยพบว่าในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนมิถุนายนถึงพฤศจิกายน เป็นช่วงเวลาที่มักพบการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิส (Panaphut *et al.*, 2002)

ในปี พ.ศ. 2429 Adolf Weil ได้รายงานพบผู้ป่วยครั้งแรก ที่เมือง Heidelberg ประเทศเยอรมัน และในปี พ.ศ. 2458 Inada และคณะ สามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยที่ทำงานในเหมืองแร่แห่งหนึ่งในประเทศญี่ปุ่นได้ และในปีเดียวกันที่ประเทศเยอรมัน Uhlenhuth และคณะ สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราจากหนูตะเภาที่ถูกฉีดเลือดของผู้ป่วยที่เป็นทหารได้ (Levett, 2001)

ผู้ป่วยติดเชื้อมีเชื้อเลปโตสไปราจากการสัมผัสกับเชื้อโดยตรง หรือการสัมผัสกับน้ำหรือดินที่ปนเปื้อนปัสสาวะที่มีเชื้อเลปโตสไปราของสัตว์เก็บกักโรคเช่น หนู แกะ ม้า โค กระบือ สุกร สุนัข แรคคูน และค่างคาว เป็นต้น ฉะนั้นบุคคลที่มีอาชีพเกษตรกรโดยเฉพาะชาวนา พนักงานทำความสะอาดท่อระบายน้ำ ชาวประมงน้ำจืด พนักงานในเหมืองแร่ พนักงานฆ่าและเนื้อสัตว์ ทหาร ตลอดจนสัตวแพทย์ถือเป็นบุคคลที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ (Bharti *et al.*, 2003)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในสัตว์เก็บกักโรคชนิดต่างๆ (Bharti *et al.*, 2003)

ชนิดของเชื้อ (seovars)	ชนิดสัตว์เก็บกักโรค
icterohaemorrhagiae&copenhageni	หนู
hardjo	แกะ โค กระบือ
pomona	สุกร โค กระบือ
tarassovi	สุกร
bratislava	ม้า
canicola	สุนัข
grippotyphosa	แรคคูน
cynopteri & wolffi	ค่างคาว

โรคเลปโตสไปโรซิสจัดเป็นโรคติดเชื้อที่สำคัญ ที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศ ไทย กล่าวคือในปี พ.ศ. 2515-2524 มีรายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทยเพียงปีละ 10-20 รายต่อปี และในปี พ.ศ. 2525-2537 มีรายงานผู้ป่วยสูงขึ้นเป็น 55-272 รายต่อปี ต่อมาในปี พ.ศ. 2538-2543 มีรายงานผู้ป่วยสูงมากขึ้นเรื่อยๆ 143-14,285 รายต่อปี (Tangkanakul *et al.*, 2005) ในปี พ.ศ. 2544 ผู้ป่วยเริ่มลดลงเหลือ 10,271 ราย และลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 จนถึงปี พ.ศ. 2548 โดยมีผู้ป่วย 6,864, 4,962, 3,199 และ 2,868 รายตามลำดับ และในปี พ.ศ.2549 มีการระบาดเพิ่มขึ้นเป็น 3,941 ราย (ธีรศักดิ์ และประวิทย์, 2550)

2.2 สาเหตุของโรค

โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดจากเชื้อ *Leptospira interrogans* ซึ่งจัดอยู่ในคลาส Schizomycetes ออเดอร์ Spirochaetales แฟมิลี Spirochaetaceae และจีนัส *Leptospira* แบ่งออกเป็น 12 สปีชีส์ ได้แก่ *L. alexanderi*, *L. biflexa*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. meyeri*, และ *L. wolbachii*. อย่างไรก็ตามการทดสอบโดยวิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) สามารถแบ่งเชื้อ *Leptospira spp.* ได้มากกว่า 250 ชนิด (serovar) เช่น autumnalis, australis, bataviae, copenhageni, icterohaemorrhagiae, javanica และ pyrogenes เป็นต้น (Plank and Dean, 2000)

เชื้อ *L. interrogans* เป็นสไปโรเชต (spirochete) แบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นเส้นเกลียว และที่ปลายทั้งสองข้างหรือข้างใดข้างหนึ่งงอเป็นตะขอ (hook) ตัวเชื้อมีขนาดกว้างประมาณ 0.1 ไมครอน และยาว 6-20 ไมครอน เคลื่อนไหวได้รวดเร็วโดยหมุนตัว หรือโดยการโค้งงอ แต่อาจพบเชื้อที่เป็นเส้นตรง ซึ่งมักจะหมุนหรือเคลื่อนไหวได้ช้า เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 6.8-7.4 แม้เชื้อเลปโตสไปราจะไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันซึ่งจำเป็นในการดำรงชีวิตได้ด้วยตัวเอง จำเป็นต้องอาศัยกรดไขมันภายในโฮสต์ แต่ก็สามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำใส หรือดินที่มีความชื้นได้นานหลายเดือน (Plank and Dean, 2000) Trueba และคณะ (2004) พบว่าเชื้อเลปโตสไปราสามารถอยู่ในน้ำใสที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ได้นานถึง 110 วัน ซึ่งในสภาพขาดอาหารดังกล่าวเมื่อนำเชื้อเลปโตสไปรามาวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunoblot พบว่ามีการลดลงของ inner membrane protein ชนิด LipL31 ในขณะที่ชนิดอื่นๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2.3 พยาธิกำเนิดของเชื้อ *Leptospira interrogans*

กลไกการเกิดโรคนี้โดยเชื้อ *L. interrogans* ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตามหลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกายของโฮสต์โดยผ่านผิวหนังหรือบาดแผล หรือผ่านทางเยื่อต่างๆ เช่น จมูก ปาก

ตา เป็นต้น เชื้อจะเข้าไปเจริญและแบ่งตัวในกระแสโลหิตเป็นจำนวนมาก เกิดภาวะ spirochetemia และกระจายไปทั่วร่างกาย โดยเฉพาะที่กล้ามเนื้อ หัวใจ ตับ ไต ปอด และระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดการชักและเนื้อตายของอวัยวะเหล่านั้น (Levett, 2001)

2.4 ผลของการติดเชื้อ *Leptospira interrogans* ต่อการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์

ภายหลังการติดเชื้อ *L. interrogans* พบการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ชนิดต่างๆ เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 และ IL-10 เป็นต้น (Dorigatti *et al.*, 2005) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ต่างๆดังกล่าว อาจเกิดจากเชื้อเลปโตสไปราเองหรือแอนติเจนจากชิ้นส่วนของเชื้อที่เป็น outer membrane ได้แก่ lipoprotein, lipopolysaccharide (LPS) และ glycolipoprotein (Yang *et al.*, 2001; Dorigatti *et al.*, 2005) โดย Dorigatti และคณะ (2005) พบว่า glycolipoprotein สามารถกระตุ้นโมโนไซต์ให้หลั่ง IL-6 ในปริมาณที่สูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 และมีปริมาณคงที่ต่อเนื่องไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ภายหลังการบ่ม glycolipoprotein ที่สกัดจากเชื้อ *L. interrogans* serovar copenhageni กับ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ในหลอดทดลอง สอดคล้องกับ Diamant และคณะ (2002) ซึ่งพบว่า glycolipoprotein ที่สกัดจากเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคสามารถกระตุ้น peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ในหลอดทดลองหลั่ง TNF- α ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ภายหลังการบ่ม โดยที่ TNF- α นี้สามารถกระตุ้นโมโนไซต์ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ได้แก่ IL-1, IL-6 และ IL-8

Hung และคณะ (2006) พบว่า Leptospiral outer membrane protein สามารถกระตุ้นการหลั่ง inflammatory cytokine เช่น TNF- α และ IL-6 เป็นต้น ผ่าน Toll like receptor (TLR)-2 ของ renal proximal tubule cell สอดคล้องกับ Yang และคณะ (2006)^a พบว่า Lipoprotein ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Leptospiral outer membrane protein สามารถกระตุ้นการหลั่ง pro-inflammatory cytokine จาก nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) pathway ผ่าน TLR-2 ของ renal proximal tubule cell เนื่องจาก TLR-2 สามารถพบได้ทั้งในมาโครฟาจ มาสต์ เซลล์ เดนไดรติกเซลล์ อีโอซิโนฟิล ตลอดจนเซลล์เยื่อใยในระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร และจากรายงานของ Isogai และคณะ (1990) พบว่าสาร Lipopolysaccharide (LPS) จากเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค มีบทบาททางภูมิคุ้มกันในการกระตุ้นลิพโพลีแซคคาไรด์ชนิดบีอย่างสูง ในขณะที่ไม่มีผลต่อลิพโพลีแซคคาไรด์ชนิดที และ NK cell สอดคล้องกับ Whitmore และคณะ (2004) ซึ่งพบว่า LPS จัดเป็น T-independent antigens ซึ่งสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของลิพโพลีแซคคาไรด์ชนิดบี และการผลิตแอนติบอดีโดยตรงที่ไม่อาศัยไซโตไคน์ หรือ co-stimulating signals จากปฏิสัมพันธ์ของลิพโพลีแซคคาไรด์ชนิดที และบีตามปกติ ฉะนั้นการที่แอนติเจนจากเชื้อเลปโตสไปรา จัดเป็น T-independent antigens และมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ต่างๆ ที่มี TLR-2 ดังกล่าว ทำให้เกิด

การสังเคราะห์ไฮโดรโคโรนจากเซลล์เหล่านั้นจำนวนมาก อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดอาการของโรคเลปโตสไปโรซิสอย่างรุนแรง และรวดเร็ว (Spicher *et al.*, 2005)

2.5 อาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซิส

อาการของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสอาจแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราที่ได้รับ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่อาการไม่รุนแรง หรือไม่มีอาการเหลือง (anicteric form) และกลุ่มที่อาการรุนแรง หรือมีอาการเหลือง (icterohaemorrhagic form) (Bharti *et al.*, 2003) กล่าวคือ ในกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง ผู้ป่วยมักมีอาการไข้เฉียบพลัน อาจมีไข้สูงติดต่อกันหลายวันสลับกับระยะไข้ลด (biphasic) ปวดศีรษะ ตาแดง ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง อาจมีคลื่นไส้ อาเจียน เยื่อหุ้มสมองอักเสบ และสามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ในปัสสาวะ และน้ำไขสันหลัง (Dolhnikoff *et al.*, 2007)

สำหรับกลุ่มที่มีอาการรุนแรง ผู้ป่วยมีอาการเริ่มแรกเหมือนในกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรง และมีอาการเพิ่มมากขึ้น โดยพบอาการดีซ่าน (jaundice) ภาวะไตวาย ภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง และภาวะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) ซึ่งหากไม่ได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง และทันเวลาที่ก็จะทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (Levett, 2001)

2.6 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิส

การศึกษาในสัตว์ทดลองเช่น หนูแฮมสเตอร์ หนูตะเภา เป็นต้น พบว่ารอยโรคที่กล้ามเนื้อจะพบเนื้อตายเป็นหย่อม (focal necrosis) ของเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ร่วมกับการแทรกเข้าของมาโครฟาจ นิวโทรฟิล และพลาสมาเซลล์ (Levett, 2001) รอยโรคที่หัวใจจะพบการอักเสบของหัวใจชนิด interstitial myocarditis ที่มีการแทรกเข้าของลิมโฟไซต์ และพลาสมาเซลล์ ร่วมกับมีจุดเลือดออกแบบ petechial hemorrhage ที่ epicardium และหลอดเลือดโคโรนารีอักเสบ (coronary arteritis) สำหรับรอยโรคที่ตับจะพบการเพิ่มจำนวนและขนาดของ Kupffer cells ร่วมกับการตายของเซลล์ตับแบบ apoptosis (Merien *et al.*, 1998)

รอยโรคที่ไตจะพบ tubulo-interstitial nephritis ที่มีการแทรกเข้าของนิวโทรฟิล และโมโนไซต์ ร่วมกับการตายของเยื่อท่อไต (tubular epithelial necrosis) การฉีกขาดของผนังท่อไต (basement membrane disruption) และพบเชื้อเลปโตสไปราในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (interstitium) และท่อไต (Yang *et al.*, 2001; Nally *et al.*, 2004) ซึ่งพบว่า outer membrane ของเชื้อมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดรอยโรคต่างๆที่ไต กล่าวคือ outer membrane ของเชื้อซึ่งประกอบด้วย lipopolysaccharide, peptidoglycan และ polysaccharide มีบทบาทเป็นทั้ง antigenic และ virulent component สามารถเหนี่ยวนำให้ตีเอ็นเอภายในนิวเคลียสของเซลล์ท่อไต (renal tubular cell) จับกับ NF-kappa B transcription factor ทำให้มีการสูงขึ้นของ nitric oxide, monocyte

chemoattractant protein-1 (MCP-1) ซึ่งเป็นคีโมไคน์ (chemokine) สำคัญที่เหนี่ยวนำการแทรกเข้าของโมโนไซต์ และ TNF- α ทำให้เหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบที่ไตดังกล่าว (Yang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจาก glycolipoprotein fraction ซึ่งเป็น Leptospiral endotoxin สามารถยับยั้งการทำงานของ Na^+, K^+ ATPase ที่อยู่ตามหน่วยไตได้ ทำให้ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส มีการขับของโซเดียมและโปแตสเซียมในปริมาณสูงมากเกินไป (Burth, 1997)

สำหรับรอยโรคที่ปอดจะพบภาวะเลือดออก (pulmonary hemorrhage) ทั้งในถุงลม (intra-alveolar hemorrhage) และในเนื้อเยื่อระหว่างถุงลม (interstitial hemorrhage) (Plank and Dean, 2000) ในการศึกษาของของ Nally และคณะ (2004) พบว่าหนูตะเภาที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar copenhageni รอยโรคที่ปอดเกิดภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรง ร่วมกับมีการหนาตัวของผนังถุงลม ที่มีการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (mononuclear cells) และนิวโทรฟิล ซึ่ง Nally และคณะ (2004) ได้อธิบายว่ากลไกการเกิดเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรง อาจเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน กล่าวคือมีการจับกับระหว่าง IgM IgG และ IgA กับแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราชนิดใดชนิดหนึ่งเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (immune complex) ที่ผนังถุงลม ซึ่งตรวจพบด้วยวิธี IFA ได้ตั้งแต่วันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ เป็นผลให้เกิดการตรึงคอมพลีเมนต์ตัวที่ 3 ที่เยื่อบุผนังถุงลม ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อบุผนังถุงลม มีผลให้เกิดเลือดออกในถุงลมเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pereira และคณะ (2005) ที่พบว่าลิง Marmoset ที่ถูกฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar copenhageni รอยโรคที่ปอดพบภาวะเลือดออกในถุงลม (intra-alveolar hemorrhage) ร่วมกับมีการหนาตัวของผนังถุงลมที่มีการแทรกเข้าของมาโครฟาจ นิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์ โดยเริ่มพบรอยโรคดังกล่าวตั้งแต่วันที่ 3 หลังการฉีดเชื้อ และพบความรุนแรงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่การศึกษาของ Pilakasiri และคณะ (2001) พบความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นที่ปอดดังกล่าวในหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ตั้งแต่วันที่ 2 หลังการฉีดเชื้อ อย่างไรก็ตาม Pereira และคณะ (2005) ได้อธิบายกลไกการเกิดภาวะเลือดออกในปอดว่า อาจเป็นผลมาจาก 2 สาเหตุ กล่าวคือ ประการที่หนึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายตามที่ Nally และคณะ (2004) ได้อธิบายไว้แล้ว หรือประการที่สองเชื้อเลปโตสไปราสามารถสร้างสารพิษต่างๆ ได้แก่ hemolysin และ sphingomyelinase ได้ ซึ่งทำความเสียหายแก่หลอดเลือดเล็กๆ เป็นผลให้มีการซึมผ่านของเลือดเข้าสู่ถุงลมเป็นจำนวนมาก

2.7 การรักษาโรค

ปัจจุบันการรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสยังไม่มีวิธีที่จำเพาะ การรักษาโรคขึ้นอยู่กับความรุนแรง และระยะเวลาการดำเนินของโรค การรักษาโดยทั่วไปได้แก่ การให้ยาปฏิชีวนะ เช่น

penicillin G, doxycycline และ ceftriaxone เป็นต้น (Suputtamongkol *et al.*, 2004; Pappas and Cascio, 2006) และการรักษาแบบประคับประคอง ได้แก่ การล้างไตทางช่องท้อง (peritoneal dialysis) เมื่อผู้ป่วยเกิดภาวะไตวายเฉียบพลัน และการใช้เครื่องช่วยหายใจเมื่อผู้ป่วยเกิดภาวะการหายใจล้มเหลว (Panaphut *et al.*, 2002; Turhan *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวจะได้ผลก็ต่อเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ หรือแสดงอาการ และปัญหาของการรักษาโรคนี้ คือ การตรวจวินิจฉัยโรคในระยะแรกของการเกิดโรคในปัจจุบันไม่มีวิธีใดที่มีประสิทธิภาพดี ประกอบกับผู้ป่วยมักมาพบแพทย์เมื่อมีการดำเนินของโรคไประยะหนึ่งแล้ว ทำให้ผู้ป่วยบางรายมีอาการที่รุนแรง และมีอาการแทรกซ้อนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภาวะไตวาย และภาวะมีเลือดออกในปอดอย่างรุนแรงตามมา การรักษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีภาวะเลือดออกในปอดอย่างรุนแรงร่วมด้วย มักประสบปัญหา เนื่องจากผู้ป่วยจะเกิดภาวะออกซิเจนในกระแสเลือดต่ำ (hypoxia) ทำให้ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยเครื่องช่วยหายใจ ซึ่งปัจจุบันมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะร่วมกับการให้ยา desmopressin (Laurent *et al.*, 2003) การให้ผู้ป่วยดม nitric oxide (Borer *et al.*, 1999; Vinetz, 2001) หรือร่วมกับการใช้เครื่อง Extra-corporeal membrane oxygenation (ECMO) (Arokianathan *et al.*, 2005)

2.8 ยารักษาไมซิน (Rapamycin)

การศึกษานี้เลือกใช้ยารักษาไมซิน เพื่อยับยั้งกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่อาจเป็นสาเหตุของภาวะเลือดออกในปอด ยารักษาไมซินเป็นยากรดภูมิคุ้มกันที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *Streptomyces hygroscopicus* (Ponticelli *et al.*, 2001) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลวระหว่าง 183-185 องศาเซลเซียส มีโครงสร้างทางเคมีแบบ lipophilic macrocyclic lactone สามารถละลายได้ในสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) แต่ไม่ละลายในน้ำ ยานี้มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ยับยั้งวงจรการเจริญของเซลล์ ในช่วงกลางถึงช่วงท้ายของระยะ G₁ จึงมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของทั้ง T lymphocyte และ B lymphocyte ตลอดจนยับยั้งการทำงานของ interleukin ชนิดต่างๆ ได้แก่ IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12 และ IL-15 (Sehgal, 1998; Sehgal, 2003; Abbas and Lichtman, 2004) การศึกษาผลของการใช้ยารักษาไมซินในหนูตะเภาโดย Francichi และคณะ (1993) พบว่าการใช้ยารักษาไมซินในขนาด 0.012-5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ภายหลังจากฉีด Sephadex bead เข้าเส้นเลือด สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบที่ปอด และหลอดลม โดยยับยั้งการแทรกเข้ามาสะสมของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ได้แก่ อิโอซิโนฟิล นิวโทรฟิล มาโครฟาจ และลิมโฟไซต์ ที่ปอดและหลอดลม และผลข้างเคียงของยารักษาไมซินในสัตว์ประเภหนูถีบจักร กระต่าย และสุกรมีน้อยมาก จากการศึกษาการให้ยาชนิดนี้แก่หนูถีบจักรในขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่าปกติ 50 เท่า โดยฉีดเข้าช่องท้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าทำให้ค่า blood urea nitrogen สูงขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้การศึกษานี้ยัง

ชนิดนี้แก๊สแก๊ส (Cynomolgus monkey) โดยการป้อนในขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 60 วัน พบว่าระดับของค่าซีวเคมีคลินิกส่วนใหญ่อยู่ในระดับปกติ ยกเว้นค่า triglyceride ที่มีระดับสูงขึ้นกว่าปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sehgal, 2003)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูตะเภา (*Cavia porcellus*) พันธุ์ Dunkin Hartley อายุ 3 สัปดาห์ น้ำหนัก 100-200 กรัม เพศเมีย มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 36 ตัว และทำการทดลองที่แผนกสัตว์ทดลอง กองวิเคราะห์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทยทหารบก สัตว์ทดลองได้รับการเลี้ยงดูในห้องสัตว์ทดลองที่มีเครื่องปรับอากาศที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ได้รับอาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูปชนิดเม็ด (CP 086) และน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) การปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองกระทำตาม *Guide for the care and use of laboratory animals* ของ National Research Council (1996) และการศึกษานี้ได้รับอนุญาตให้ใช้สัตว์ทดลองโดยคณะกรรมการพิจารณาการใช้สัตว์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามใบอนุญาตให้ใช้สัตว์ในงานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ งานสอน และ งานอื่นๆ เลขที่ 37/2549 ลงวันที่ 5 เมษายน พ.ศ. 2549

3.2 เชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ที่แยกได้จากหนูนา (*Bandicota indica*) จากจังหวัดเชียงรายในปี พ.ศ. 2545 เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris (EMJH) ชนิดกึ่งเหลว (ภาคผนวก ก) ที่ผ่านการจำแนกชนิดโดยชุดตรวจ Leptolater[®] ของภาคควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล และได้ใช้ในการทดลองโรคเลปโตสไปโรซิสในหนูแฮมสเตอร์ (Praditpomsilpa *et al.*, 2006)

การนำเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งเหลว และทำให้เชื้อมีความรุนแรงมากขึ้น โดยการฉีดเชื้อผ่านในหนูแฮมสเตอร์จำนวน 3 ครั้ง และนำไตของหนูแฮมสเตอร์ในครั้งที่ 3 มาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง และเลี้ยงต่อในอาหาร EMJH ชนิดเหลว ได้มีจำนวนมากเพียงพอ จึงทำการนับจำนวนเชื้อด้วย Petroff-Hauser counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด (Dark field microscope) และปรับให้มีปริมาณเชื้อความเข้มข้น 1×10^8 ตัว/มิลลิลิตร สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

3.3 ยา และขนาดยา

ยารามาไมซิน (Rapamune®; Wyeth, USA.) ในขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการป้อนทางปาก

3.4 การทดลอง

3.4.1 สัตว์ทดลอง

หนูตะเภาจำนวน 36 ตัว แบ่งใช้ในการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม 3 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ดังนี้

- Normal เป็นกลุ่มควบคุม หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว เป็นหนูปกติที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes และป้อนยารามาไมซิน
- Rapa เป็นกลุ่มควบคุมบวก 1 หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว ได้รับการป้อนยารามาไมซิน ขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก
- Lepto เป็นกลุ่มควบคุมบวก 2 หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ในขนาดความเข้มข้น 1×10^8 ตัว/มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว (lethal dose) ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal route) และป้อนน้ำกลั่นแทนยารามาไมซิน
- Lepto rapa hr₀ เป็นกลุ่มทดลองที่ 1 หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ขนาดความเข้มข้น 1×10^8 ตัว/มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว ฉีดเข้าช่องท้อง และได้รับการป้อนยารามาไมซินขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปากภายหลังการฉีดเชื้อทันที และป้อนต่อเนื่องวันละ 1 ครั้ง
- Lepto rapa hr₂₄ เป็นกลุ่มทดลองที่ 2 หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ขนาดความเข้มข้น 1×10^8 ตัว/มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว ฉีดเข้าช่องท้อง และเริ่มป้อนยารามาไมซินขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก ในชั่วโมงที่ 24 ภายหลังการฉีดเชื้อ และป้อนต่อเนื่องวันละ 1 ครั้ง
- Lepto rapa hr₄₈ เป็นกลุ่มทดลองที่ 3 หนูตะเภาจำนวน 3 ตัว ได้รับการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ในขนาดความเข้มข้น 1×10^8 ตัว/มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว ฉีดเข้าช่องท้อง และเริ่มป้อนยารามาไมซินขนาด 1.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ทางปาก ในชั่วโมงที่ 48 ภายหลังการฉีดเชื้อ และป้อนต่อเนื่องวันละ 1 ครั้ง

3.4.2 แผนการทดลอง และการเก็บตัวอย่าง

ก. วันแรกของการทดลอง หนูตะเภาทั้งหมดในกลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ถูกฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar pyrogenes ความเข้มข้น 1x10¹⁰ ตัว/มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร/ตัว เข้าช่องท้อง หนูตะเภาในกลุ่ม Normal, กลุ่ม Lepto, กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ได้รับการป้อนน้ำกลั่น ในขณะที่กลุ่ม Rapa และ Lepto rapa hr₀ ได้รับการป้อนยารูปาไมซิน ตามขนาดที่ระบุไว้ข้างต้นทันทีหลังการฉีดเชื้อ ทำการสังเกต และบันทึกอาการทางคลินิก พฤติกรรม การกินอาหาร และน้ำหนักตัวของหนูตะเภาทุกกลุ่ม ทุกวันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ข. ภายหลังจากการฉีดเชื้อ 24 ชั่วโมง หนูตะเภาในกลุ่ม Normal ,กลุ่ม Lepto และ Lepto rapa hr₄₈ ได้รับการป้อนน้ำกลั่น ในขณะที่กลุ่ม Rapa, Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ ได้รับการป้อนยารูปาไมซิน ตามขนาดระบุไว้ข้างต้น

ค. ภายหลังจากการฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง หนูตะเภาในกลุ่ม Normal และกลุ่ม Lepto ได้รับการป้อนน้ำกลั่น ในขณะที่กลุ่ม Rapa, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ได้รับการป้อนยารูปาไมซิน ตามขนาดระบุไว้ข้างต้น และป้อนต่อเนื่องวันละ 1 ครั้ง จนถึงสิ้นสุดการทดลอง

ง. ในวันที่ 2 4 และ 6 ของการทดลองหนูตะเภา 1 ตัว จากแต่ละกลุ่ม ถูกทำให้ตายอย่างสงบด้วยการฉีดโซเดียมไธโอเพนทอล เข้าช่องท้อง ในขนาด 150-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Clifford, 1984) เจาะเก็บเลือดจากหัวใจปริมาณ 10 มิลลิลิตร ใช้เลือดปริมาณ 2 หยด เพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเชื้อเลปโตสไปรา EMJH ชนิดกึ่งแข็ง และนำเลือดที่เหลือแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งเก็บในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA สำหรับตรวจค่าทางโลหิตวิทยา และส่วนที่สองนำไปแยกซีรัม และเก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอตรวจวิเคราะห์ค่าชีวเคมีคลินิก ทำการผ่าซากเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา เก็บตัวอย่างไต ปอด ตับ และม้าม แบ่งชิ้นเนื้อต่างๆเป็น 4 ส่วน ส่วนที่หนึ่งสำหรับเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา ส่วนที่สองเก็บในภาชนะที่บรรจุ 10% buffer formalin สำหรับการศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยา ส่วนที่สามเก็บในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง (dry ice) สำหรับการศึกษาด้านวิธี immunofluorescence antibody technique และส่วนที่สี่เก็บใน 2% glutaraldehyde ในสารละลาย Phosphate buffer solution (PBS) pH 7.0 สำหรับการศึกษาด้านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

3.4.3 การตรวจทางห้องปฏิบัติการ ดังนี้

ก. การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง (Adler *et al.*, 1986)

นำชิ้นเนื้อตัวอย่างจากตับ และไต ที่เก็บด้วยวิธีปลอดเชื้อ บดด้วย Ten broek tissue grinder ใน PBS pH 7.4-7.8 ในอัตราส่วน 1:10 จนละเอียด หยดเนื้อเยื่อที่แขวนลอยใน

PBS และตัวอย่างเลือดอย่างละ 2-3 หยด ลงในหลอดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง ตัวอย่างละ 2 หลอด บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 – 30 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจหาเชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (dark field microscope) ทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน

ข. การตรวจทางพยาธิวิทยาคลินิก (clinical pathology) ได้แก่ การตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง, ปริมาณเม็ดเลือดขาว, ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และปริมาณเกล็ดเลือด โดยใช้เครื่องตรวจนับเม็ดเลือดแบบอัตโนมัติ (Coulter Max M, USA) และการตรวจวิเคราะห์ค่าชีวเคมีคลินิก ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) และ alkaline phosphatase (ALP) โดยใช้เครื่องมือการตรวจวิเคราะห์ชีวสารแบบอัตโนมัติ (Hitachi 911, Japan)

ค. การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology) และฮิสโตเคมี (Histochemistry)

ค.1 การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาไต ปอด ตับ และม้าม โดยการย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี H&E stain เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Luna, 1994)

นำชิ้นเนื้อตัวอย่างต่างๆ ที่เก็บในสารแช่บัพเฟอร์ฟอร์มอลิน นาน 24 ชั่วโมง ผึ่งลงในก้อนพาราฟิน ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้ ตัดแต่งชิ้นเนื้อ และทำการล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา นาน 60 นาที ทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration step) โดยแช่ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไประดับสูง (70%, 80%, 90%, 100%) และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing step) ใน xylene 2 ครั้ง และผึ่งลงในก้อนพาราฟิน (paraffin embedding step) จากนั้นนำก้อนพาราฟินที่ผึ่งเนื้อเยื่อมาทำการตัด (sectioning) ด้วยเครื่องตัด microtome หนา 4 ไมครอน

ขั้นตอนการย้อมสี (staining) มีดังนี้คือ ละลายพาราฟินในสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อใน xylene 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ทำการเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อโดยแช่ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไประดับต่ำ (100%, 95%, 70%) โดยแต่ละขั้นตอนใช้เวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาย้อมสี Harris's hematoxylin นาน 5 นาที แล้วแช่ใน 1% acid alcohol 1-2 ครั้ง และแช่ใน LiCO_3 นาน 1 นาที จากนั้นจึงย้อมด้วยสี eosin นาน 2 นาที ทำการดึงน้ำออกโดยแช่ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไประดับสูง (70%, 95%, 100%) จากนั้นแช่ใน xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วจึงทำการตรึงสไลด์ด้วยน้ำยา permount และศึกษาจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

การให้คะแนนความรุนแรงของภาวะเลือดออกที่ปอดทางจุลพยาธิวิทยา
พิจารณาตามวิธีการของ Broccard และคณะ (1998) กล่าวคือแบ่งความรุนแรงของภาวะ
เลือดออกที่ปอดเป็น 6 คะแนน ตั้งแต่ 0-5 โดยพิจารณาจากจำนวนของเม็ดเลือดแดง (RBC) ในถุง
ลม (alveoli) ร่วมกับจำนวนของหลอดเลือดที่เกิด perivascular hemorrhage ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการให้ระดับคะแนนความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาของภาวะเลือดออกที่ปอด
(Broccard และคณะ (1998))

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา		คะแนน ความ รุนแรง
จำนวนของเม็ดเลือดแดง ในถุงลม	จำนวนของหลอดเลือด ที่เกิด Perivascular Hemorrhage	
1–25 RBC/alveoli	0	0
26–50 RBC/alveoli	1–2	1
1–3 Alveoli with 50 RBC	3–4	2
4–6 Alveoli with 50 RBC	5–6	3
7–9 Alveoli with 50 RBC	7–8	4
10 Alveoli with 50 RBC	9–10	5

ความรุนแรงของภาวะเลือดออกที่ปอดของแต่ละกลุ่มการทดลองของ
การศึกษานี้ ใช้ค่าเฉลี่ยของคะแนนความรุนแรงของภาวะเลือดออกที่ปอดจำนวน 3 ตัวอย่าง

ค.2 เทคนิคฮิสโตเคมีด้วยวิธี Warthin-Starry method เพื่อตรวจหาตัว
เชื้อเลปโตสไปราในปอด ตับ และไต (Luna, 1994; Chantamaneechote *et al.*, 2002)

การย้อมสีวิธีนี้มีขั้นตอนคือ ละลายพาราฟินในสไลด์เนื้อเยื่อ อบสไลด์ที่
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที แล้วแช่ใน xylene 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ทำการเติมน้ำ
เข้าเนื้อเยื่อโดยแช่ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไประดับต่ำ (100%, 95%, 70%) แช่สไลด์
เนื้อเยื่อใน distilled water 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แช่สไลด์เนื้อเยื่อในภาชนะแก้วที่ใส่ acidulated
water นาน 30 นาที และสารละลาย 0.5% silver nitrate แล้วนำไปอุ่นในตู้ควบคุมอุณหภูมิ
(incubator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ต่อมานำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ในน้ำยา
developer (ภาคผนวก ข.) ซึ่งเตรียมใหม่ๆ และมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสี
ของเนื้อเยื่อเปลี่ยนจากสีขาวเป็นน้ำตาลอ่อนหรือเหลืองอมน้ำตาล และนำสไลด์เนื้อเยื่อมาล้างใน

น้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ทำการดึงน้ำออกโดยแช่ในแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไประดับสูง (70%, 95%, 100%) และทำการเคลือบแข็งเพื่อกำจัดสารแอลกอฮอล์ ด้วย xylene 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วย cover glass โดยเติมน้ำยา mounting medium ประมาณ 1-2 หยด และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

ค.3 เทคนิค immunofluorescence antibody technique (IFAT) เพื่อตรวจการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ได้แก่ IgM, IgG, IgA และ C3 ในปอด ไต และตับ (Nally *et al.*, 2004)

นำชิ้นเนื้อต่างๆ มาฝังลงใน Cryomatrix (Shandon[®], USA) และทำการ snap frozen บน dry ice และทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาขนาด 4 ไมครอน และทำการตรึง (fixation) ใน acetone เย็น นาน 10 นาที สไลด์เนื้อเยื่อที่ได้ทำให้แห้งด้วยวิธี air dry และล้างใน PBS 5 นาที แช่ใน 0.3% hydrogen peroxide 10 นาที หลังจากนั้นล้างใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ต่อกจากนั้นนำสไลด์เนื้อเยื่อแช่ใน 10% ของซีรัมของหนูตะเภา หรือแพะ นาน 30 นาที นำสไลด์เนื้อเยื่อบ่มด้วยแอนติบอดีชนิด goat anti-guinea pig IgG (ICL, Newberg, OR), goat anti-guinea pig IgM (ICL, Newberg, OR), rabbit anti-guinea pig IgA (ICL, Newberg, OR) หรือ goat anti-guinea pig C3 (ICL, Newberg, OR) ที่ความเข้มข้น 1:50 นาน 90 นาที และล้างใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นแช่ใน Biotinylated rabbit anti-goat IgG antibody (Dakocytomation, Denmark) หรือ Biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Dakocytomation, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:200 นาน 40 นาที และล้างใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ต่อกจากนั้นนำไปแช่ใน Streptavidin/FITC (Dakocytomation, Denmark) ที่ความเข้มข้น 1:100 นาน 30 นาทีในห้องมืด และล้างใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทำการ mounting ด้วย Fluorescence mounting medium และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ และประเมินผลการตรวจการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ โดยการให้คะแนนการย้อมติดสีเรืองแสงสีเขียว จากคะแนน 0-3 และแปลผลเป็นการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆ ในปอด ไต และตับ ดังนี้ คะแนน 0 หมายถึงไม่พบการติดสี และแปลผลว่าไม่มีการสะสม คะแนน 1 หมายถึงติดสีเล็กน้อย และแปลผลว่ามีการสะสมเล็กน้อย คะแนน 2 หมายถึงติดสีปานกลาง และแปลผลว่ามีการสะสมปานกลาง คะแนน 3 หมายถึงติดสีมาก และแปลผลว่ามีการสะสมมาก (Chen *et al.*, 2003; Molne *et al.*, 2005)

ค.4 การตรวจทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผนังถุงลมในระดับมหจุลกายวิภาค (Ultrastructure) (Nally *et al.*, 2004)

นำชิ้นเนื้อปอดขนาด 1-2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มาตรึงสภาพครั้งแรกด้วย 2% glutaraldehyde ใน PBS (pH 7.0) และทำการล้างด้วย PBS ทำการตรึงอีกครั้งด้วย 1%

osmium tetroxide (OsO_4) และดึงน้ำออกด้วย grading ethanol : 50%, 70%, 85%, 95% และ 100% ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง ตามด้วย 100% ethanol และ propylene oxide 3 ครั้ง แล้วทำการ embedding ใน resin ซึ่งเป็น embedding media หลังจากนั้นทำการตัดที่ความหนา 1 ไมโครเมตร และย้อมด้วย 1% Toluidine blue นำมาหาตำแหน่งที่สนใจ และเมื่อได้ตำแหน่งที่ต้องการแล้ว ทำการตัดที่ความหนา 70 นาโนเมตร จากนั้นนำการย้อมด้วยสาร uranyl acetate และ lead citrate ที่อุณหภูมิห้อง ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (JEM 2100, Japan) ทำการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับมหจุลกายวิภาค



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 น้ำหนักตัว

พบว่าน้ำหนักตัวของหนูตะเภาในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราอย่างเดียวย (Lepto) และกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราและได้รับการป้อนยารักษาไม่ขึ้นทั้ง 3 กลุ่ม (Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈) มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 4 ในขณะที่น้ำหนักตัวของกลุ่มหนูปกติ (Normal) และกลุ่มหนูที่ได้รับการป้อนยาอย่างเดียวย (Rapa) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ภาคผนวก ข : ตารางที่ 20 และ 21)

4.2 ผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง

ในการทดลองทั้งสองครั้งพบว่า ในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ กลุ่มทดลองทุกกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราสามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราได้จากเลือด ตับ และไต ยกเว้นในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ ของการทดลองครั้งที่ 2 ไม่สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราจากตับได้

ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 1 พบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 2 และพบเชื้อเลปโตสไปราที่ไตในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง สำหรับกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ พบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง พบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 1 และพบเชื้อเลปโตสไปราที่ไตเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 2 ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดและที่ไตเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 2 แต่ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราที่ตับได้ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ส่วนกลุ่ม Lepto ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในเลือดได้ ในขณะที่พบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 2 และพบเชื้อเลปโตสไปราที่ไตได้ในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง

ในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบเชื้อเลปโตสไปราเฉพาะที่ไตเท่านั้น กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ พบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 1 แต่พบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับและไตในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง สำหรับกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบเชื้อเลปโตสไปราเฉพาะที่ไตเช่นเดียวกับกลุ่ม Lepto rapa hr₀ ในขณะที่กลุ่ม Lepto ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในเลือดได้ พบเชื้อเลปโตสไปราที่ตับเฉพาะในการทดลองครั้งที่ 2 และที่ไตในการทดลองทั้ง 2 ครั้ง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH

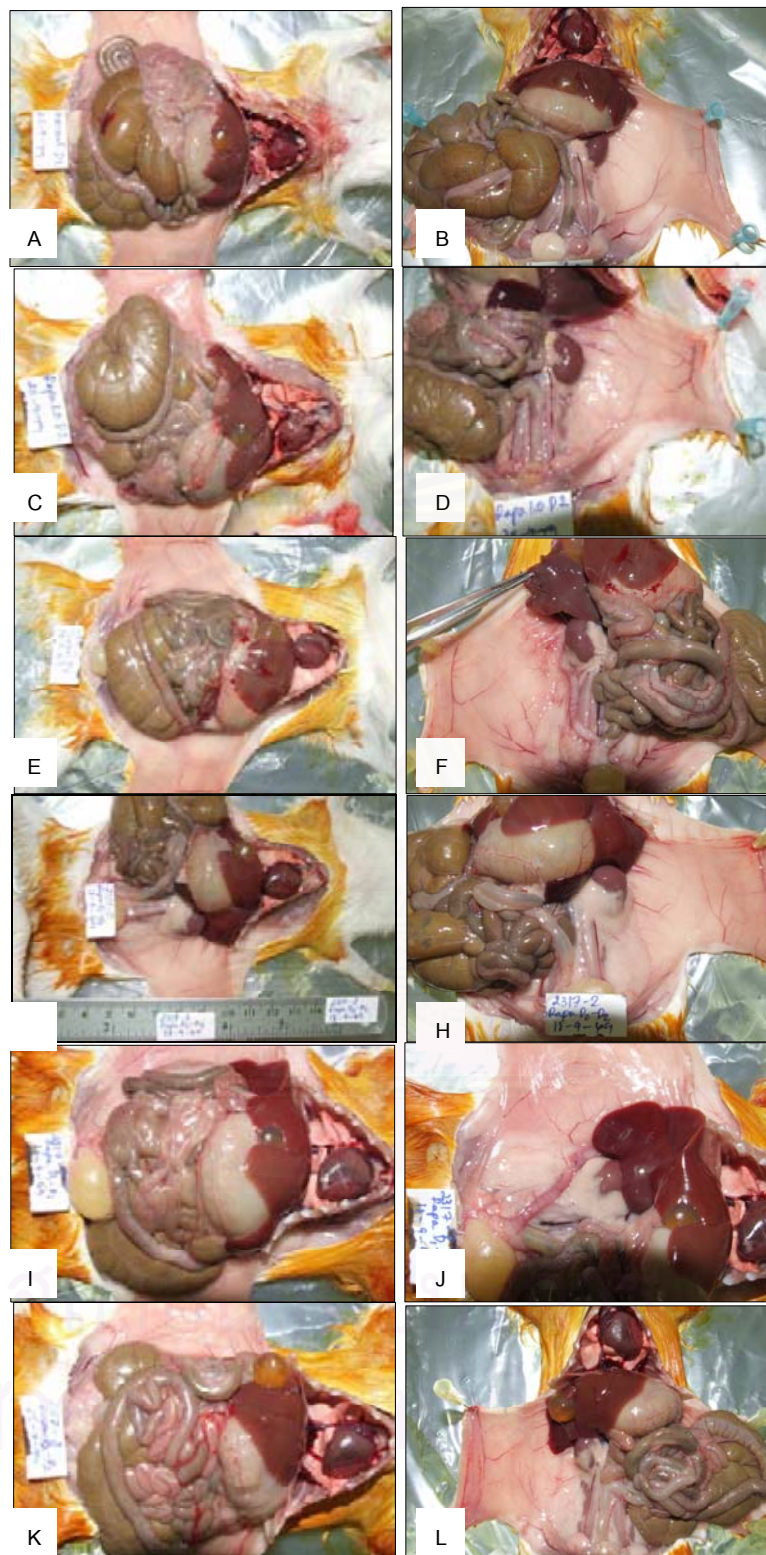
กลุ่มทดลอง	วันที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนหนุตะเภาที่ตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา (n=2)		
		เลือด	ตับ	ไต
Lepto rapa hr ₀	2	2	2	2
	4	1	1	2
	6	0	0	2
Lepto rapa hr ₂₄	2	2	1	2
	4	2	1	1
	6	1	2	2
Lepto rapa hr ₄₈	2	2	2	2
	4	1	0	1
	6	0	0	2
Lepto	2	2	2	2
	4	0	2	1
	6	0	1	2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

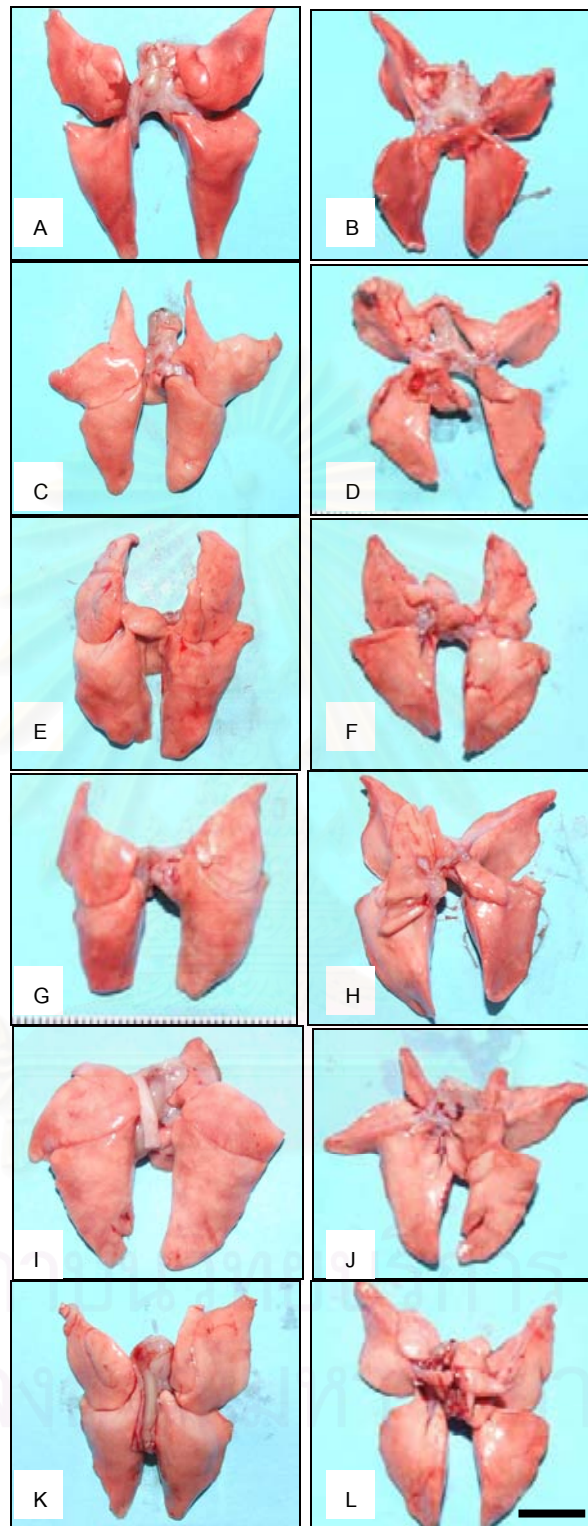
4.3 ผลทางมหาพยาธิวิทยา (Gross pathology)

ในวันที่ 2 กลุ่มการทดลองทุกกลุ่มไม่พบรอยโรคทางมหาพยาธิวิทยาที่ชัดเจน (รูปที่ 1-4) ในวันที่ 4 กลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบลักษณะของปื้นเลือด (ecchymotic hemorrhage) ที่ผนังช่องท้อง (รูปที่ 5H, 5J และ 5L) พบจุดเลือดออก (petechial hemorrhage) ที่ปอด 1-2 ตำแหน่ง (รูปที่ 6G-6L) และตับเริ่มมีสีเหลือง (mild icterus) (รูปที่ 8G-8K) ส่วนกลุ่ม Lepto พบจุดเลือดออกที่ผนังช่องท้อง (รูปที่ 5F) และจุดเลือดออกที่ปอด 2-3 ตำแหน่ง (รูปที่ 6E-6F) ในขณะที่กลุ่ม Normal และกลุ่ม Rapa ไม่พบรอยโรค (รูปที่ 5A-5D, 6A-6D, 7A-7D และ 8A-8C)

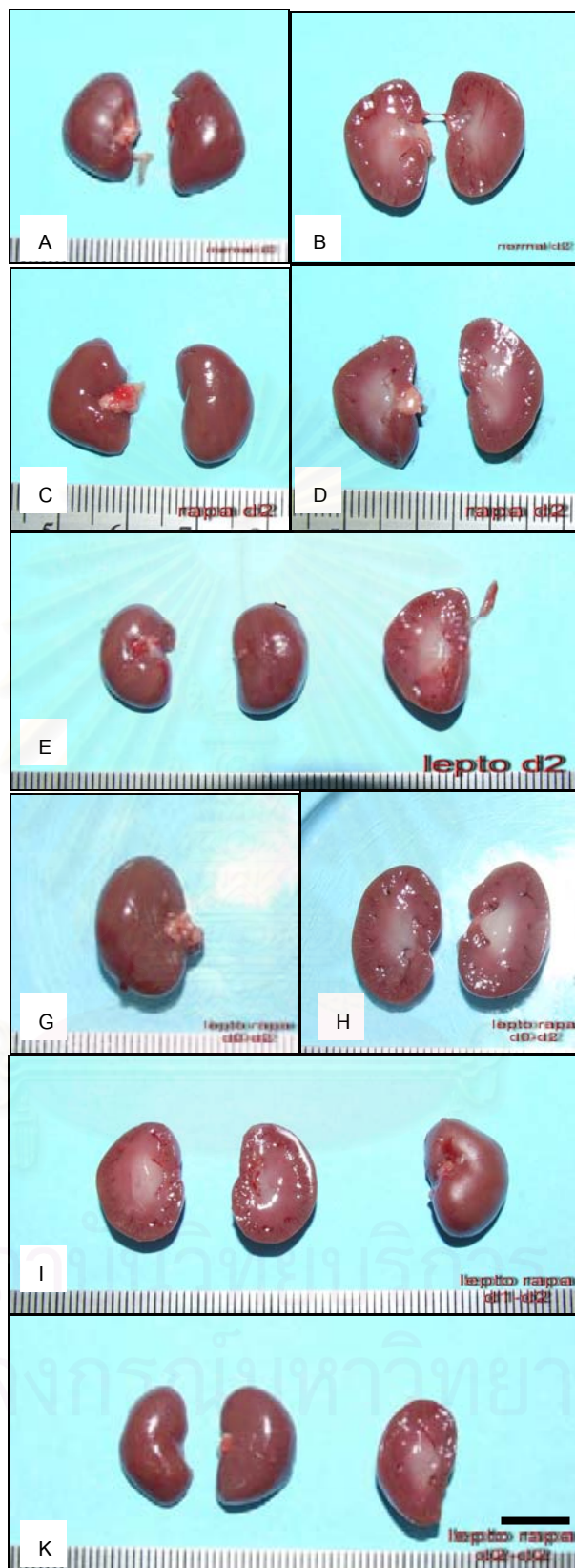
ในวันที่ 6 พบปื้นเลือดออกอย่างรุนแรงที่ผนังช่องท้อง ในกลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ในขณะที่กลุ่ม Lepto พบเลือดออกที่ผนังช่องท้องเช่นกันแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า 3 กลุ่มข้างต้น (รูปที่ 9) พบจุดเลือดออกที่ผิวหนังในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมด โดยที่กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เกิดจุดเลือดออกที่ผิวหนังอย่างรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ รองลงมาได้แก่ กลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ ตามลำดับ (รูปที่ 10) ในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมดพบจุดเลือดออกที่ลำไส้ (รูปที่ 9) และตับที่มีสีเหลือง (icterus) ชัดเจน (รูปที่ 12) สำหรับรอยโรคที่ไตพบจุดด่างขาว (white spot) ที่ผิวไตในกลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₄₈ และ Lepto ในขณะที่พบจุดเลือดออกที่ผิวไตในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ (รูปที่ 11) โดยไม่พบรอยโรคในกลุ่ม Normal และกลุ่ม Rapa (รูปที่ 9A-9D, 10A-10D, 11A-11D และ 12A-12C)



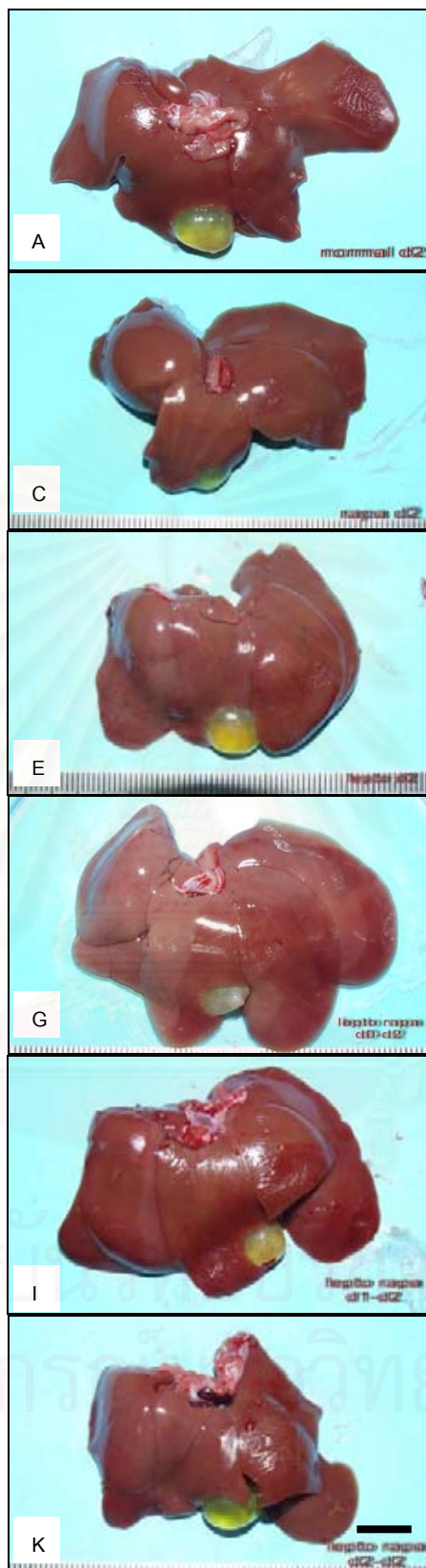
รูปที่ 1 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L), bar = 1 cm



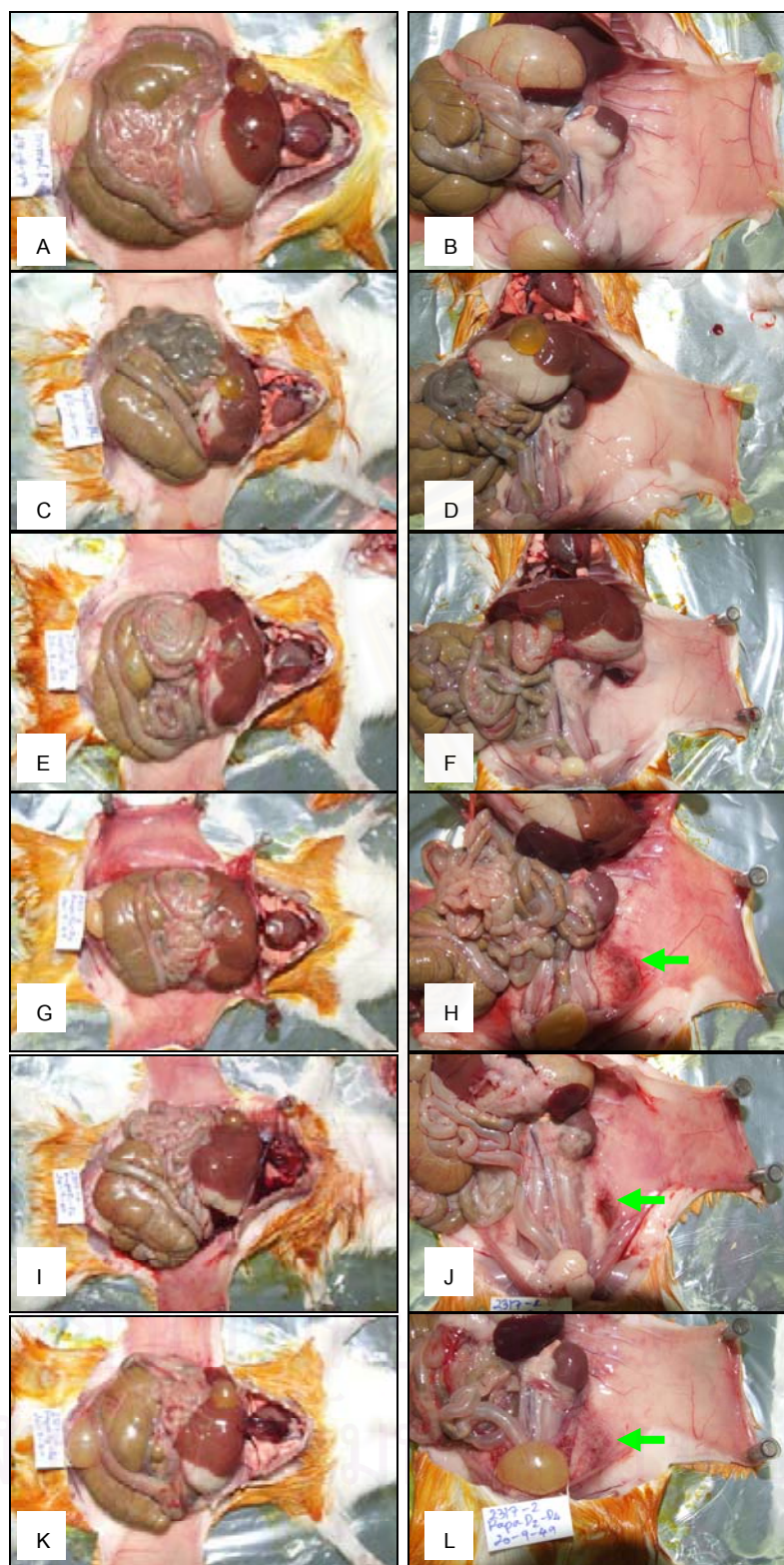
รูปที่ 2 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L), bar = 1 cm



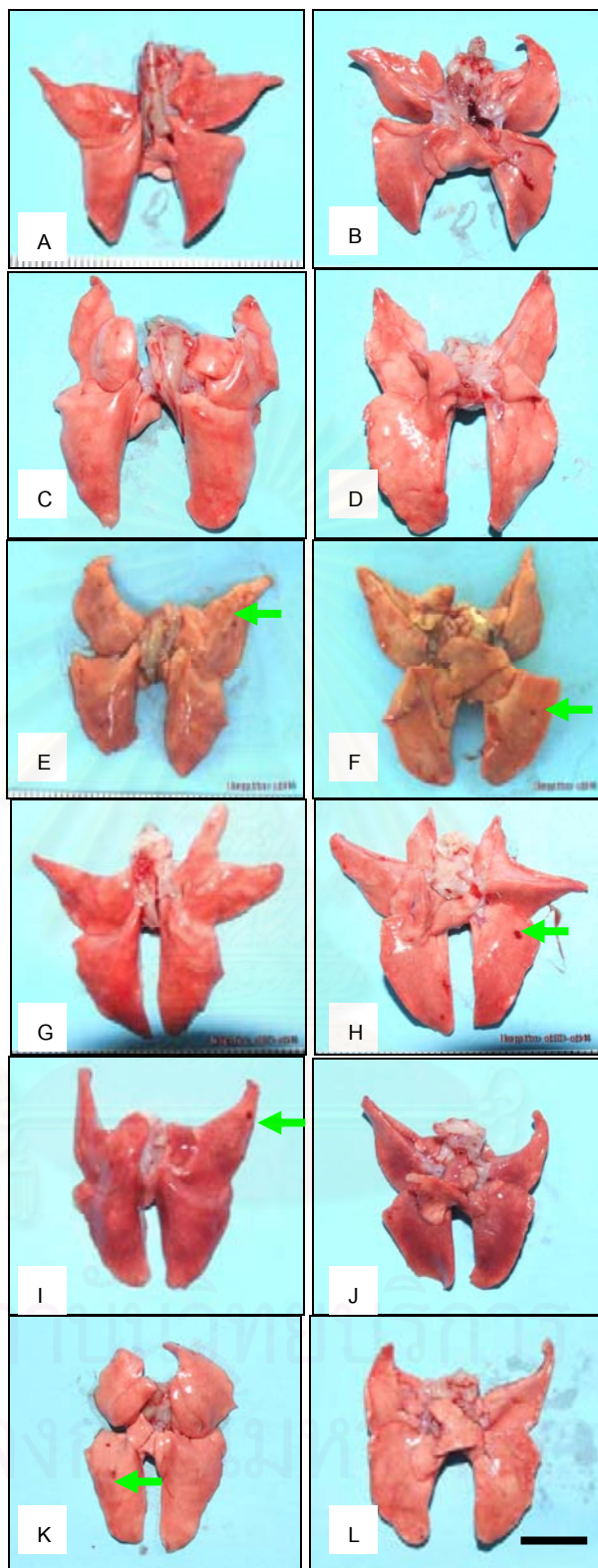
รูปที่ 3 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B),Rapa (C,D),Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



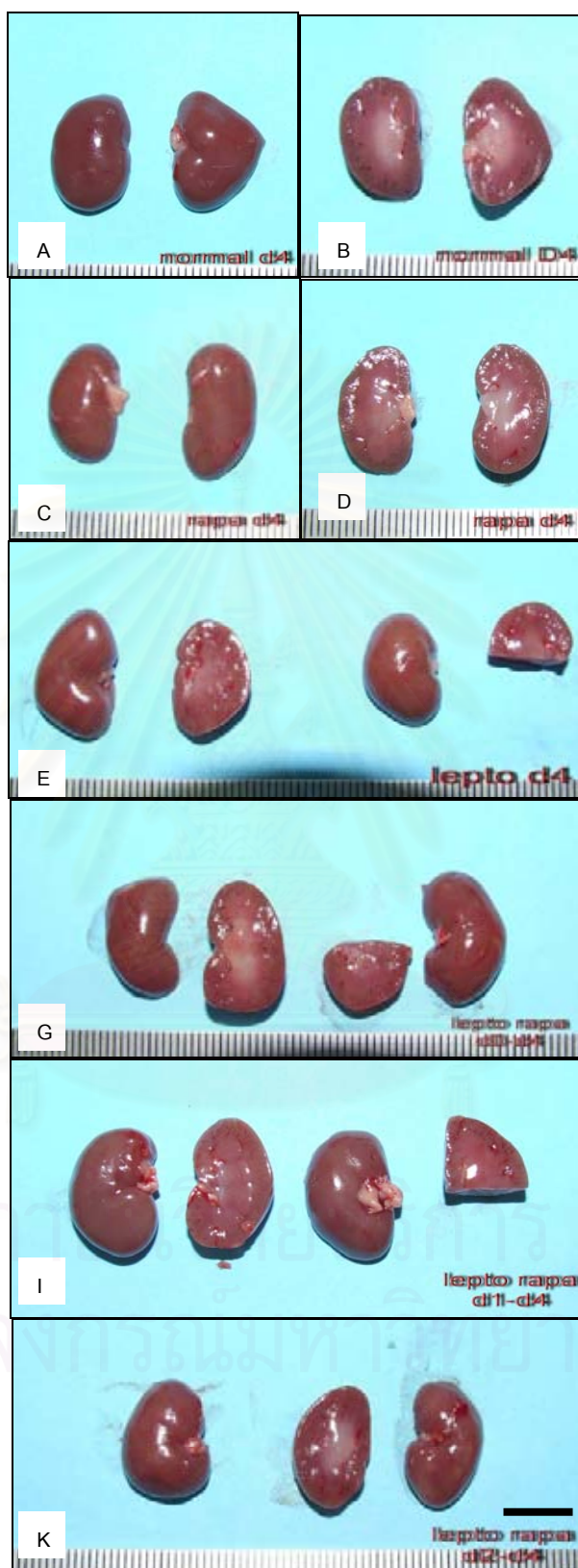
รูปที่ 4 แสดงรอยโรคที่ตับในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A), Rapa (C), Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



รูปที่ 5 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L) พบปื้นเลือดออก (ลูกศรชี้) ที่ผนังช่องท้องในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (H), Lepto rapa hr₂₄ (J) และ Lepto rapa hr₄₈ (L)



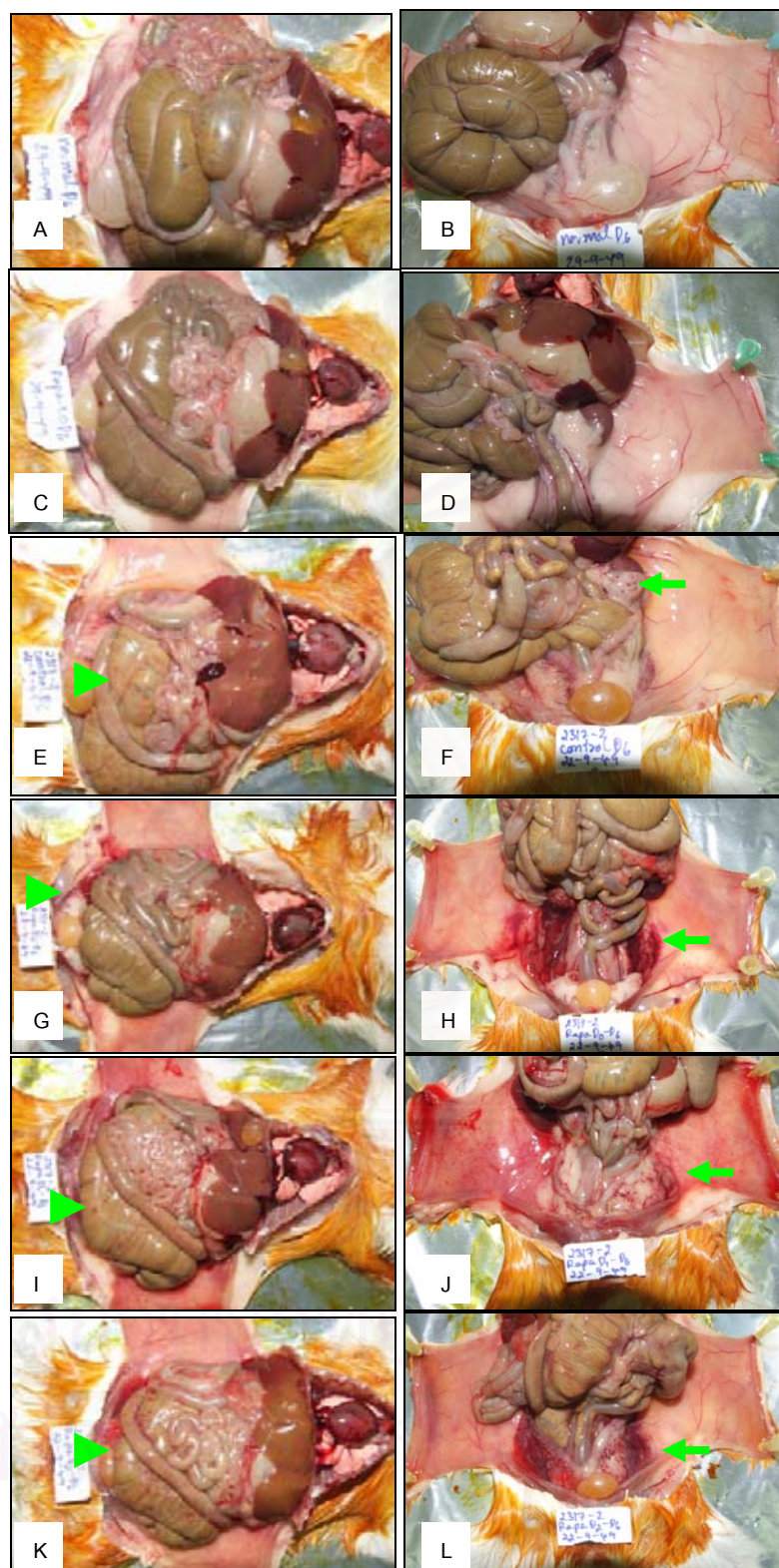
รูปที่ 6 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L) พบจุดเลือดออก (ลูกศรชี้) ที่ปอดในกลุ่ม Lepto (E,F) , Lepto rapa hr₀ (H), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



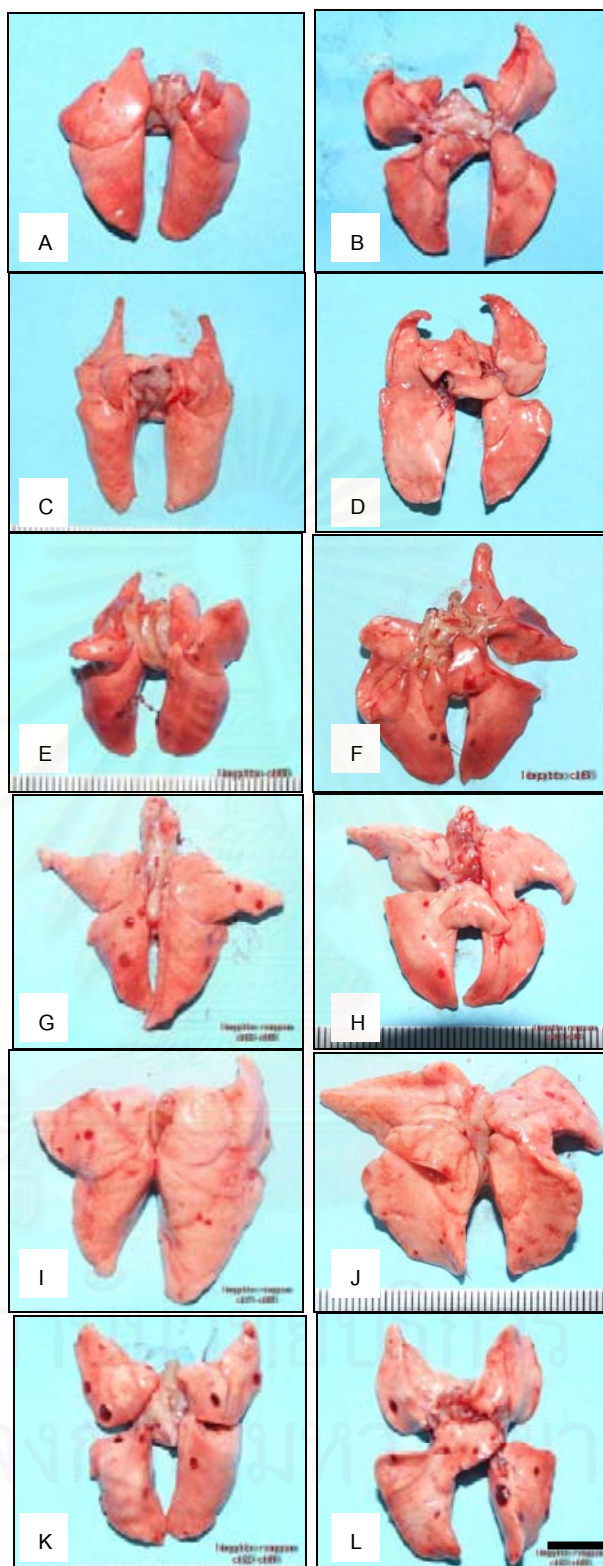
รูปที่ 7 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



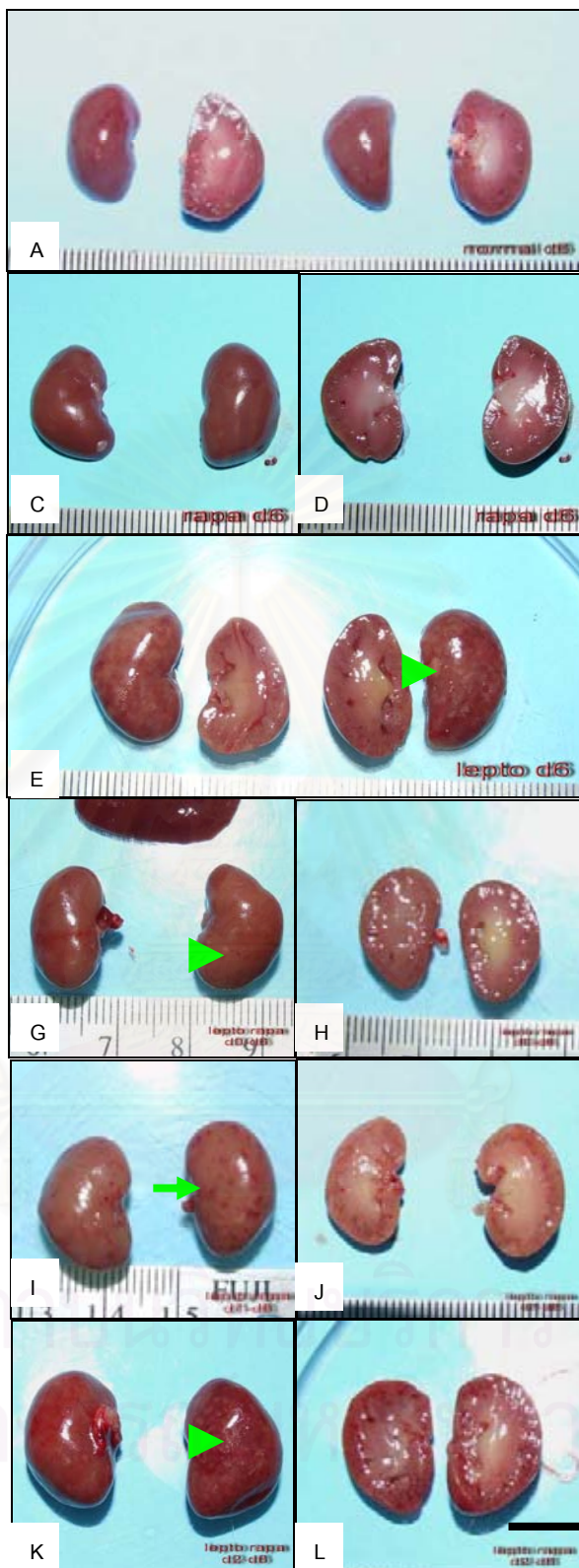
รูปที่ 8 แสดงรอยโรคที่ตับในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A), Rapa (C), Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



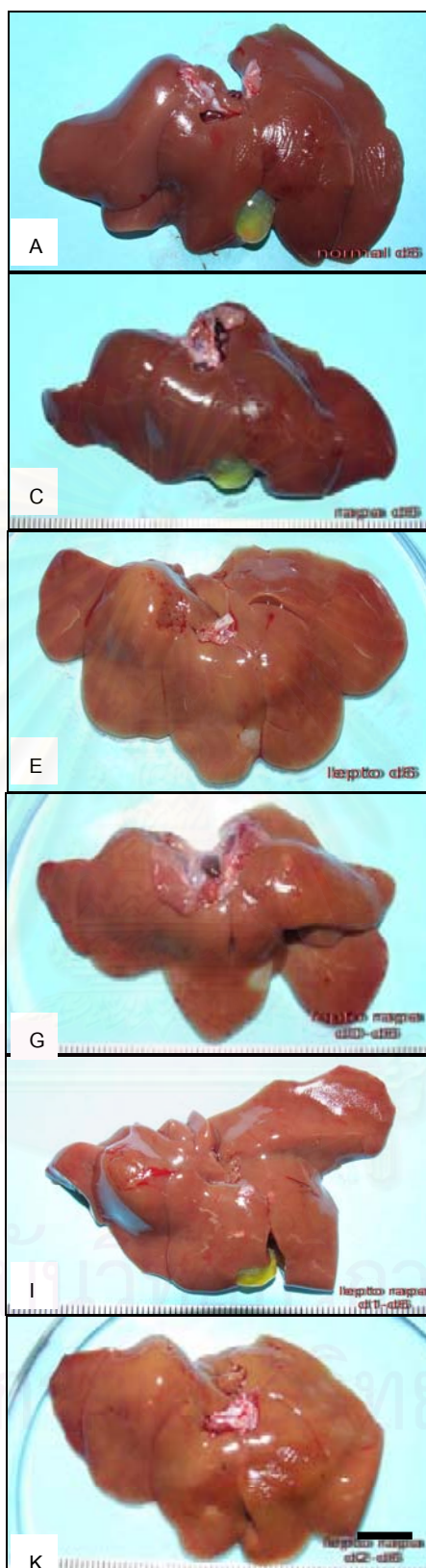
รูปที่ 9 แสดงรอยโรคอวัยวะภายในช่องท้องในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L) พบปื้นเลือดออกอย่างรุนแรง(ลูกศรชี้) ที่ผนังช่องท้อง และจุดเลือดออกที่ดำได้ (หัวลูกศรชี้) ในกลุ่ม Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L)



รูปที่ 10 แสดงรอยโรคที่ปอดในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L) พบจุดเลือดออกที่ปอดในกลุ่ม Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L), bar = 1 cm



รูปที่ 11 แสดงรอยโรคที่ไตในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A,B), Rapa (C,D), Lepto (E,F), Lepto rapa hr₀ (G,H), Lepto rapa hr₂₄ (I,J) และ Lepto rapa hr₄₈ (K,L) พบจุดเลือดออก (ลูกศรชี้) ที่ผิวไตในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ (I) ในขณะที่พบจุดขาว (หัวลูกศรชี้) ที่ผิวไตในกลุ่ม Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G) และ Lepto rapa hr₄₈ (K), bar = 1 cm



รูปที่ 12 แสดงรอยโรคที่ตับวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal (A), Rapa (C), Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K) พบตับมีสีเหลือง (icterus) ในกลุ่ม Lepto (E), Lepto rapa hr₀ (G), Lepto rapa hr₂₄ (I) และ Lepto rapa hr₄₈ (K) , bar = 1 cm

4.4 ผลทางพยาธิวิทยาคลินิก

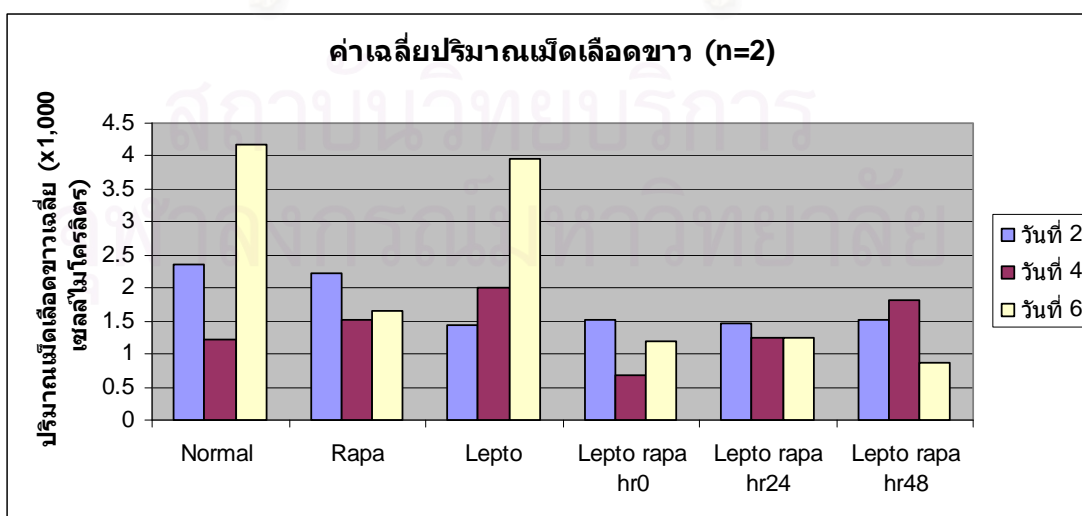
4.4.1 การตรวจทางโลหิตวิทยา

4.4.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดขาว

ปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ พบว่าเริ่มมีจำนวนลดลงในวันที่ 4 ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 6 สำหรับกลุ่ม Lepto พบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงวันที่ 6 ส่วนในกลุ่ม Normal ปริมาณเม็ดเลือดขาวมีจำนวนลดลงในวันที่ 4 และกลับสูงขึ้นในวันที่ 6 ในขณะที่กลุ่ม Rapa มีจำนวนลดลงตั้งแต่วันที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 4 และรูปที่ 13)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดขาว ($\times 10^3$ เซลล์/ไมโครลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	2.37	1.22	4.17
rapa	2.22	1.53	1.65
Lepto	1.43	2.00	3.97
Lepto rapa hr ₀	1.51	0.67	1.18
Lepto rapa hr ₂₄	1.46	1.26	1.24
Lepto rapa hr ₄₈	1.53	1.81	0.86



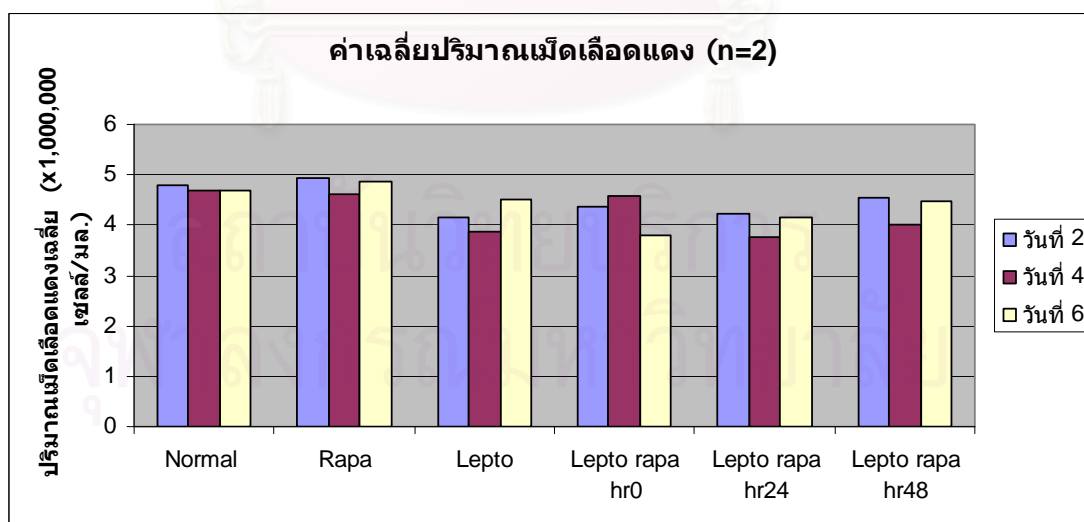
รูปที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.1.2 ปริมาณเม็ดเลือดแดง

ปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาในทุกกลุ่มอยู่ในระดับปกติเช่นเดียวกับกลุ่ม Normal ตลอดการทดลอง (ตารางที่ 5 และรูปที่ 14)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดแดง ($\times 10^6$ เซลล์/ไมโครลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	4.78	4.67	4.67
rapa	4.95	4.61	4.88
Lepto	4.17	3.88	4.51
Lepto rapa hr ₀	4.37	4.58	3.80
Lepto rapa hr ₂₄	4.22	3.78	4.15
Lepto rapa hr ₄₈	4.55	4.01	4.48



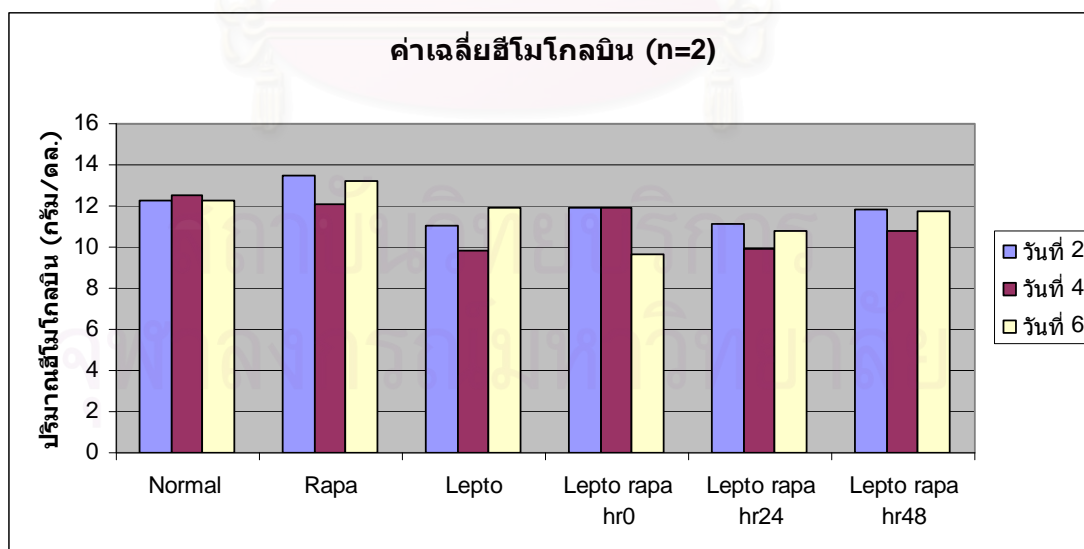
รูปที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.1.3 ค่าฮีโมโกลบิน

ค่าฮีโมโกลบินของหนูตะเภาในทุกกลุ่มอยู่ในระดับปกติเช่นเดียวกับกลุ่ม Normal ตลอดการทดลอง (ตารางที่ 6 และรูปที่ 15)

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบิน (กรัม/เดซิลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	12.30	12.50	12.25
rapa	13.50	12.05	13.25
Lepto	11.05	9.85	11.90
Lepto rapa hr ₀	11.95	11.90	9.65
Lepto rapa hr ₂₄	11.10	9.90	10.80
Lepto rapa hr ₄₈	11.85	10.80	11.75



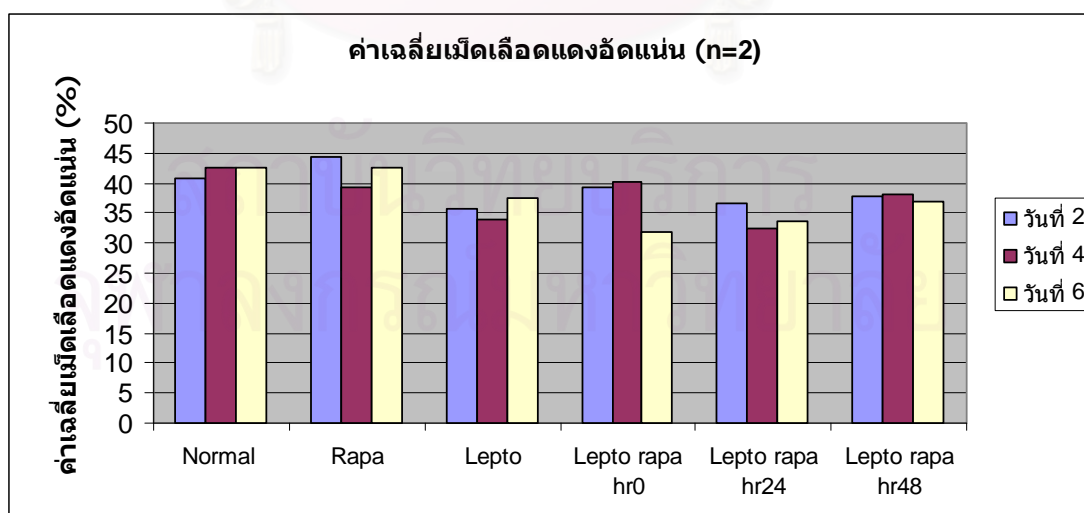
รูปที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยฮีโมโกลบินของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.1.4 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของกลุ่ม Lepto rapa hr₀ มีค่าลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 6 ส่วนกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ มีค่าลดลงตั้งแต่วันที่ 4 ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในระดับปกติเช่นเดียวกับกลุ่ม Normal ตลอดการทดลอง (ตารางที่ 7 และรูปที่ 16)

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	40.8	42.6	42.7
rapa	44.4	39.4	42.7
Lepto	35.7	34.0	37.5
Lepto rapa hr ₀	39.3	40.2	31.8
Lepto rapa hr ₂₄	36.7	32.3	33.7
Lepto rapa hr ₄₈	37.8	38.1	36.9



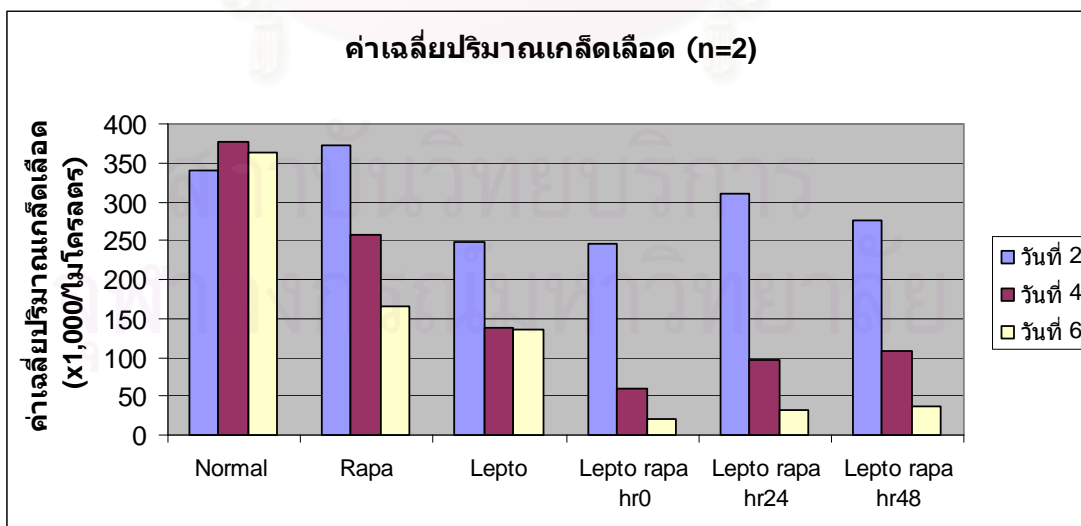
รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.1.5 ปริมาณเกล็ดเลือด

พบว่าในขณะที่ค่าเกล็ดเลือดตลอดการทดลองของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่กลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄, Lepto rapa hr₄₈, Lepto และ rapa มีค่าเกล็ดเลือดลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ มีค่าเกล็ดเลือดลดลงอย่างรุนแรงมากกว่ากลุ่ม Lepto และกลุ่ม rapa (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 17)

ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเกล็ดเลือดของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเกล็ดเลือด (x1,000/ไมโครลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	340.5	377.0	362.5
rapa	372.0	258.5	165.5
Lepto	248.5	139.0	134.5
Lepto rapa hr ₀	246.5	59.5	21.5
Lepto rapa hr ₂₄	310.5	97.5	33.0
Lepto rapa hr ₄₈	276.0	107.5	37.0



รูปที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณเกล็ดเลือดของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

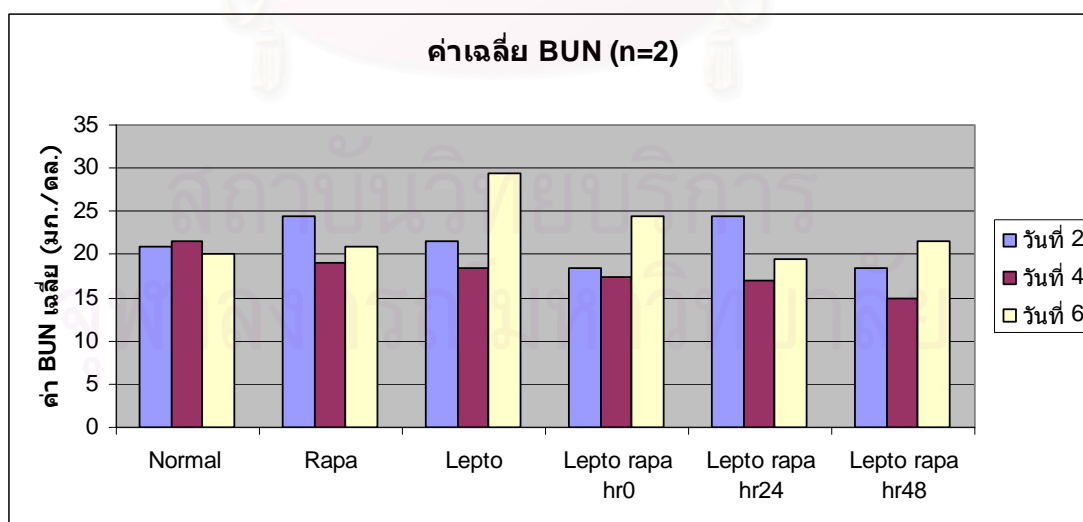
4.4.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าชีวเคมีคลินิก

4.4.2.1 ค่า Blood urea nitrogen (BUN)

ค่า Blood urea nitrogen (BUN) ของหนูตะเภาในทุกกลุ่มอยู่ในระดับปกติ เช่นเดียวกับกลุ่ม Normal ตลอดการทดลอง (ตารางที่ 9 และรูปที่ 18)

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ย BUN ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่า BUN (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	21.0	21.5	20.0
rapa	24.5	19.0	21.0
Lepto	21.5	18.5	29.5
Lepto rapa hr ₀	18.5	17.5	24.5
Lepto rapa hr ₂₄	24.5	17.0	19.5
Lepto rapa hr ₄₈	18.5	15.0	21.5



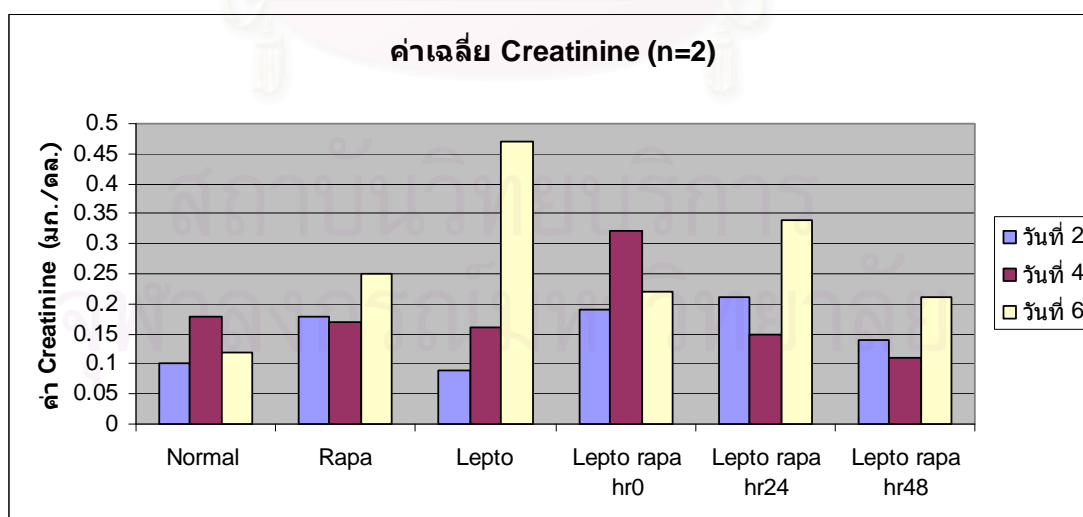
รูปที่ 18 แสดงค่าเฉลี่ย BUN ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.2.2 ค่า Creatinine

ค่า Creatinine ของหนูตะเภาในทุกกลุ่มอยู่ในระดับปกติเช่นเดียวกับกลุ่ม Normal ตลอดการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่ม Lepto ค่า Creatinine มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ ค่า Creatinine มีแนวโน้มต่ำลง (ตารางที่ 10 และรูปที่ 19)

ตารางที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ย Creatinine ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่า Creatinine (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	0.10	0.18	0.12
rapa	0.18	0.17	0.25
Lepto	0.09	0.16	0.47
Lepto rapa hr ₀	0.19	0.32	0.22
Lepto rapa hr ₂₄	0.21	0.15	0.34
Lepto rapa hr ₄₈	0.14	0.11	0.21



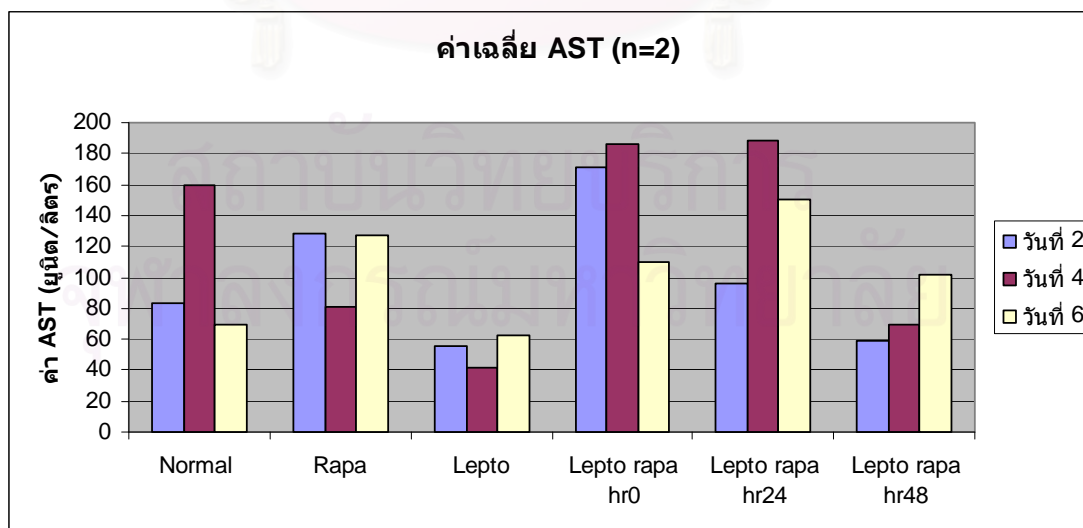
รูปที่ 19 แสดงค่าเฉลี่ย Creatinine ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.2.3 ค่า AST

พบว่าในวันที่ 2 กลุ่ม Lepto rapa hr₀ มีค่า AST สูงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ รองลงมาคือ กลุ่ม rapa และ Lepto rapa hr₂₄ ตามลำดับ ในวันที่ 4 เป็นวันที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ มีค่า AST สูงสุดในระดับใกล้เคียงกัน และสูงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ และในวันที่ 6 กลุ่มที่ได้รับยาทั้งหมด ได้แก่ กลุ่ม rapa, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ มีค่า AST สูงกว่ากลุ่ม Normal (ตารางที่ 11 และรูปที่ 20)

ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ย AST ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่า AST (ยูนิต/ลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	83.5	159.0	69.0
rapa	128.0	81.5	127.0
Lepto	55.5	42.0	62.0
Lepto rapa hr ₀	171.5	186.5	110.0
Lepto rapa hr ₂₄	96.0	188.5	150.0
Lepto rapa hr ₄₈	59.0	69.5	101.5



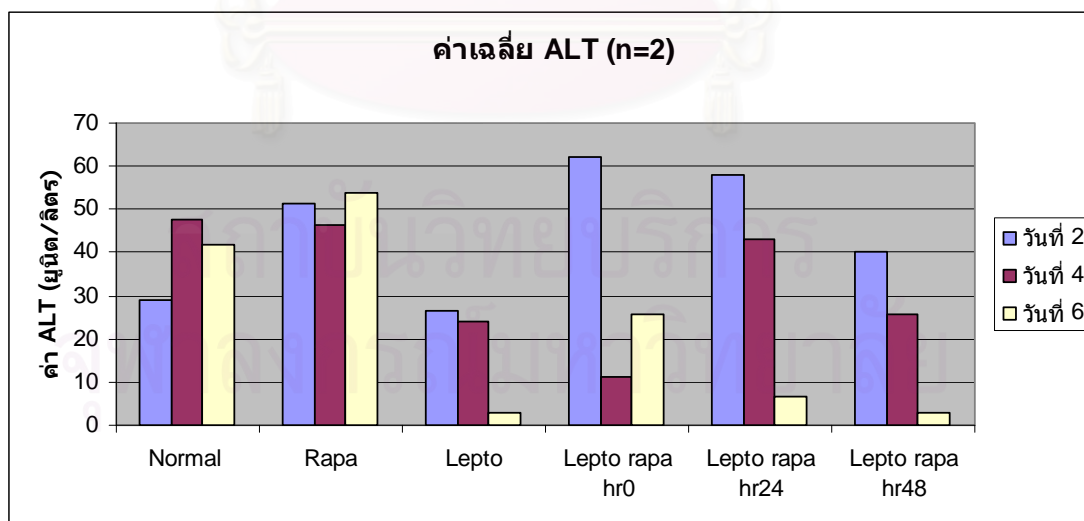
รูปที่ 20 แสดงค่าเฉลี่ย AST ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.4.2.4 ค่า ALT

พบว่าในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄, Lepto rapa hr₄₈ และ Lepto ค่า ALT มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ ค่า ALT แม้ว่าจะพบว่าเริ่มลดลงอย่างผิดปกติในวันที่ 4 แต่มีค่าสูงขึ้นและอยู่ในระดับปกติในวันที่ 6 ส่วนกลุ่ม Normal และ rapa ค่า ALT มีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง (ตารางที่ 12 และรูปที่ 21)

ตารางที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ย ALT ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่า ALT (ยูนิต/ลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	29.0	47.5	42.0
rapa	51.5	46.5	54.0
Lepto	26.5	24.0	3.0
Lepto rapa hr ₀	62.0	11.0	25.5
Lepto rapa hr ₂₄	58.0	43.0	6.5
Lepto rapa hr ₄₈	40.0	25.5	3.0



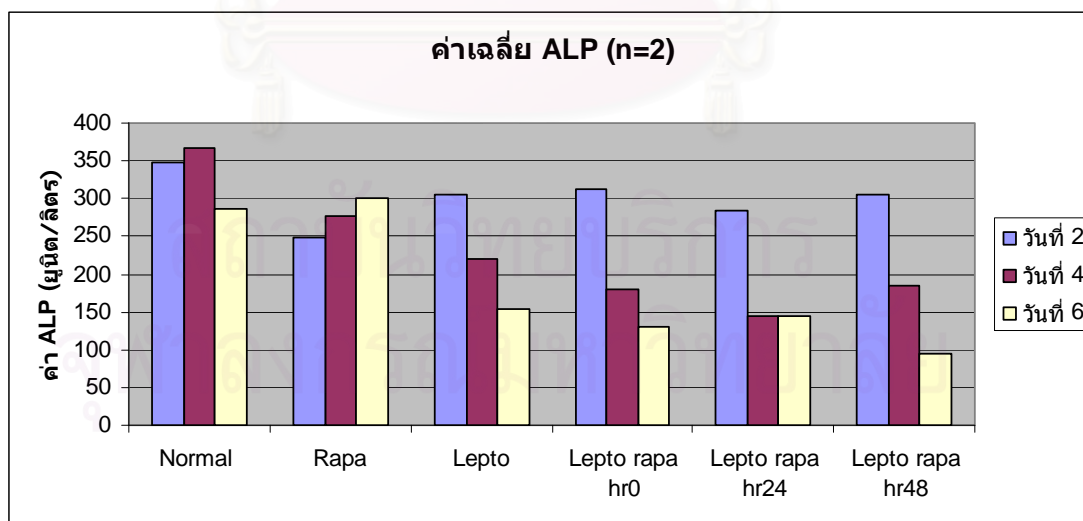
รูปที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ย ALT ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.3.2.5 ค่า ALP

พบว่าในกลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄, Lepto rapa hr₄₈ และ Lepto ค่า ALP มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ค่า ALP ของกลุ่ม rapa มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนกลุ่ม Normal มีค่า ALP สูงขึ้นในวันที่ 4 และลดลงในวันที่ 6 (ตารางที่ 13 และรูปที่ 22)

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ย ALP ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง (n=2)

กลุ่มทดลอง	ค่า ALP (ยูนิต/ลิตร)		
	วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
Normal	348.5	367.5	285.5
rapa	247.5	277.0	300.5
Lepto	305.0	219.5	153.0
Lepto rapa hr ₀	311.5	179.0	130.5
Lepto rapa hr ₂₄	285.0	144.5	144.5
Lepto rapa hr ₄₈	305.0	185.5	94.0



รูปที่ 22 แสดงค่าเฉลี่ย ALP ของหนูตะเภาแต่ละกลุ่มการทดลอง

4.5 ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

4.5.1 ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอด ตับ และไต

4.5.1.1 ปอด

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอดของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบรอยโรคตลอดการทดลอง (รูปที่ 23 และ 26)

หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ เริ่มพบความผิดปกติของปอดตั้งแต่วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ โดยพบเส้นเลือดฝอยของถุงลม (interalveolar capillaries) มีการคั่งเลือด (congestion) ร่วมกับผนังถุงลมมีการหนาตัว เนื่องจากมีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ ได้แก่ มาโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และนิวโทรฟิล (รูปที่ 31)

ในวันที่ 4 ของการทดลอง หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลม และพบเลือดออกทั้งที่ผนังถุงลม (interstitial hemorrhage) และในถุงลม (alveolar hemorrhage) ร่วมกับผนังถุงลมมีการหนาตัวที่มีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ ข้างต้น ในขณะที่กลุ่ม Lepto และ Lepto rapa hr₀ พบเพียงการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลมที่ผนังถุงลม ร่วมกับผนังถุงลมมีการหนาตัวที่มีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ โดยที่ยังไม่พบภาวะเลือดออกที่ปอด (รูปที่ 30)

ในวันที่ 6 ของการทดลอง พบว่าหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรงมากที่สุดถึงระดับ 5 กล่าวคือ มีเลือดออกทั้งที่ผนังถุงลม (interstitial hemorrhage) และในถุงลม (alveolar hemorrhage) เป็นบริเวณกว้างหลายๆบริเวณ โดยพบการคั่งเลือดในหลอดเลือดฝอยที่ผนังถุงลมอย่างมาก สามารถสังเกตเห็นการโป่งออกตรงตำแหน่งรอยต่อของเซลล์ผนังหลอดเลือดฝอย (vascular endothelial cells) อย่างชัดเจน (รูปที่ 31F) สำหรับกลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ เกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรงระดับ 4 (รูปที่ 31)

4.5.1.2 ตับ

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบรอยโรคตลอดการทดลอง (รูปที่ 24 และ 27)

พบรอยโรคของตับในกลุ่ม Lepto และ Lepto rapa hr₀ ในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อโดยในกลุ่ม Lepto พบการสูญเสียโครงสร้าง (disorganization) ของ hepatic cell cord (รูปที่ 32G และ 32H) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ เริ่มพบการตายของเซลล์ตับ (hepatocellular necrosis) ลักษณะเป็น pyknotic nuclei โดยพบเป็นหย่อมๆ หลายหย่อม (multifocal) (รูปที่ 32A และ 32B)

ในวันที่ 4 ของการทดลอง หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto พบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ (portal vein) (รูป 33G และ 33H) กลุ่ม Lepto

rapa hr₀ พบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดแดง (รูปที่ 33A และ 33B) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการตายของเซลล์ตับ มีลักษณะ pyknotic nuclei โดยพบเป็นหย่อมๆ หลายหย่อม (รูปที่ 33C, 33D, 33E และ 33F)

ในวันที่ 6 ของการทดลอง หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto พบการคั่งเลือดใน hepatic sinusoids (รูปที่ 34G และ 34H) กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบการบวมของเซลล์ตับ ร่วมกับพบเซลล์ตับที่กำลังแบ่งตัวสูงขึ้น (34A และ 34B) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ พบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ ร่วมกับการเกิดการตายของหลอดเลือด และเนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดนั้น (รูปที่ 34C และ 34D) และกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดแดง ร่วมกับการเกิดเนื้อตายของหลอดเลือด และเนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดนั้น (รูปที่ 34E และ 34F)

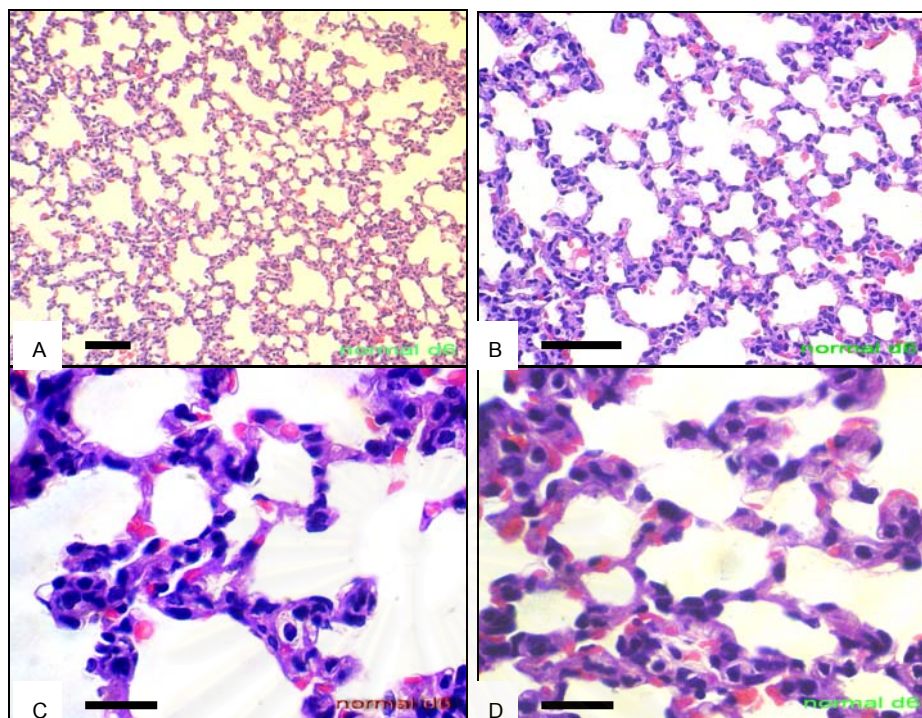
4.5.1.3 ไต

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของไตของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบรอยโรคตลอดการทดลอง (รูปที่ 25 และ 28)

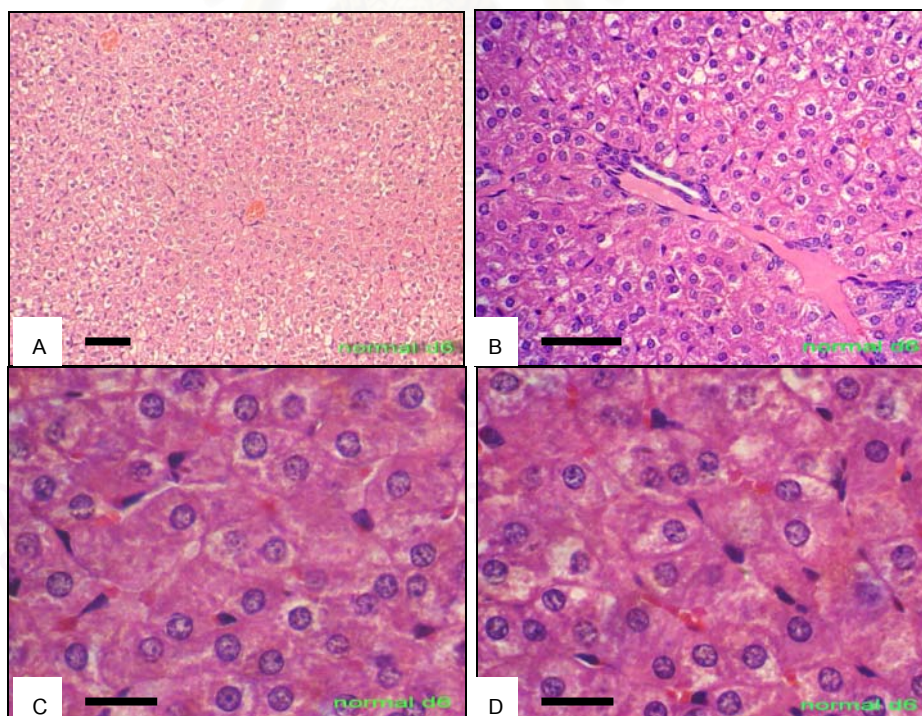
ในกลุ่มทดลองที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมดพบรอยโรคตั้งแต่วันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ โดยในกลุ่ม Lepto เริ่มพบภาวะเลือดออกรอบๆ ท่อไตที่มีความรุนแรงปานกลาง (รูปที่ 35G และ 35H) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบภาวะเลือดออกรอบๆ ท่อไตส่วนต้นที่ไม่รุนแรง (รูปที่ 35A และ 35B) สำหรับ Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการคั่งเลือดของหลอดเลือดฝอยที่อยู่ระหว่างท่อไตส่วนต้น (รูปที่ 35C, 35D, 35E และ 35F)

ในวันที่ 4 ของการทดลอง พบเลือดออกที่รุนแรงมากขึ้นในกลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ โดยพบเลือดออกทั้งรอบๆ หน่วยกรองไต (glomerulus) และท่อไต ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อบุท่อไต (รูปที่ 36G, 36H, 36C, 36D, 36E และ 36F) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบการบวมของเซลล์เยื่อบุท่อไต โดยไม่พบเลือดออกที่หน่วยกรองไต และท่อไต (36A และ 36B)

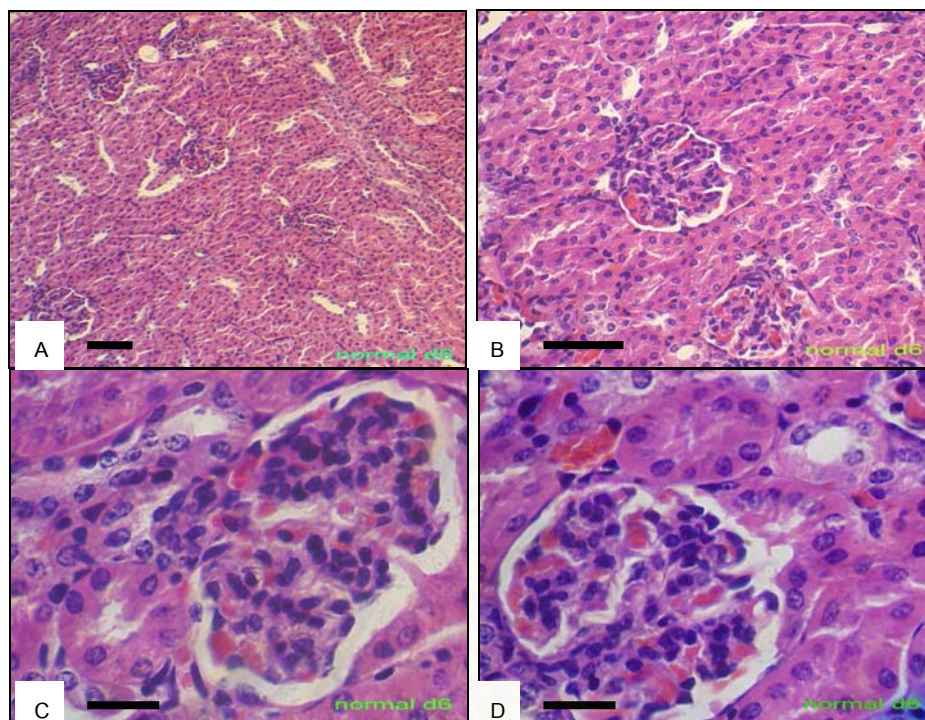
ในวันที่ 6 ของการทดลอง หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ยังคงพบเลือดออกทั้งรอบๆ หน่วยกรองไต และท่อไต ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อบุท่อไต (รูปที่ 37C, 37D, 37E และ 37F) ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบภาวะเลือดออกที่ไตเล็กน้อย และพบการบวมของเซลล์เยื่อบุท่อไต (37A และ 37B) ส่วนกลุ่ม Lepto พบเลือดออกทั้งรอบๆ หน่วยกรองไต และท่อไต ร่วมกับการตายของเซลล์เยื่อบุท่อไต และการแทรกตัวของนิวโทรฟิลจำนวนมากรอบๆ หน่วยกรองไต และท่อไต (37G และ 37H)



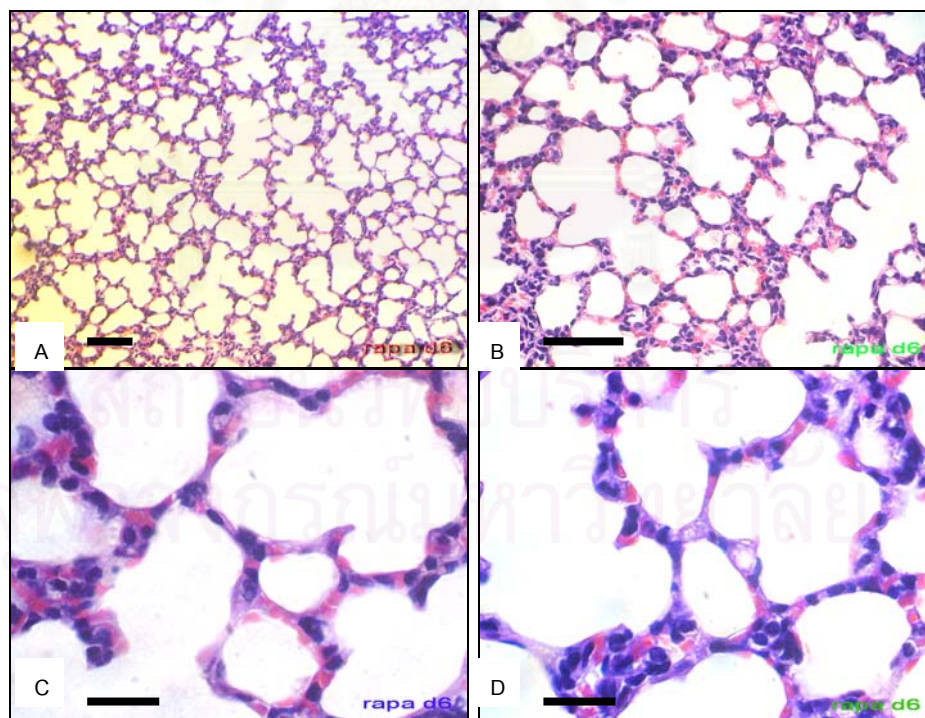
รูปที่ 23 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal: A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



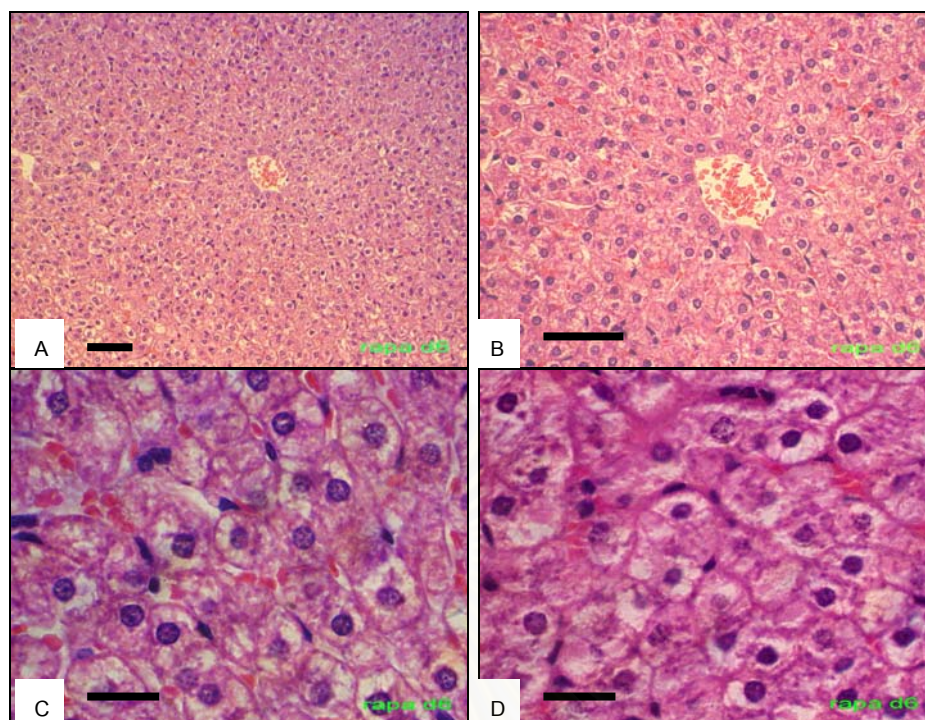
รูปที่ 24 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal : A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



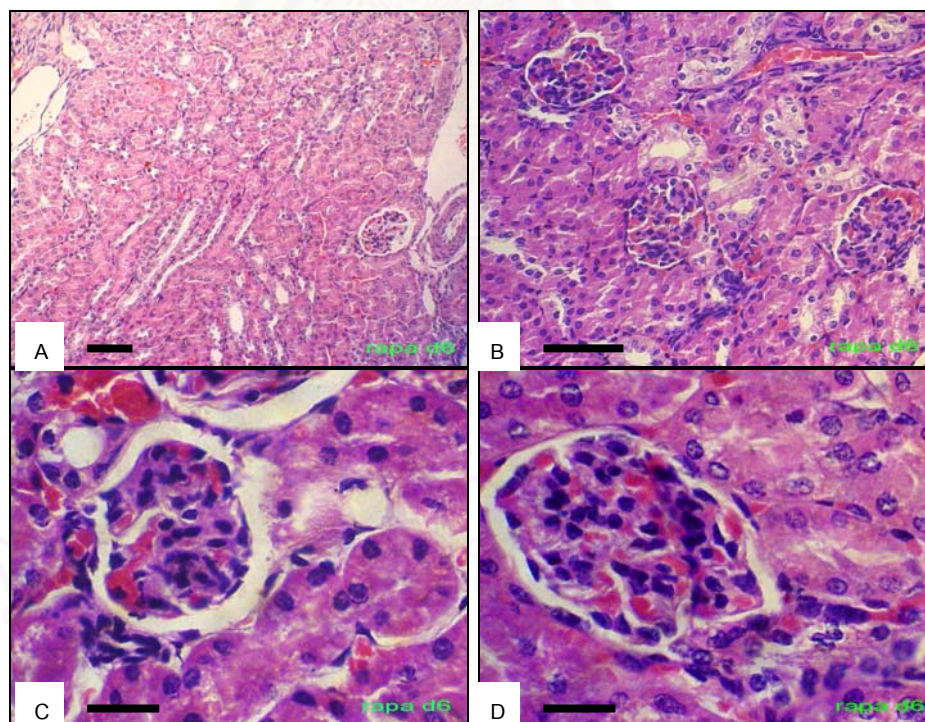
รูปที่ 25 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Normal : A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



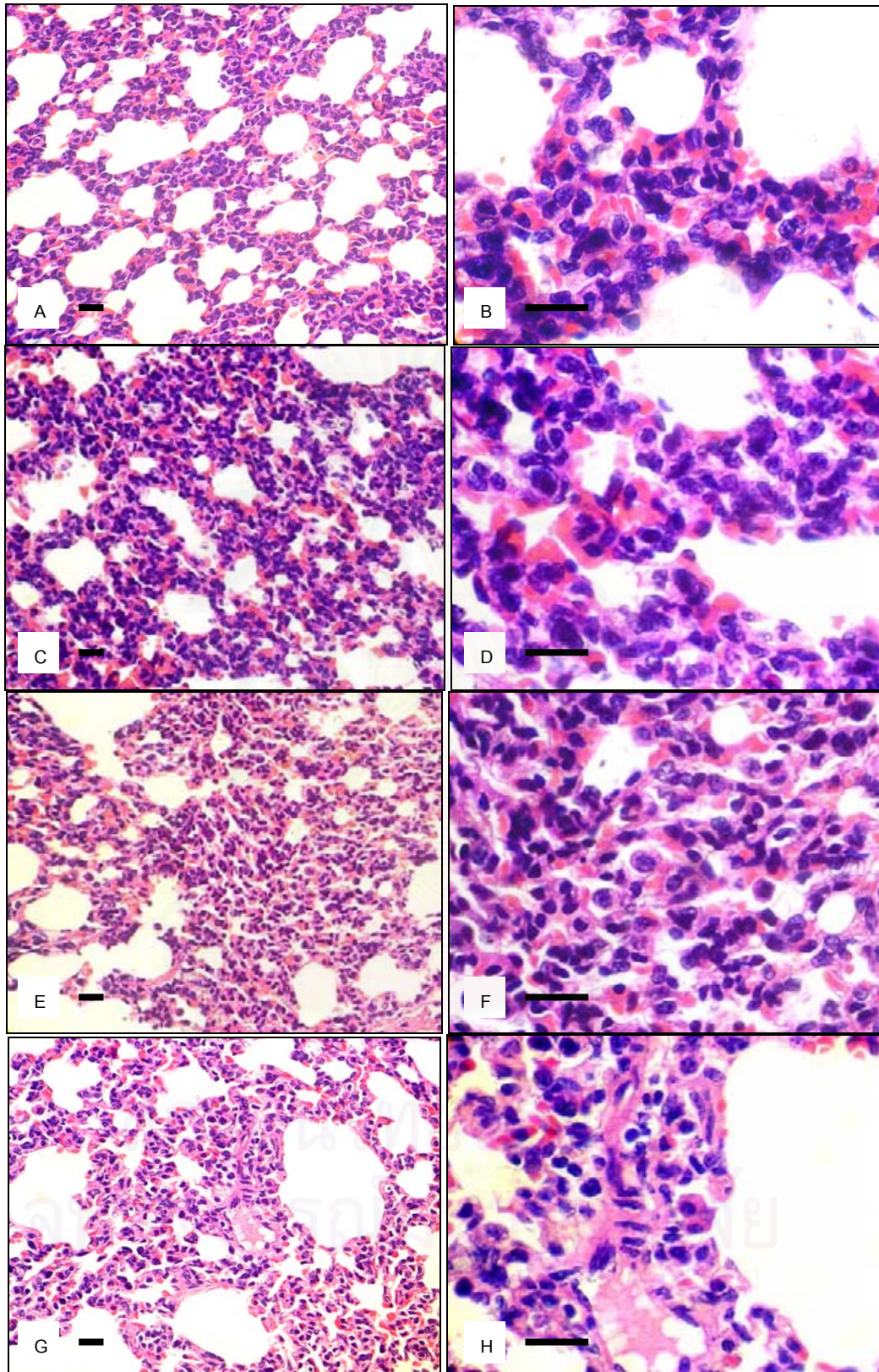
รูปที่ 26 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa : A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



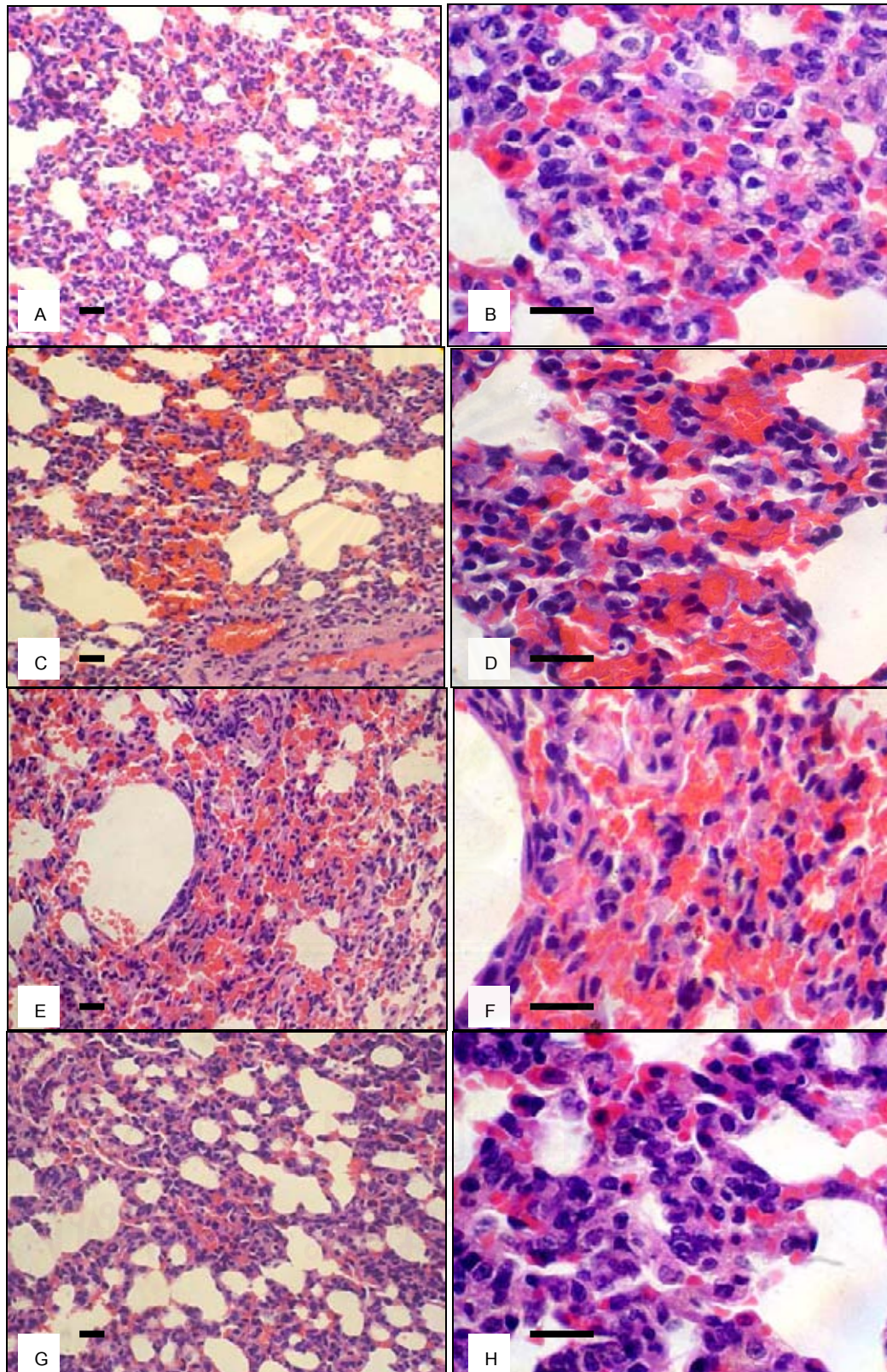
รูปที่ 27 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa : A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



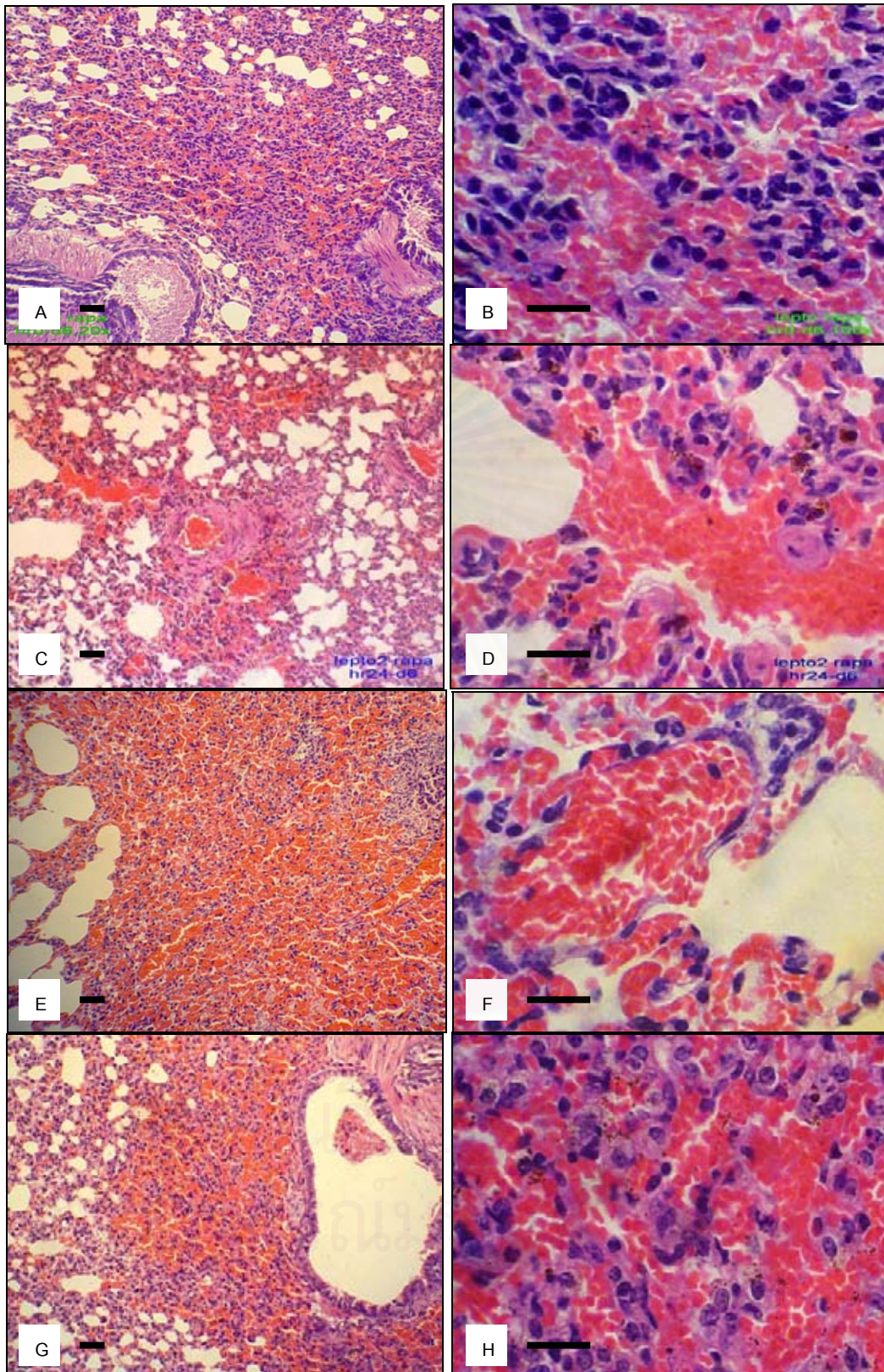
รูปที่ 28 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Rapa : A-B; bar = 50 μ m, C-D; bar = 20 μ m



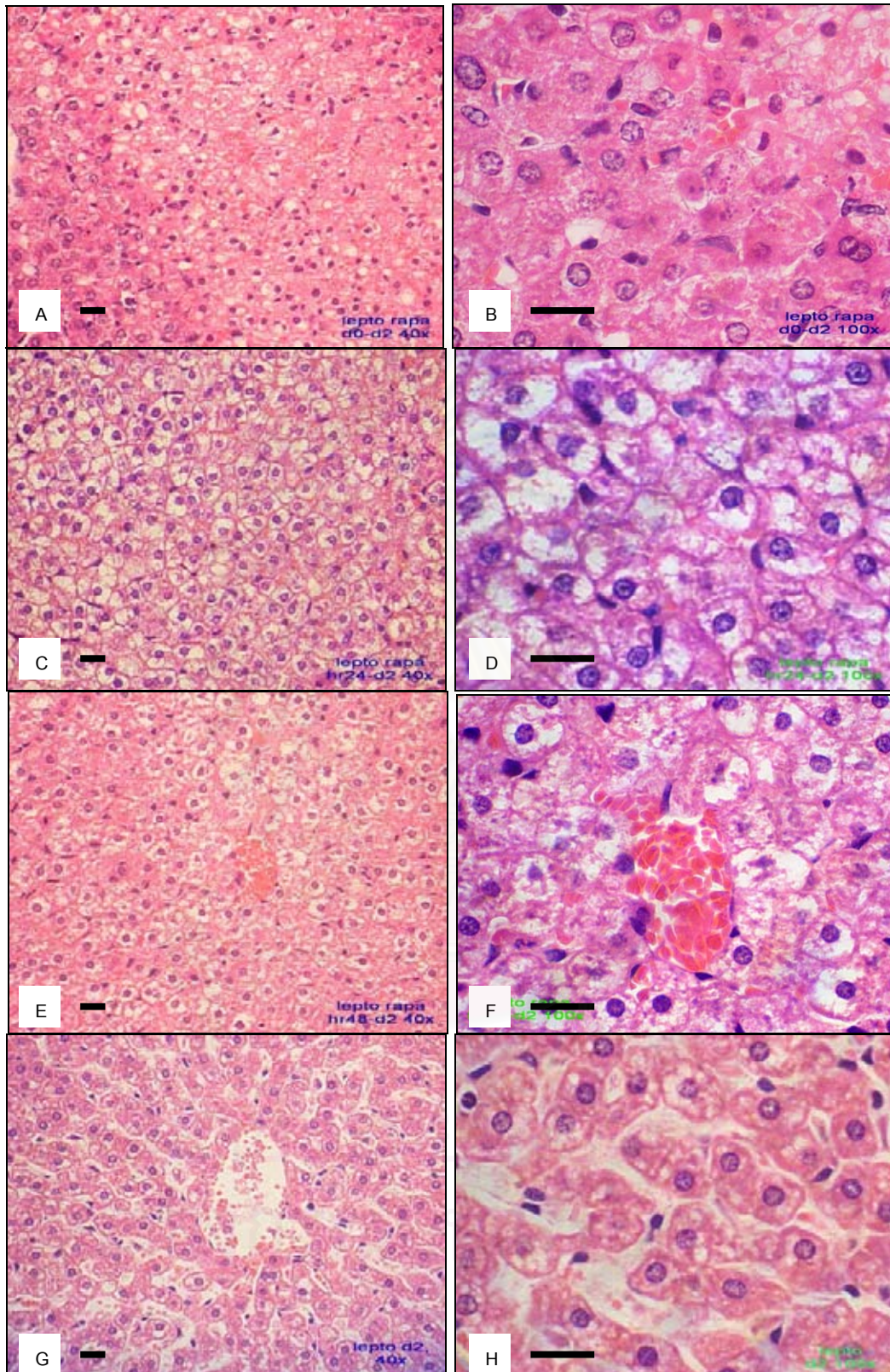
รูปที่ 29 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม *Lepto rapa* hr₀ (A,B), *Lepto rapa* hr₂₄ (C,D), *Lepto rapa* hr₄₈ (E,F) และ *Lepto* (G,H) พบผนังถุงลมมีการหนาตัวที่มีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบ ; bar = 20 μ m



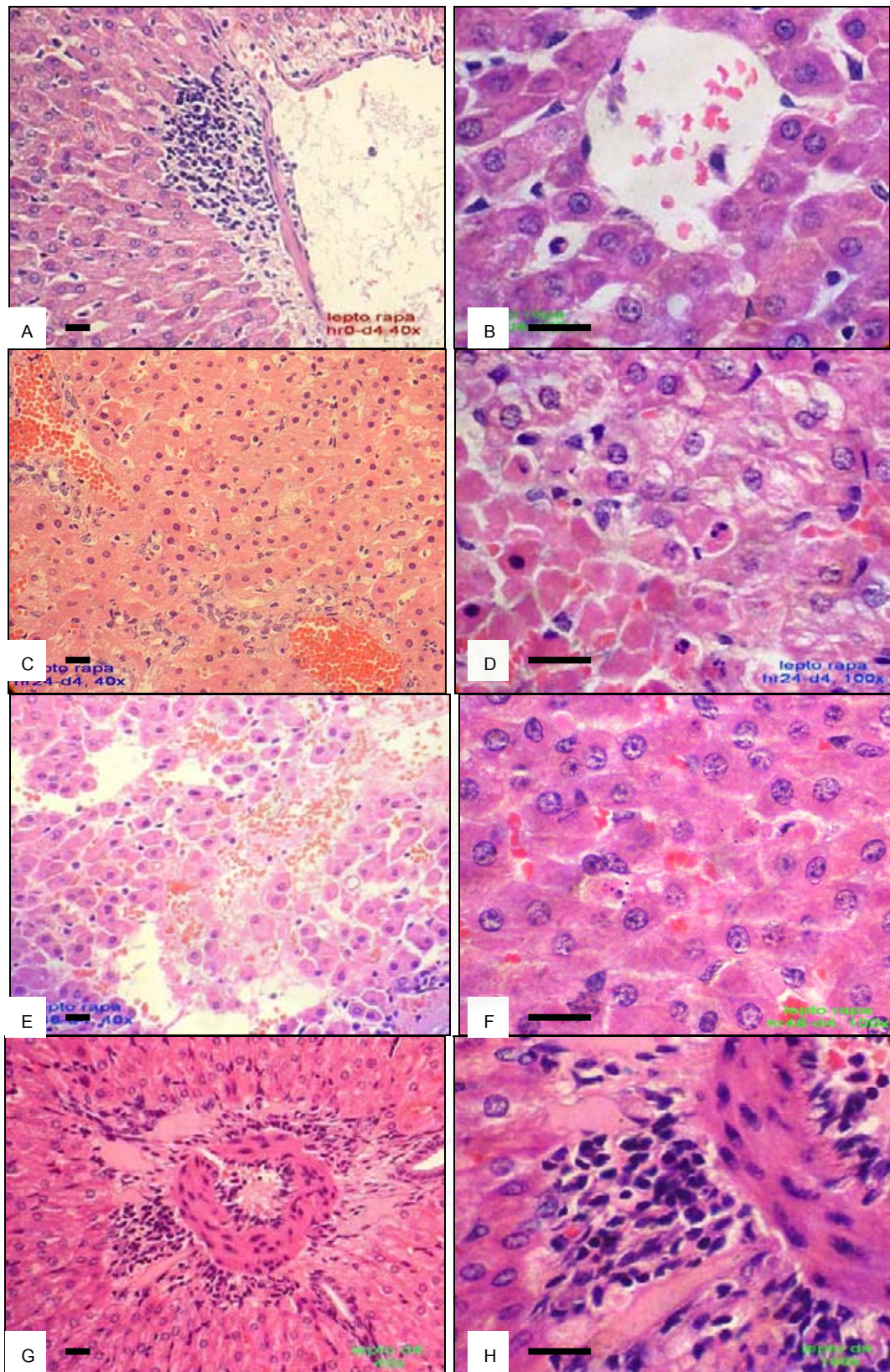
รูปที่ 30 แสดงจุดพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) พบการคั่งเลือด ร่วมกับผนังถุงลมมีการหนาตัว ที่มีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ และกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบเลือดออกในถุงลมร่วมด้วย ; bar = 20 μ m



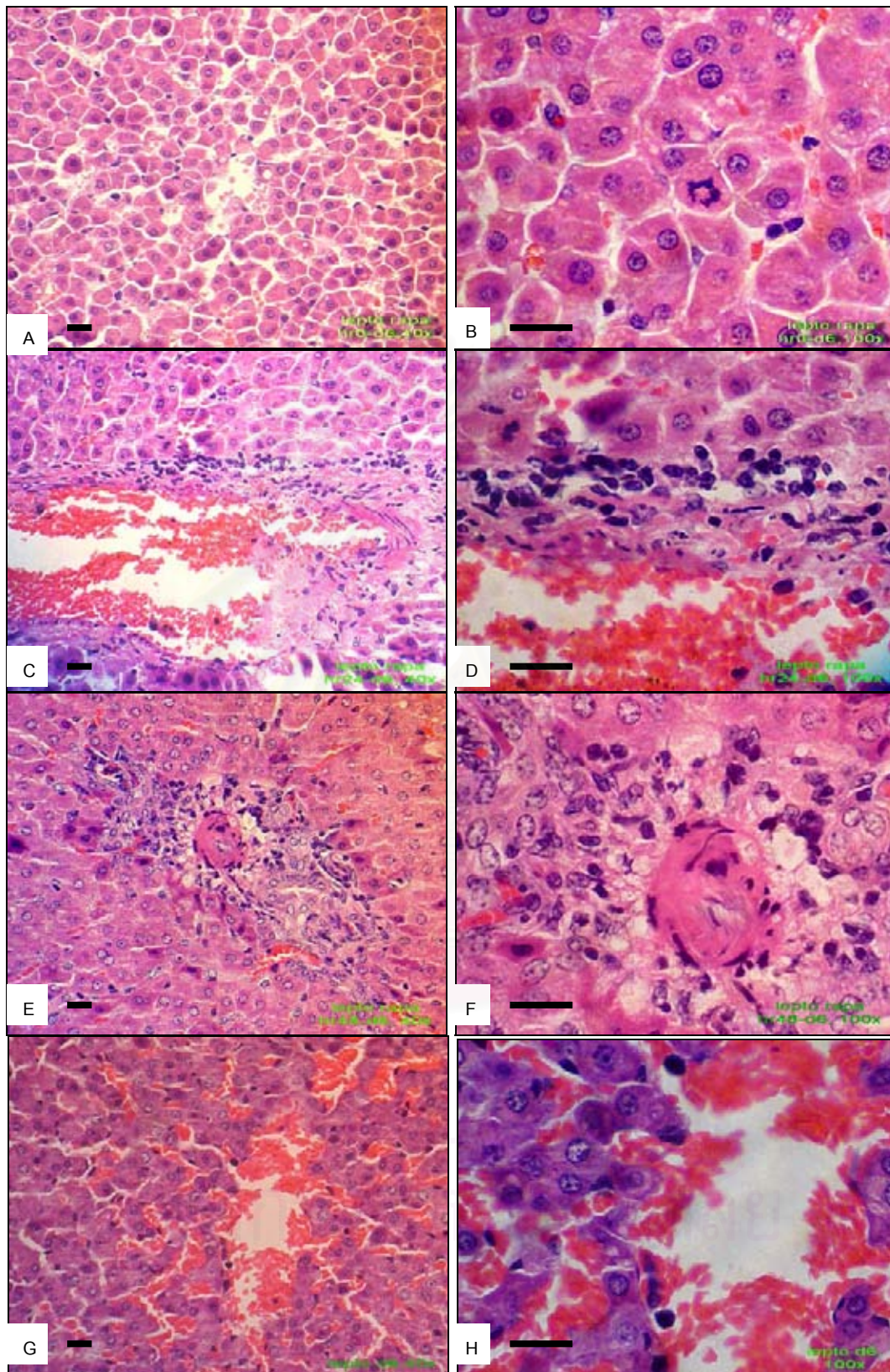
รูปที่ 31 แสดงจุลพยาธิวิทยาของปอดในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : ทุกกลุ่มพบเลือดออกอย่างรุนแรงที่ผนังถุงลม และในถุงลม ; bar = 20 μ m



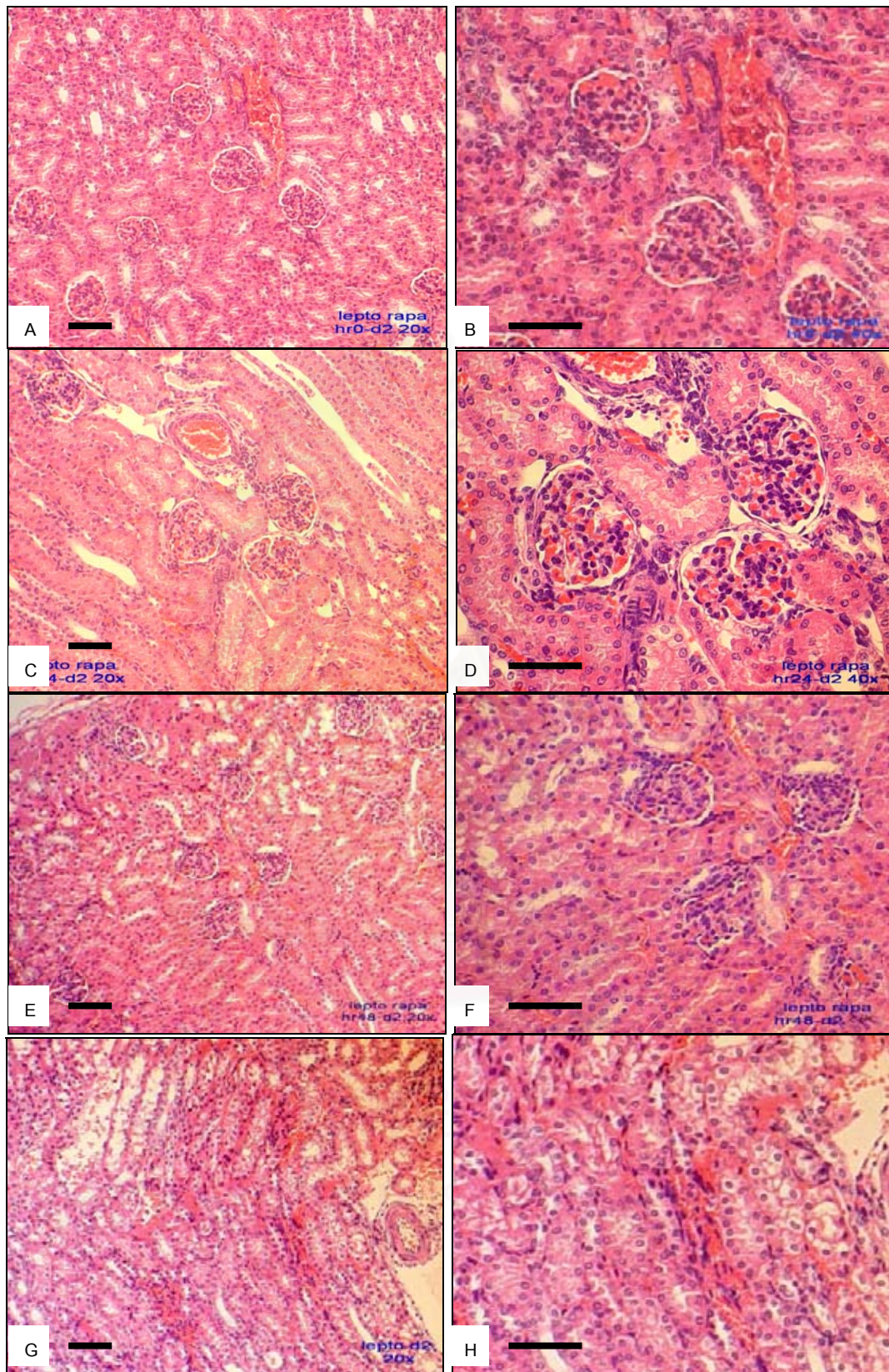
รูปที่ 32 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : กลุ่ม Lepto พบการสูญเสียโครงสร้างของ hepatic cell cord ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบการตายของเซลล์ตับ ; bar = 20 μ m



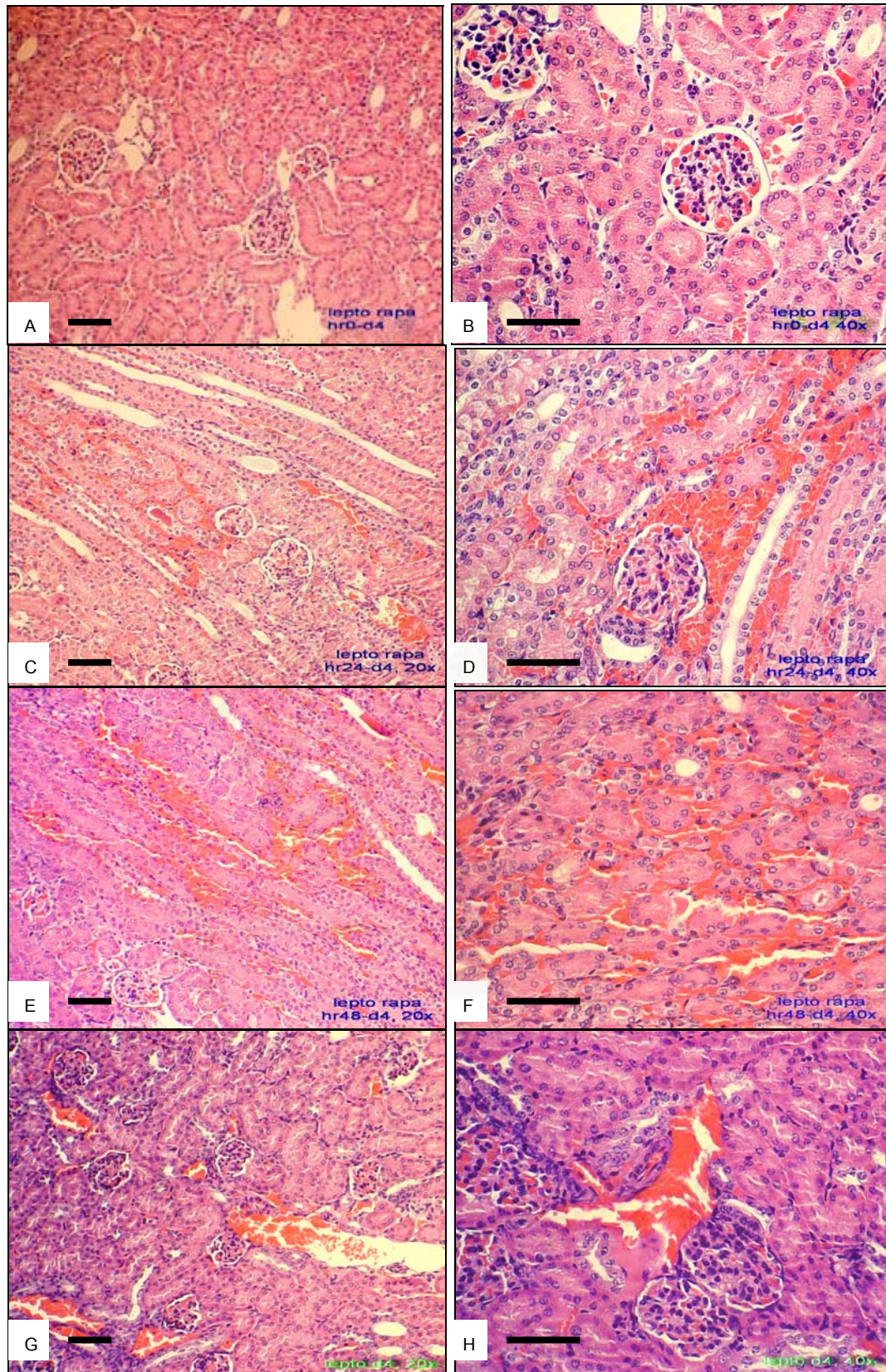
รูปที่ 33 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการตายของเซลล์ตับ ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ และ Lepto พบการแทรกตัวของนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์ รอบๆ หลอดเลือด ; bar = 20 μ m



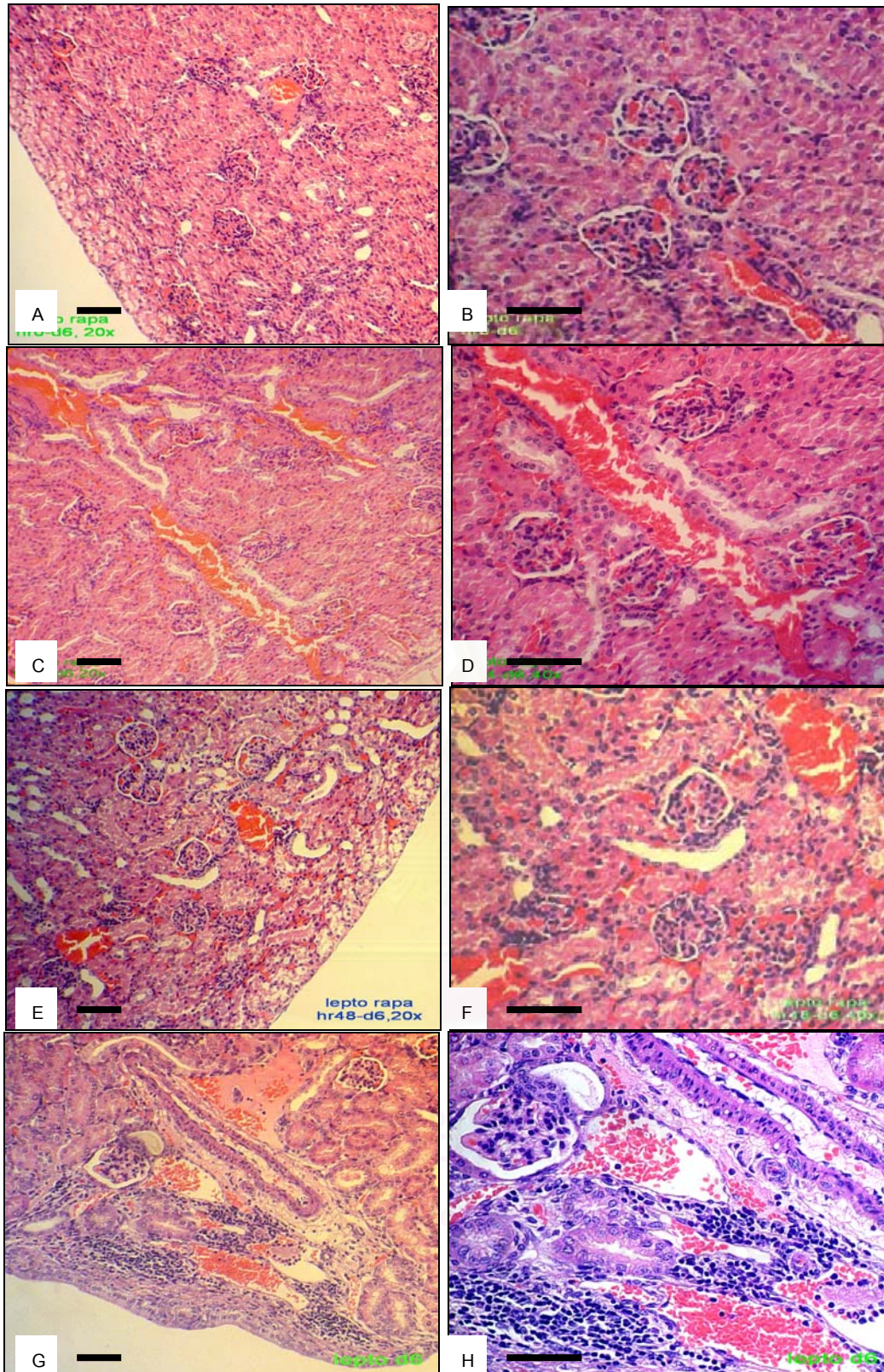
รูปที่ 34 แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการแทรกตัวของนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์ รอบๆ หลอดเลือด กลุ่ม Lepto พบการคั่งเลือดของ hepatic sinusoids อย่างรุนแรง ส่วนกลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบการรวมของเซลล์ตับ ; bar = 20 μm



รูปที่ 35 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 2 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : กลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการคั่งเลือดของหลอดเลือดฝอยที่อยู่ระหว่างท่อไตส่วนต้น ในขณะที่กลุ่ม Lepto และ Lepto rapa hr₀ พบเลือดออกรอบๆท่อไตส่วนต้น ; bar = 50 μm



รูปที่ 36 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 4 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) : กลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ พบเลือดออกรอบๆหน่วยกรองไต และท่อไต ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ พบการรวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต ; bar = 50 μ m



รูปที่ 37 แสดงจุลพยาธิวิทยาของไตในวันที่ 6 ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ (A,B), Lepto rapa hr₂₄ (C,D), Lepto rapa hr₄₈ (E,F) และ Lepto (G,H) พบเลือดออกรอบๆหน่วยกรองไต และท่อไตในทุกกลุ่ม โดยเฉพาะ กลุ่ม Lepto พบการตายของเซลล์เยื่อบุท่อไต ร่วมกับการแทรกตัวของนิวโทรฟิลจำนวนมากรอบๆหน่วยกรองไต และท่อไต ; bar = 50 μm

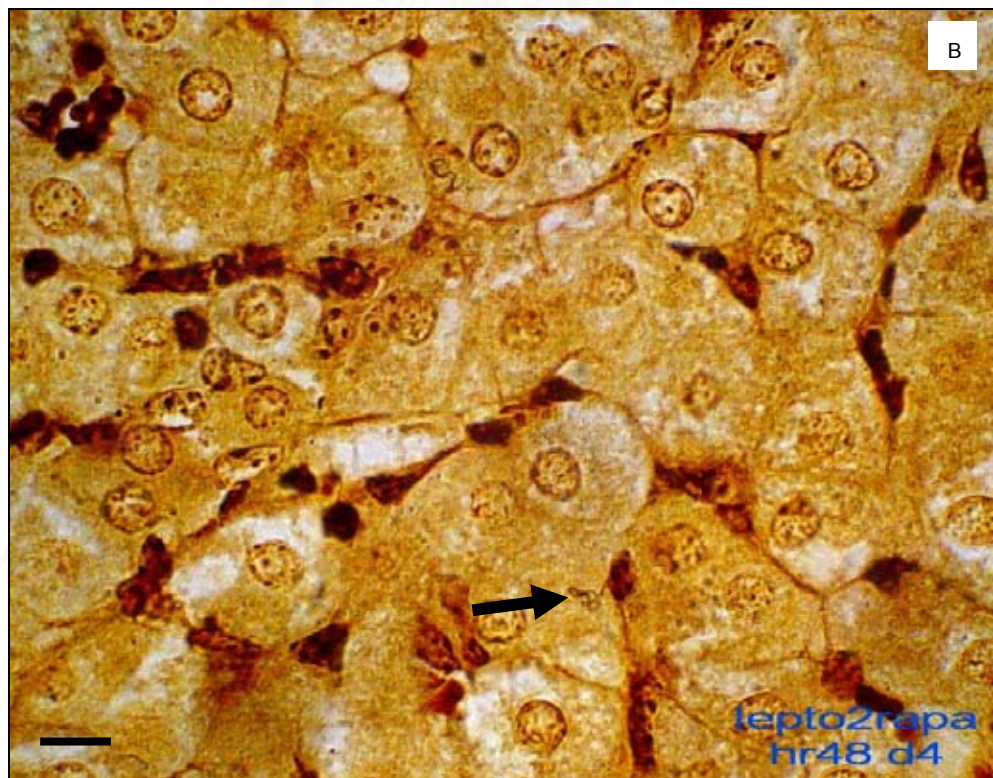
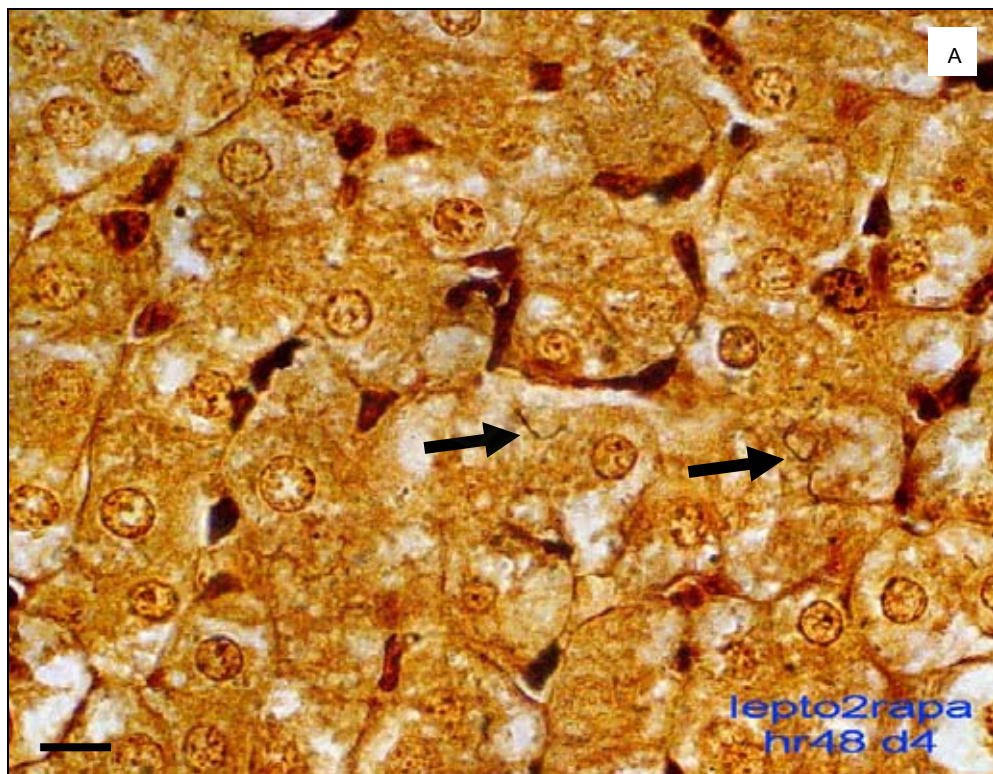
4.5.2 ผลการตรวจหาตัวเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะต่างๆ โดยการย้อมด้วยวิธี Warthin-Starry method

การย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี Warthin-Starry method ไม่สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราที่ปอด แต่สามารถตรวจพบเฉพาะที่ตับและไตเท่านั้น โดยที่ตับพบเฉพาะกลุ่ม Lepto ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ (Lepto d_4)(1/2), Lepto rapa hr_0 ในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ (Lepto rapa hr_0-d_6) (2/2) และกลุ่ม Lepto rapa hr_{48} วันที่ 4 (Lepto rapa $hr_{48}-d_4$) (2/2) สำหรับที่ไตพบเฉพาะกลุ่ม Lepto rapa hr_{48} วันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ (Lepto rapa $hr_{48}-d_6$) (1/2) เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 14

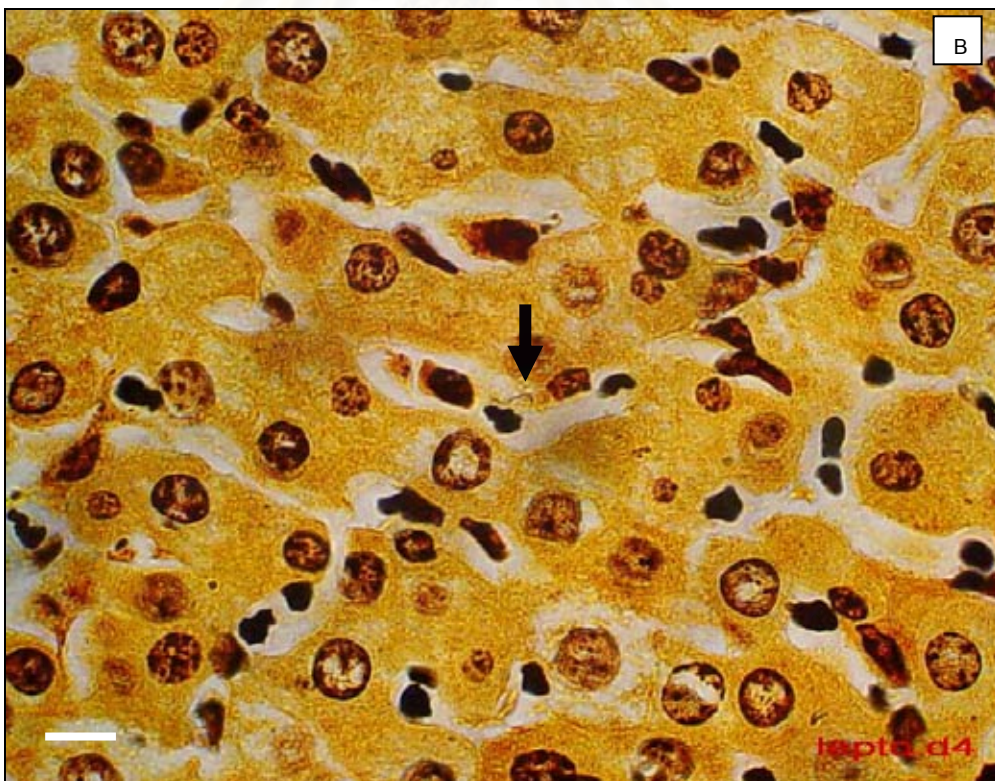
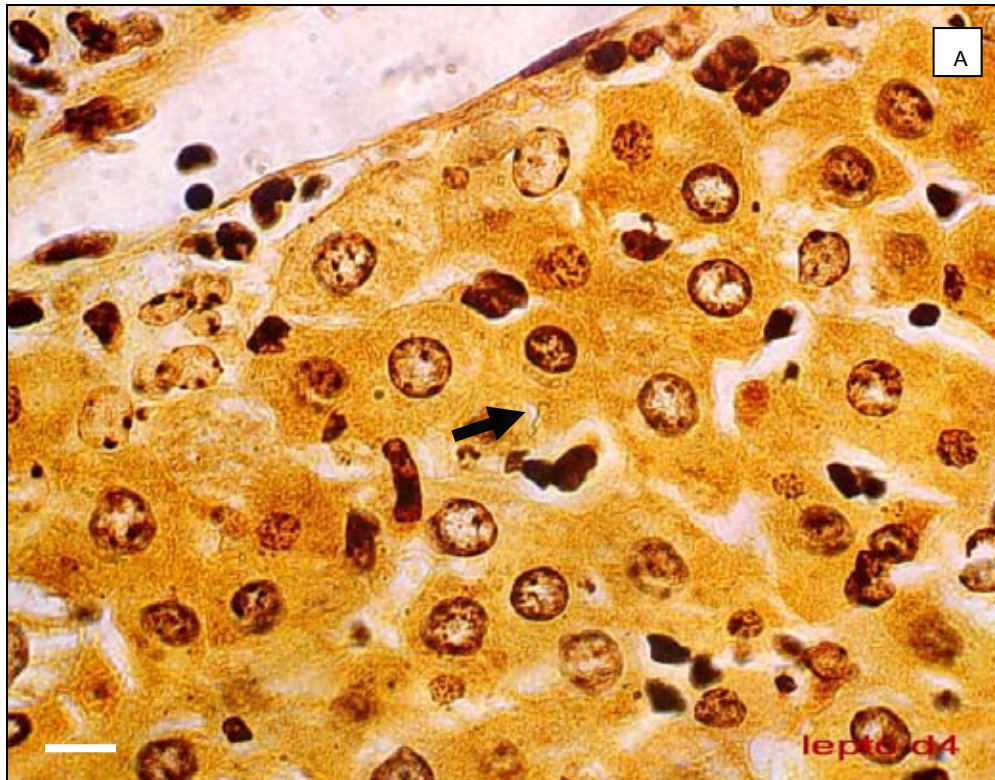
เชื้อเลปโตสไปราที่พบในตับของ Lepto rapa $hr_{48}-d_4$ (รูปที่ 38), Lepto d_4 (รูปที่ 39A-B) และ Lepto rapa hr_0-d_6 (รูปที่ 40A-B) พบว่ามีลักษณะเป็นเส้นเรียว ลำตัวบิดงอไม่เป็นเส้นตรง ติดสีน้ำตาลเข้ม เชื้อบางตัวพบในเซลล์ตับ (รูปที่ 40A) เชื้อบางตัวพบในใน sinusoid (รูปที่ 39B) และเชื้อบางตัวพบในเซลล์ตับที่ตายแล้ว โดยเซลล์ตับดังกล่าวพบ pyknotic nuclei ในเซลล์ (รูปที่ 40B) ส่วนเชื้อที่พบที่ไตพบในกลุ่ม Lepto rapa $hr_{48}-d_6$ เชื้อมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในตับ โดยพบในส่วนของท่อไตส่วนต้น (proximal renal tubules) (รูปที่ 41A-B)

ตารางที่ 14 แสดงการตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Warthin-Starry method

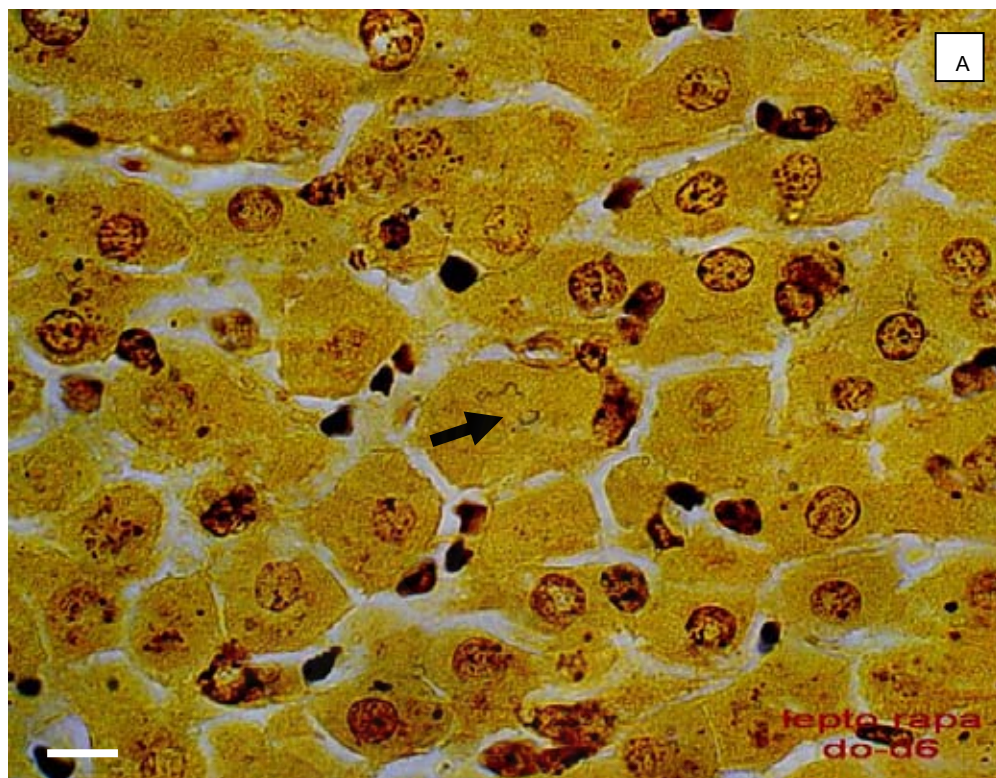
กลุ่มทดลอง	วันที่เก็บตัวอย่าง	การตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา (n=2)		
		ปอด	ตับ	ไต
Lepto rapa hr_0	2	0	0	0
	4	0	0	0
	6	0	2	0
Lepto rapa hr_{24}	2	0	0	0
	4	0	0	0
	6	0	0	0
Lepto rapa hr_{48}	2	0	0	0
	4	0	2	0
	6	0	0	1
Lepto	2	0	0	0
	4	0	1	0
	6	0	0	0



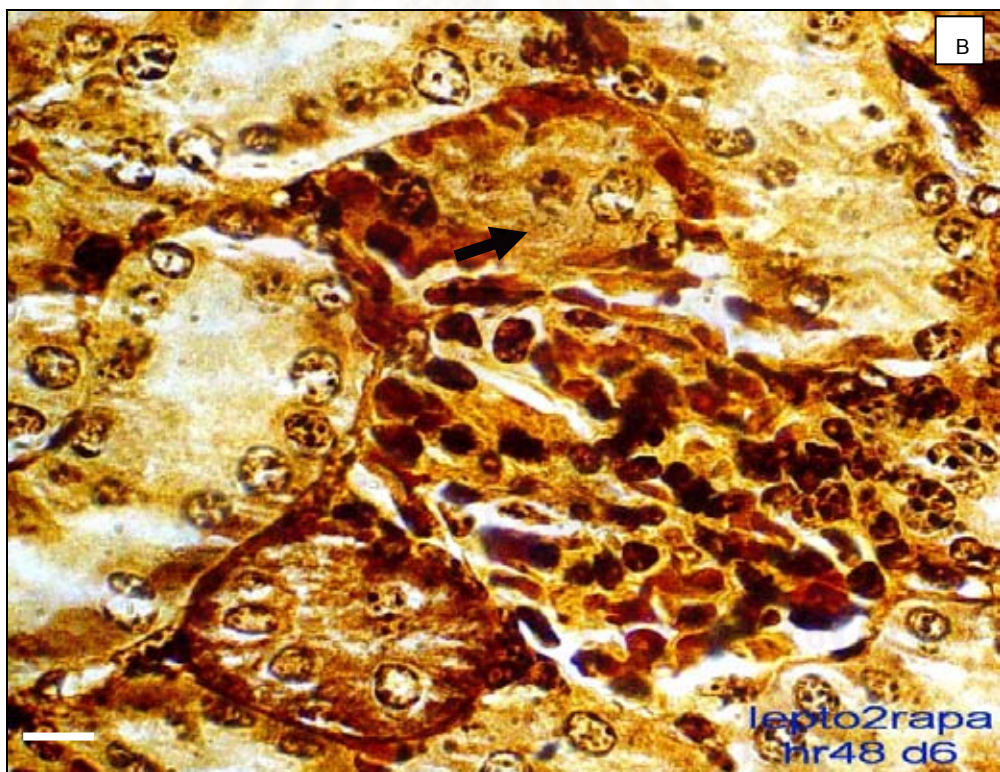
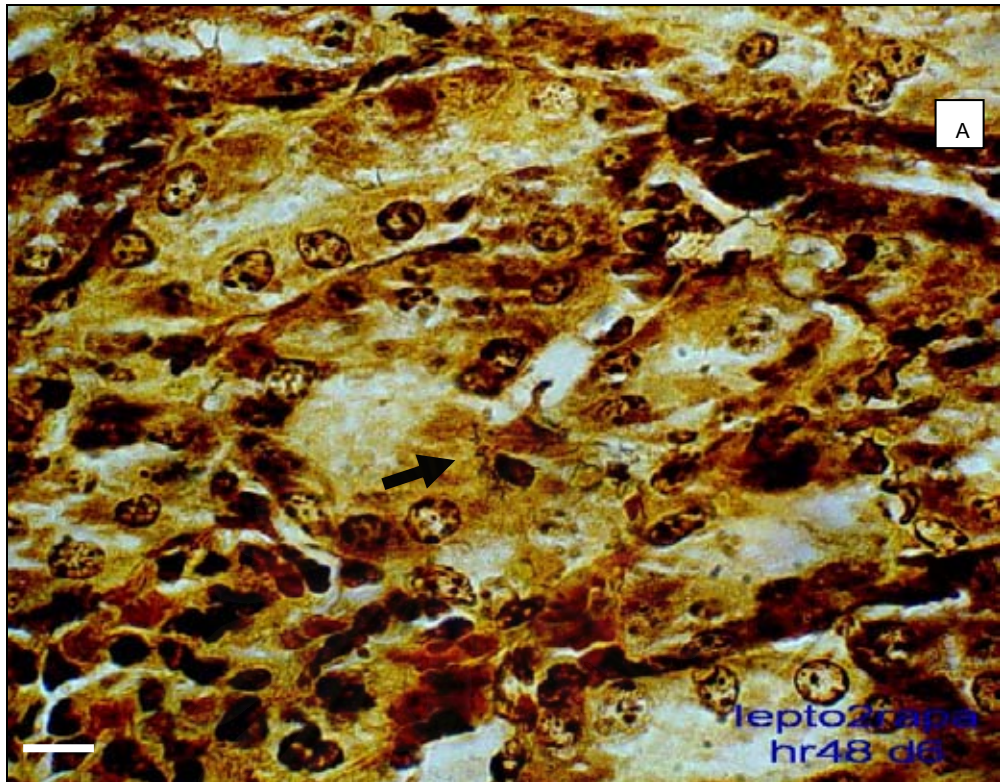
รูปที่ 38 (A, B) แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ตับของหนูตะเภากลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ ; bar = 10 μ m, ย้อมด้วยวิธี Warthin-Starry method



รูปที่ 39 (A, B) แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ตับของหนูตะเภากลุ่ม Lepto ในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ ; bar = 10 μ m, ย้อมด้วยวิธี Warthin-Starry method



รูปที่ 40 (A,B) แสดงการพบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ตับของหนูตะเภากลุ่ม Lepto rapa hr₀ ในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ ; bar = 10 μ m, ย้อมด้วยวิธี Warthin-Starry method



รูปที่ 41 (A, B) แสดงการตรวจพบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ไตของหนูตะเภากลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ วันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ ; bar = 10 μ m, ย้อมด้วยวิธี Warthin-Starry method

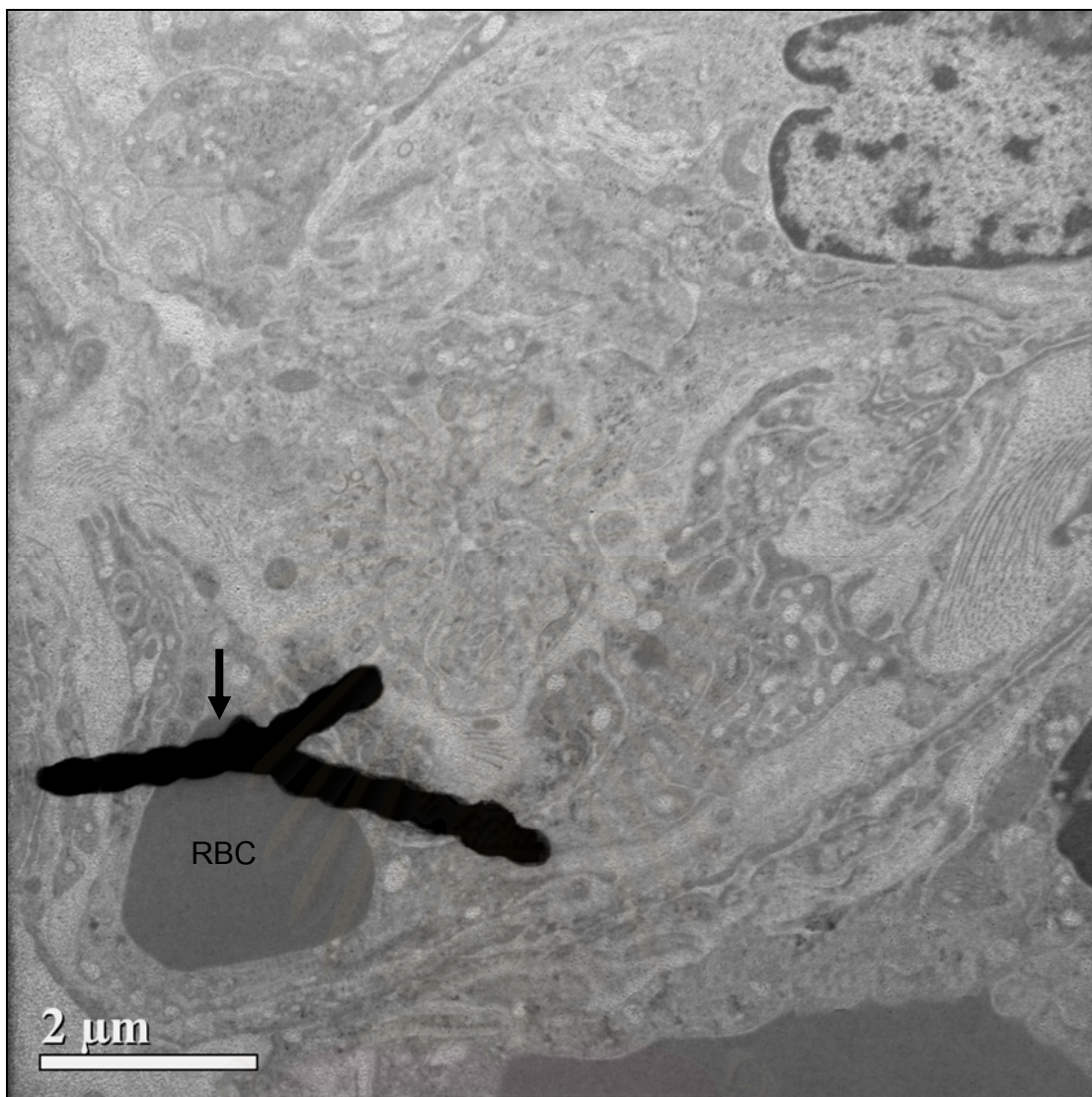
4.6 ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ในกลุ่ม Lepto หลังฉีดเชื้อในวันที่ 6 (Lepto d₆) และ กลุ่ม Lepto rapa hr₀ หลังฉีดเชื้อในวันที่ 6 (Lepto rapa hr₀-d₆) สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ในปอด ตับ และไตทั้ง 2 กลุ่ม

ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto d₆ สามารถตรวจพบเชื้อได้ในปอด (รูปที่ 42) ตับ (รูปที่ 45 และ 46) และไต (รูปที่ 47) ที่ตับสามารถพบเชื้อในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 45) และนิวเคลียส (รูปที่ 46) ของเซลล์ตับ ส่วนที่ไตสามารถพบเชื้ออยู่ในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 47A) และนิวเคลียส (รูปที่ 47C) ของเซลล์เยื่อบุท่อไต (renal tubular epithelium) โดยเชื้อเลปโตสไปราที่พบมีลักษณะเป็นเส้น บิดเป็นเกลียว ที่ส่วนปลายของตัวเชื้อมีลักษณะเป็นกลมรีคล้ายหัวกระสุนปืน (รูปที่ 47B) เชื้อคงอยู่ในเซลล์โดยที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆ

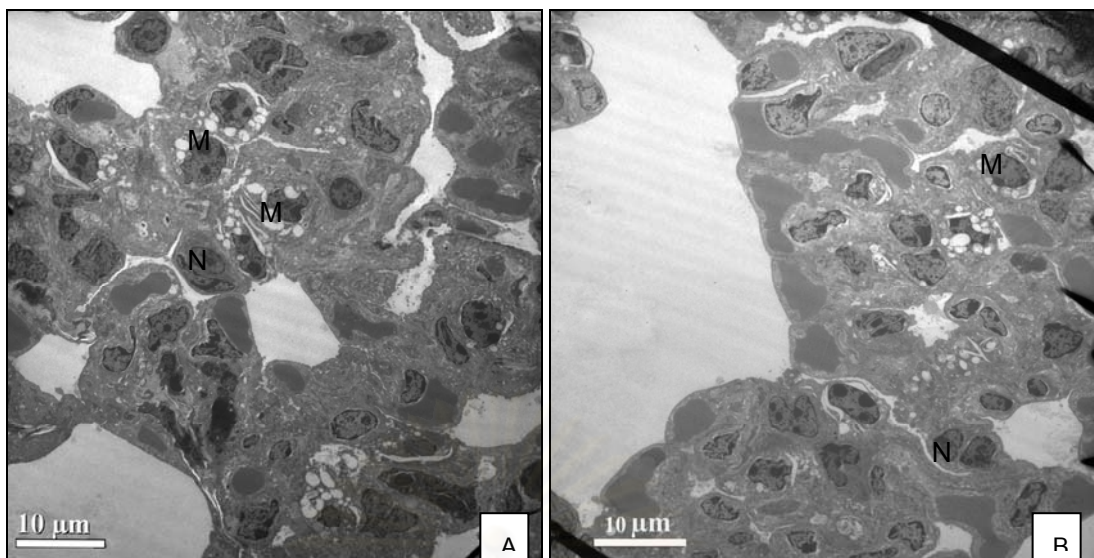
ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀-d₆ พบเชื้อเฉพาะที่ไตเท่านั้น โดยพบเชื้อในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุท่อไต (รูปที่ 48)

ผลการศึกษาทางมหจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ของปอดของหนูตะเภาทั้งสองกลุ่ม พบลักษณะการหนาตัวของ alveolar septum ได้อย่างชัดเจน โดยพบการแทรกตัวของนิวโทรฟิล และมาโครฟาจ ร่วมกับพบลักษณะการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลม (pulmonary capillary congestion) (รูปที่ 43 และ 44)

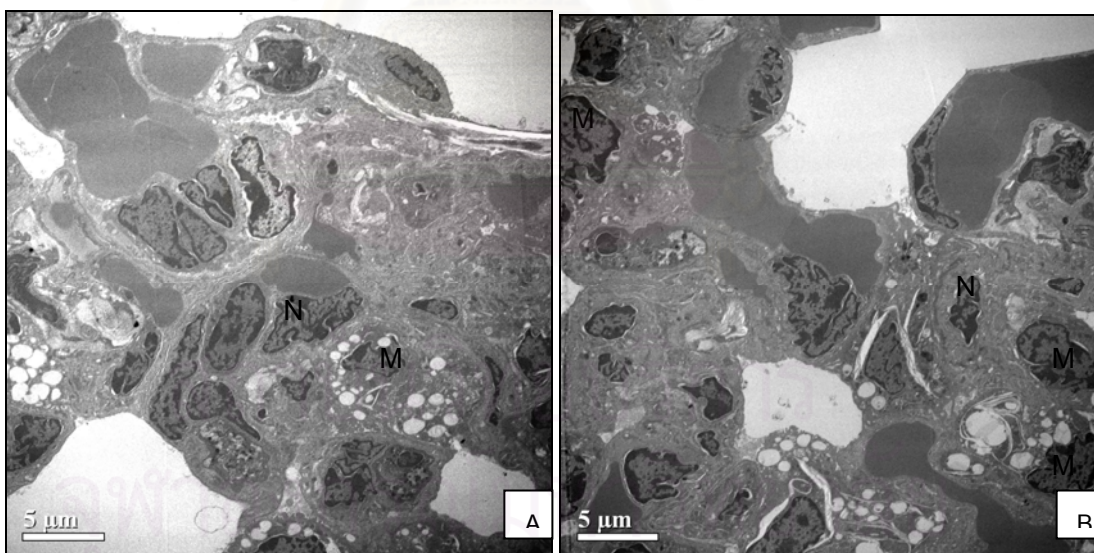


รูปที่ 42 แสดงเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ปอดของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto d₆
(RBC = เม็ดเลือดแดง), TEM

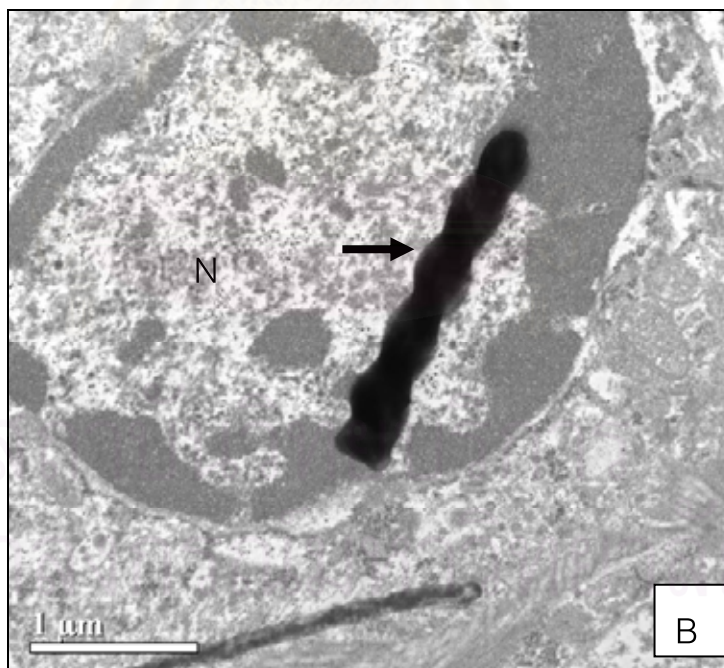
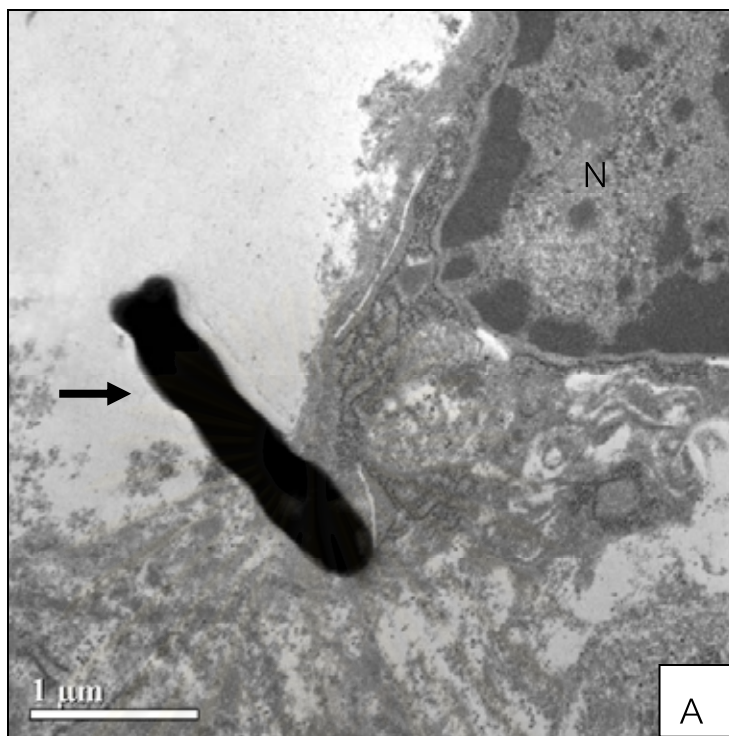
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 43 แสดงปอดของหนูตะเภากลุ่ม Lepto d₆ พบลักษณะการหนาตัวของ alveolar septum ที่มีการแทรกตัวของนิวโทรฟิลล์ (N) และมาโครฟาจ (M) ร่วมกับการพบลักษณะการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลม (pulmonary capillary congestion), TEM



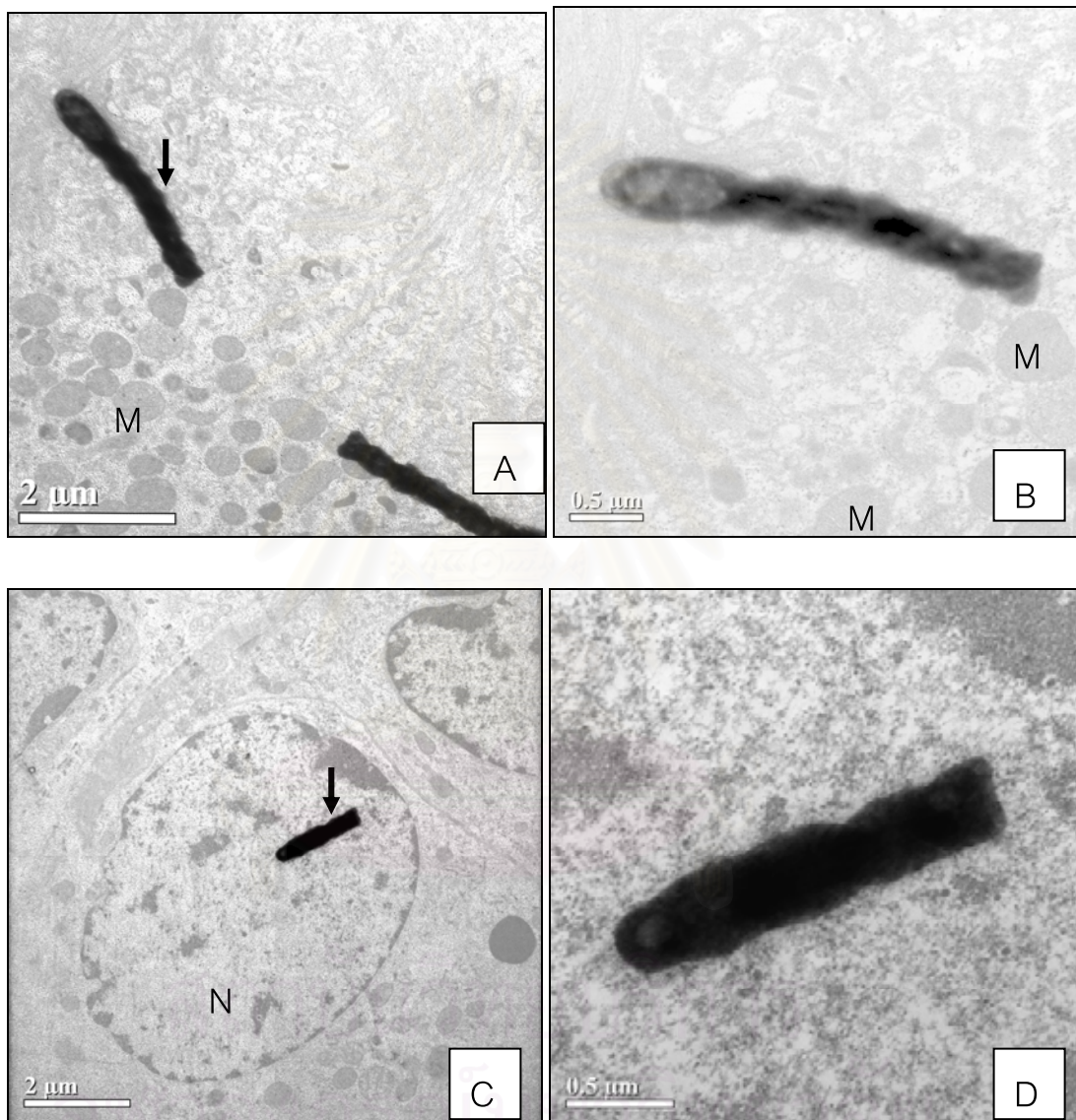
รูปที่ 44 แสดงปอดของหนูตะเภากลุ่ม Lepto rapa hr₀-d₆ พบลักษณะการหนาตัวของ alveolar septum ที่มีการแทรกตัวของนิวโทรฟิลล์ (N) และมาโครฟาจ (M) ร่วมกับการพบลักษณะการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลม (pulmonary capillary congestion), TEM



รูปที่ 45 แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ตับของหนูตะเภากลุ่ม Lepto d₆

A) พบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ (N = นิวเคลียส)

B) พบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ตับ (N = นิวเคลียส)

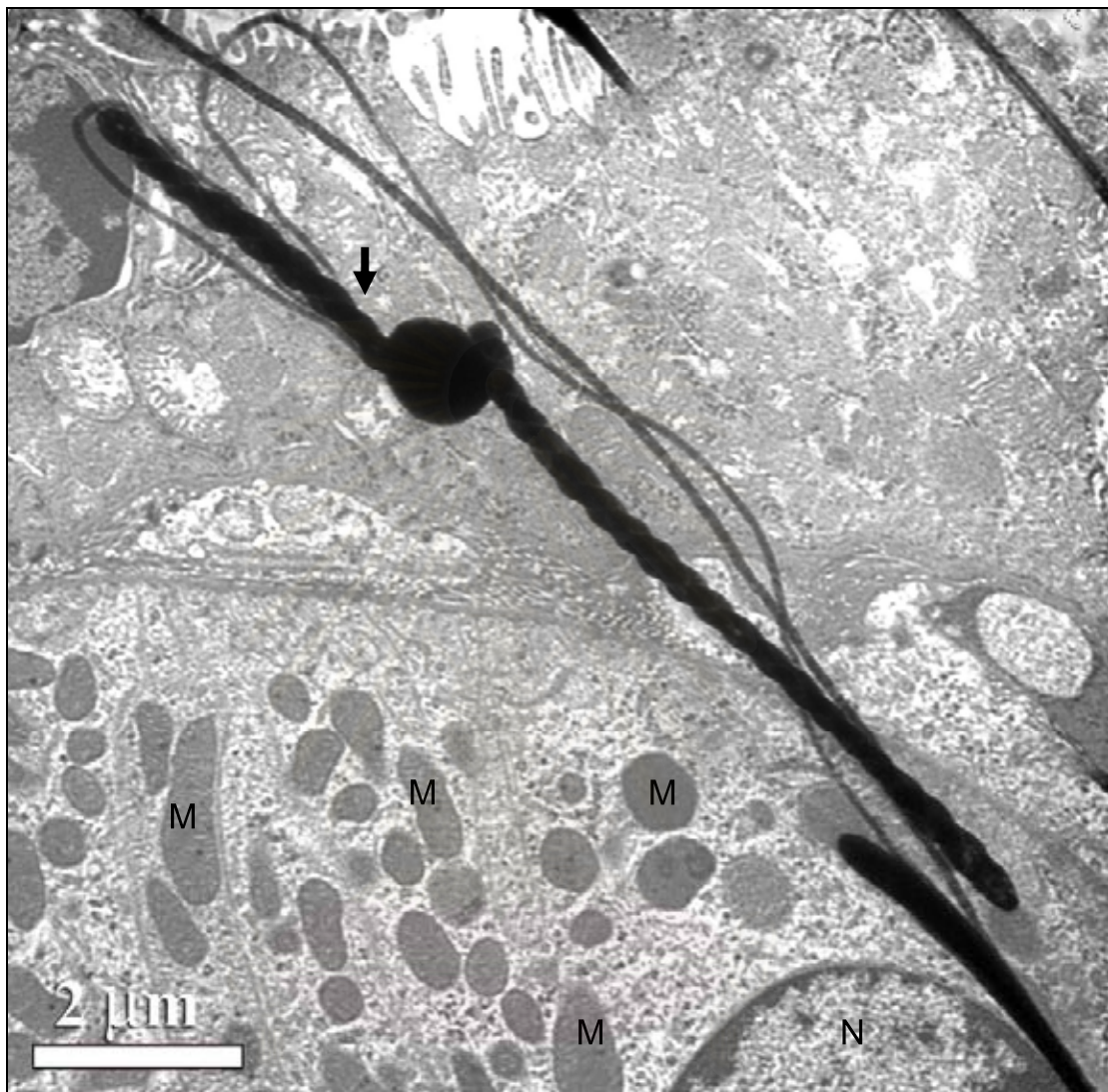


รูปที่ 46 แสดงเชื้อเลปโตสไปราที่ไตของหนูตะเภากลุ่ม Lepto d₆

A, B) พบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อบุท่อไต

C, D) พบเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ในนิวเคลียสของเซลล์เยื่อบุท่อไต

(B เป็นภาพขยายของ A, D เป็นภาพขยายของ C, N = นิวเคลียส, M = ไมโทคอนเดรีย)



รูปที่ 47 แสดงเชื้อเลปโตสไปรา (ลูกศรชี้) ที่ไตของหนูกะแมกกลุ่ม *Lepto rapa hr₀-d₆*
(N = นิวเคลียส, M = ไมโทคอนเดรียของเซลล์เยื่อบุท่อไต)

4.7 ผลการตรวจพบการสะสมของสารภูมิคุ้มกันในกลอบูลินชนิดต่างๆ ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT

4.7.1 ผลการตรวจพบการสะสมของ IgM ในปอด ไต และตับ

ในกลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบการสะสมของ IgM ที่ปอด ไต และตับ (รูปที่ 48, 51 และ 54) ในขณะที่กลุ่ม Lepto สามารถตรวจพบการสะสมของ IgM ที่ปอด ไต และตับ โดยที่ปอดพบการติดสีเรืองแสงของ IgM ที่ผนังถุงลมได้อย่างชัดเจนในวันที่ 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ (รูปที่ 48-50) ในขณะที่ไตพบการติดสีเรืองแสงของ IgM ที่หน่วยกรองไต ซึ่งพบได้ตั้งแต่วันที่ 2 และพบปริมาณการสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ สามารถพบได้อย่างชัดเจนในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ (รูปที่ 51-53) ส่วนที่ตับพบการสะสมปริมาณน้อยในเนื้อเยื่อในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ (รูปที่ 54) สำหรับในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อและได้รับยารักษาไม่สิ้นมีเพียงกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เท่านั้น ที่พบการสะสมของ IgM ปริมาณน้อยที่ปอด ไต และตับ ในวันที่ 4 และ 6 (รูปที่ 48, 51 และ 54)

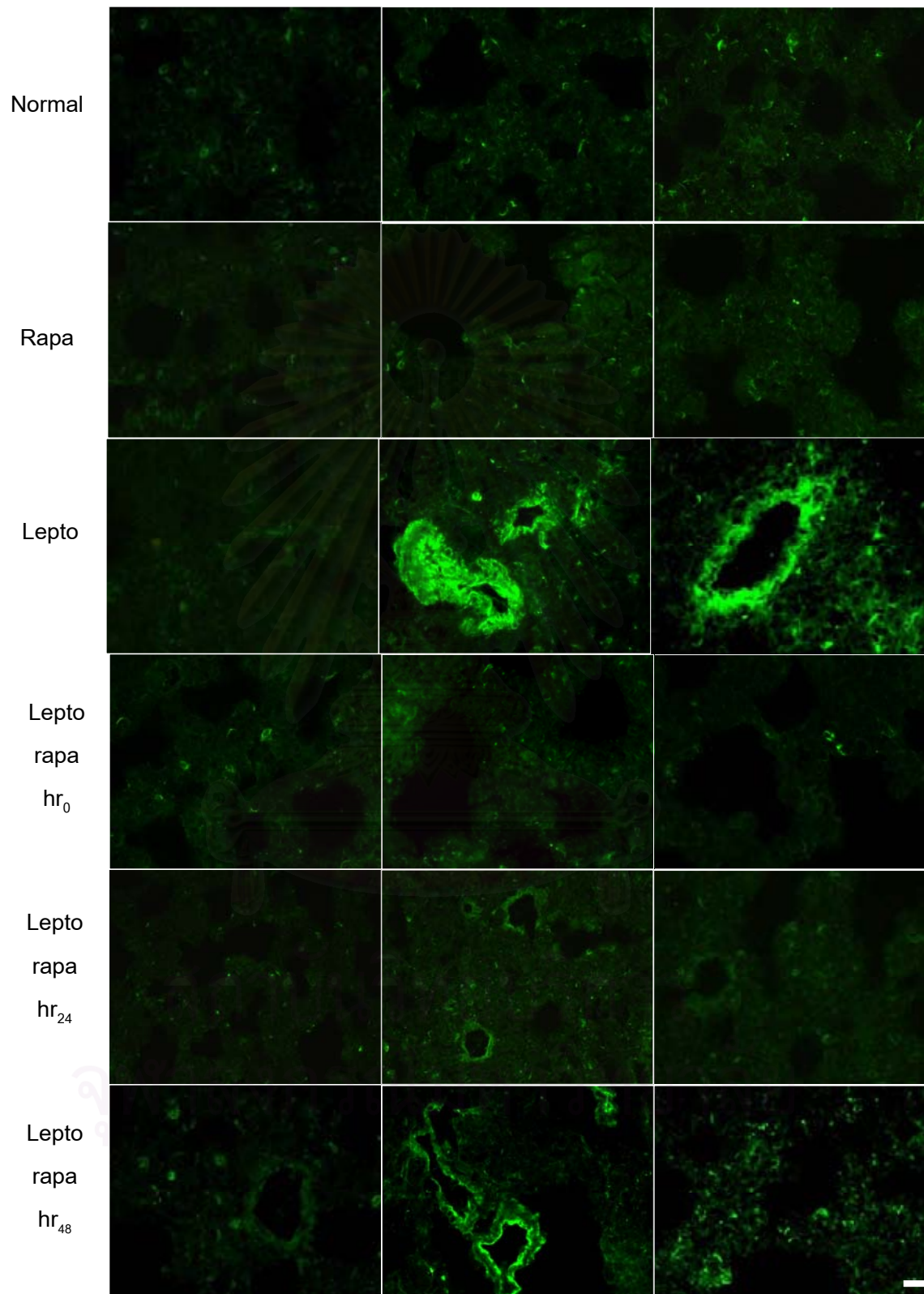
ตารางที่ 15 แสดงผลการสะสมของ IgM ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT

อวัยวะ	กลุ่มทดลอง (n=2)	คะแนนการย้อมติดสีเรืองแสงในเนื้อเยื่อ		
		วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
ปอด	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	0	+2	+2
	Lepto rapa hr ₀	0	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	+1	+1
ไต	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	+2	+2	+3
	Lepto rapa hr ₀	+1	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	+1	0	+1
	Lepto rapa hr ₄₈	0	+1	+1
ตับ	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	0	0	+1
	Lepto rapa hr ₀	0	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	0	+1

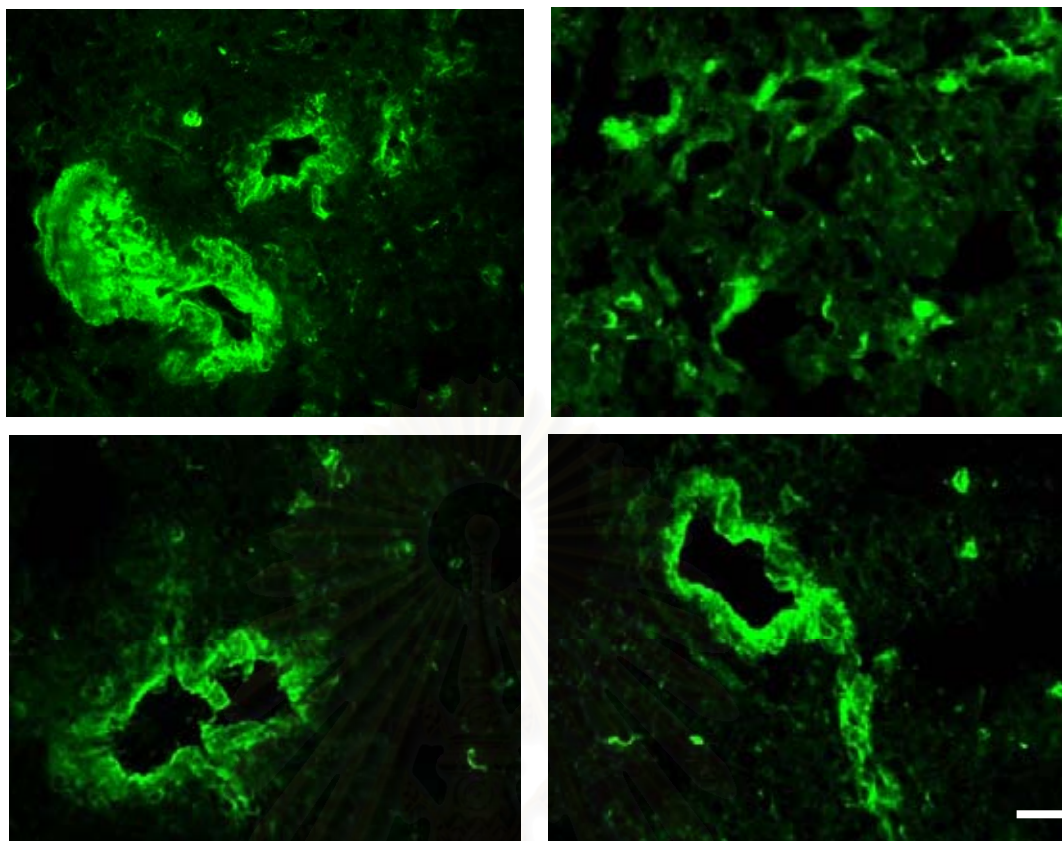
วันที่ 2

วันที่ 4

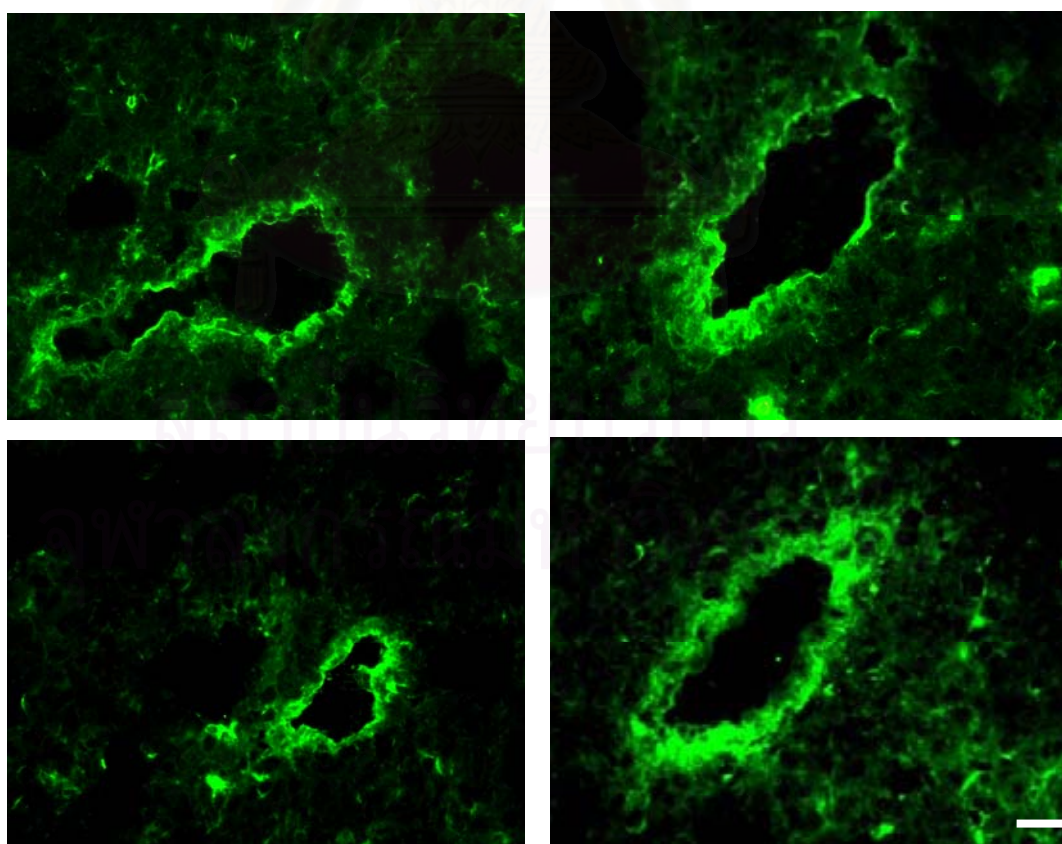
วันที่ 6



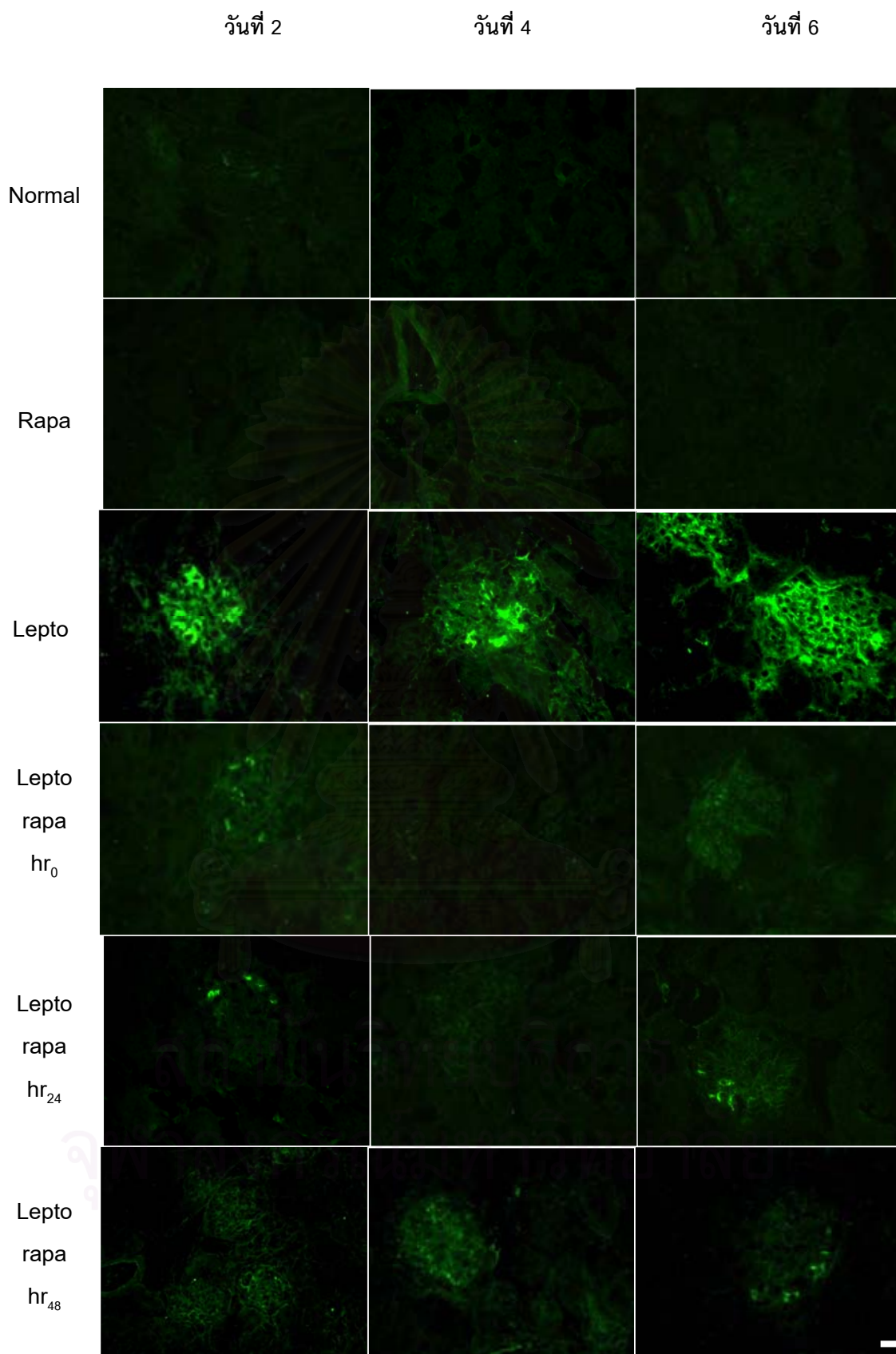
รูปที่ 48 แสดงผลการตรวจพบการสะสม IgM ในปอด ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



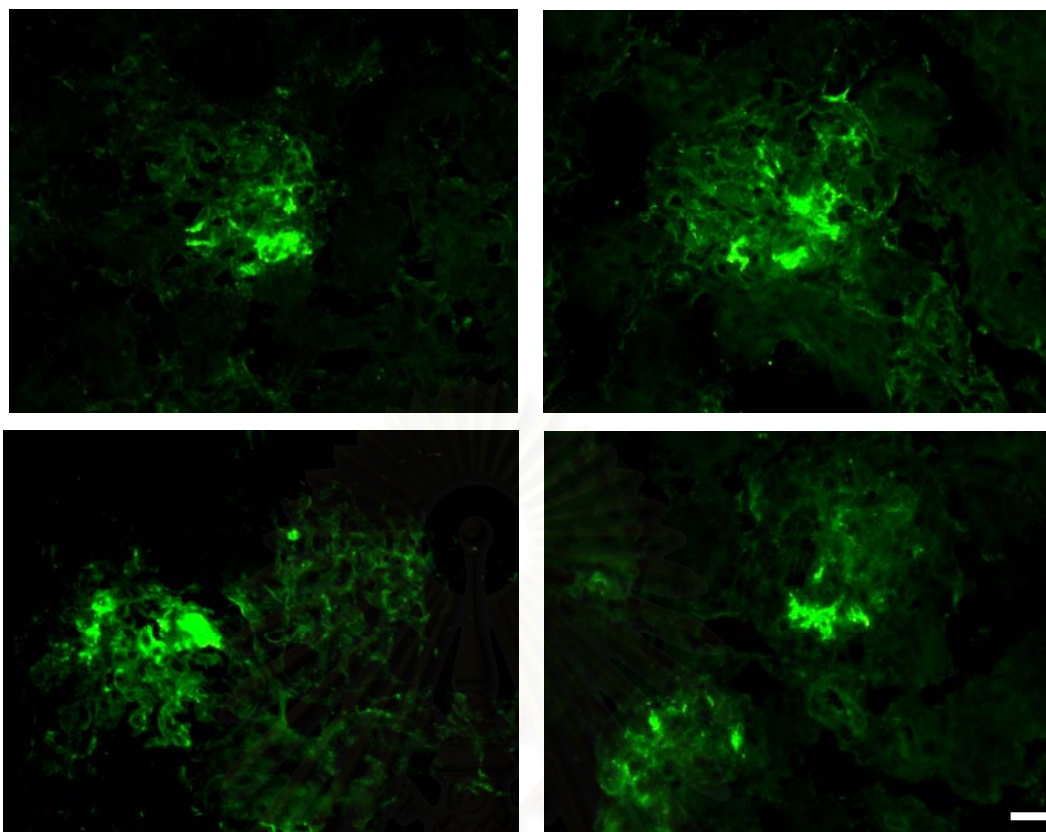
รูปที่ 49 แสดงการติดสีเรืองแสงของ IgM ที่ผนังถุงลม ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 4, bar=20 μ m



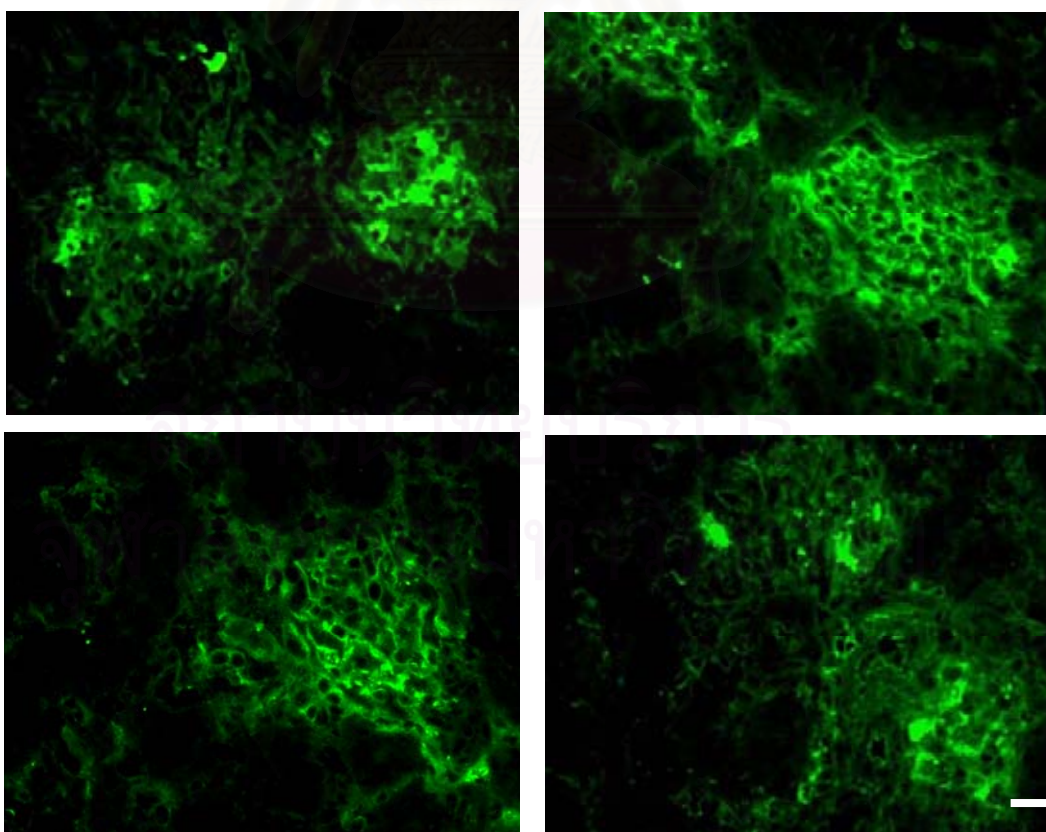
รูปที่ 50 แสดงการติดสีเรืองแสงของ IgM ที่ผนังถุงลม ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 6, bar = 20 μ m



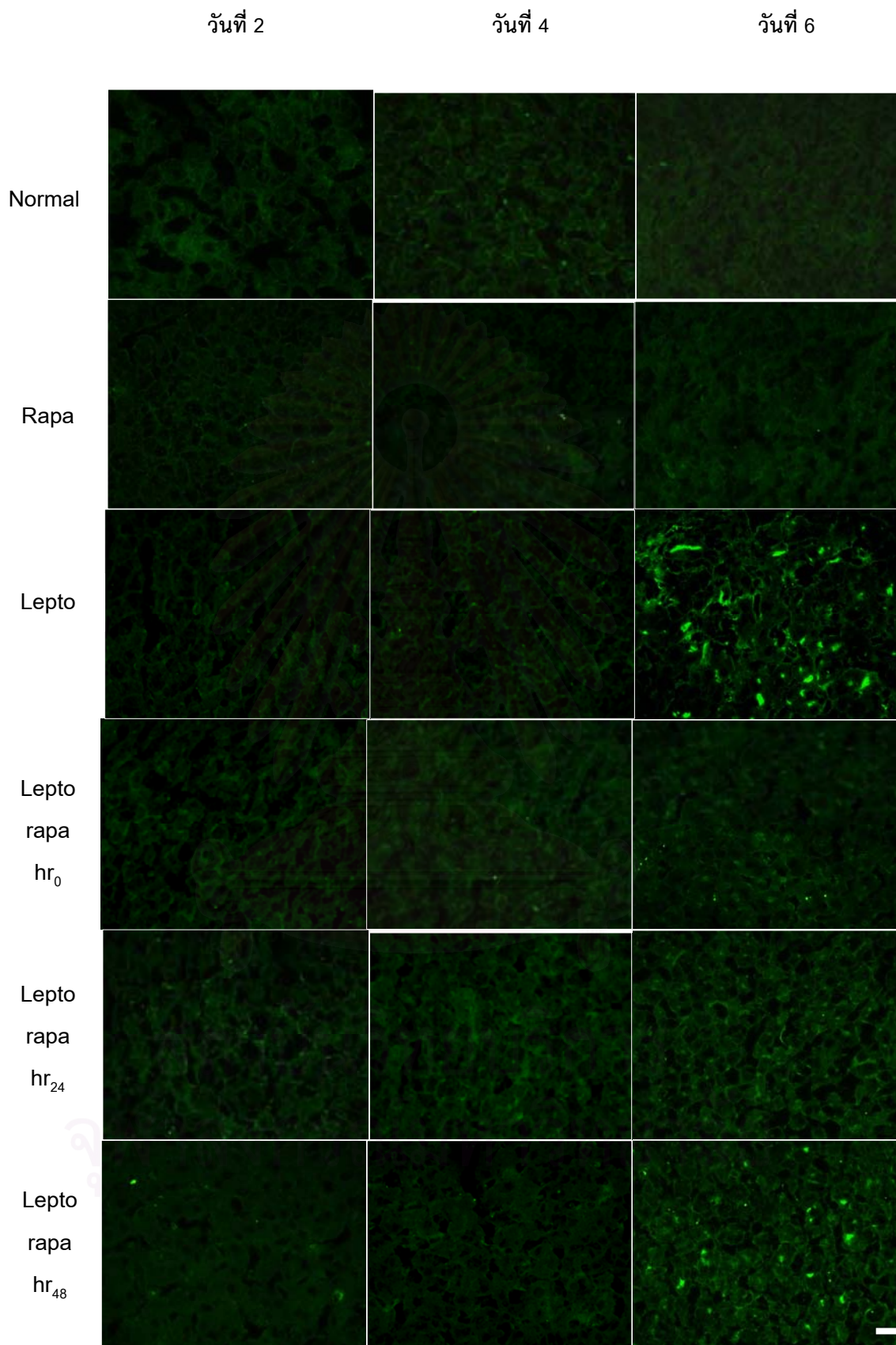
รูปที่ 51 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgM ในไต ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



รูปที่ 52 แสดงผลการสะสมของ IgM ที่หน่วยกรองไต ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 4, bar = 20 μ m



รูปที่ 53 แสดงผลการสะสมของ IgM ที่หน่วยกรองไต ของหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 6, bar = 20 μ m



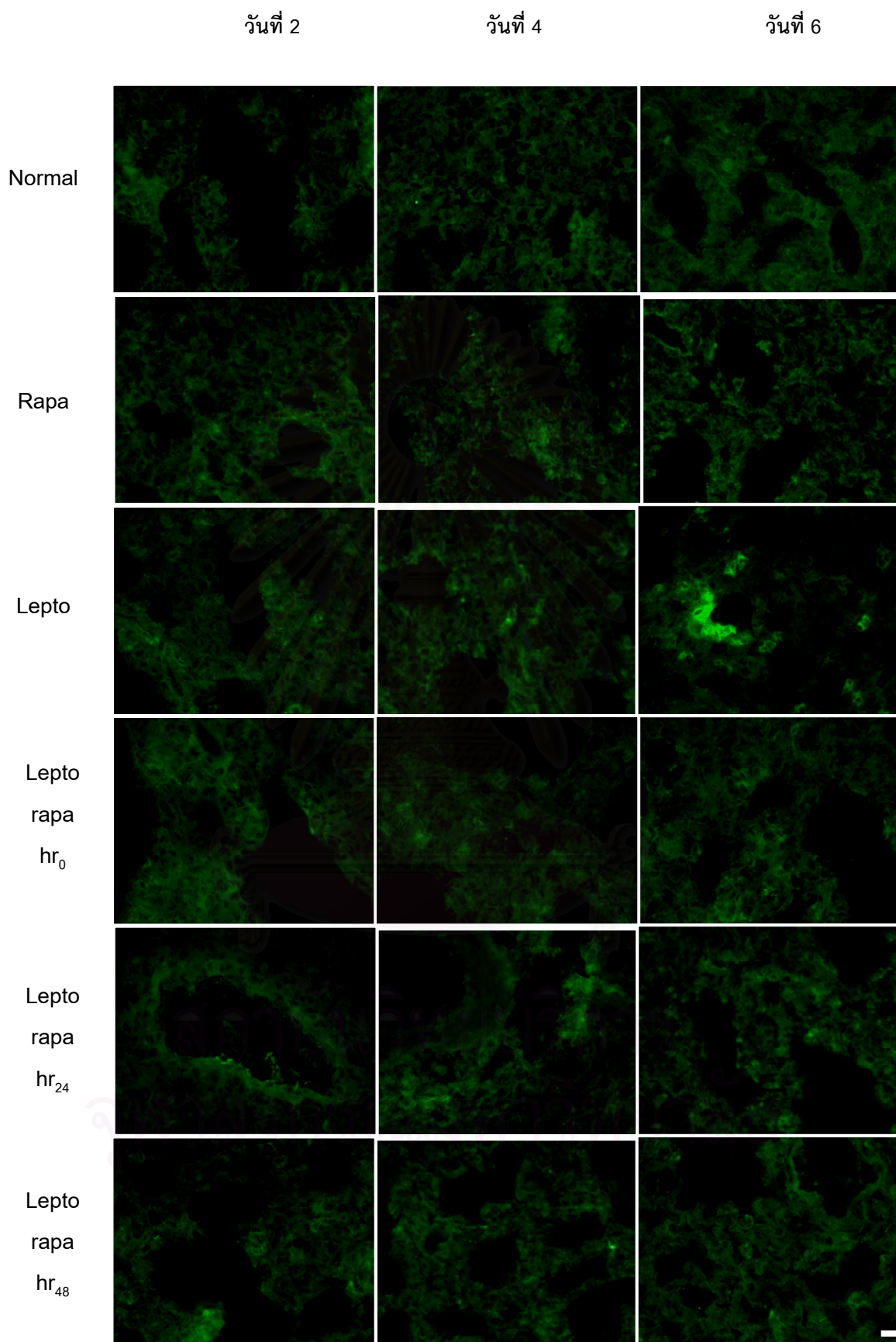
รูปที่ 54 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgM ในตับ ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m

4.7.2 ผลการตรวจการสะสมของ IgG ในปอด ไต และตับ

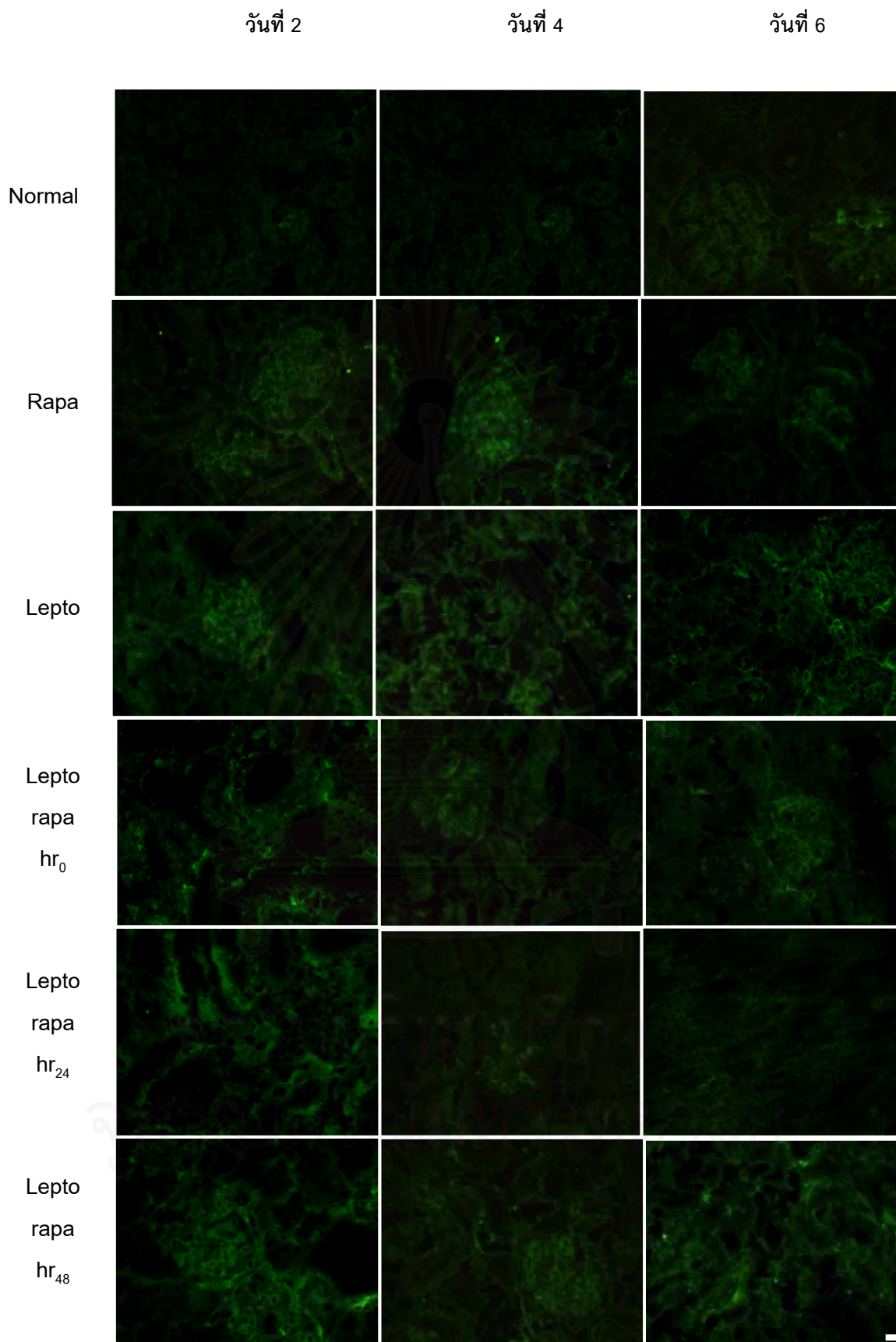
พบการสะสมของ IgG ที่ปอดเฉพาะหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto วันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ โดยพบในปริมาณน้อย ในขณะที่ทุกกลุ่มไม่พบการสะสมของ IgG ที่ไต สำหรับการสะสมของ IgG ที่ตับ ทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบปริมาณเล็กน้อยในวันที่ 2 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ โดยกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบการสะสมของ IgG ที่ตับปริมาณน้อย เฉพาะในวันที่ 4 หลังฉีดเชื้อ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 55-57)

ตารางที่ 16 แสดงผลการสะสมของ IgG ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT

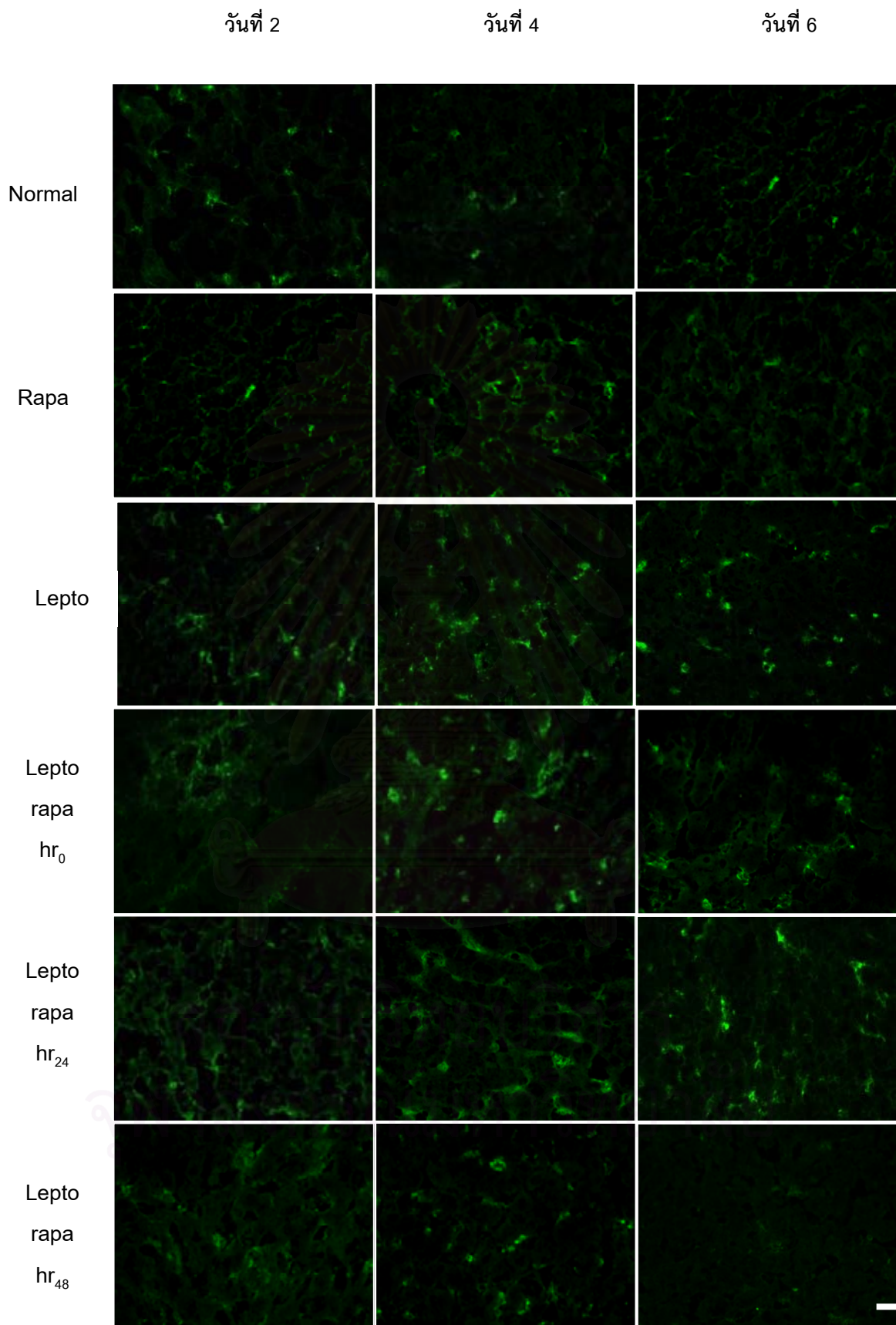
อวัยวะ	กลุ่มทดลอง (n=2)	คะแนนการย้อมติดสีเรืองแสงของ IgG ในเนื้อเยื่อ		
		วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
ปอด	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	0	0	+1
	Lepto rapa hr ₀	0	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	0	0
ไต	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	0	0	0
	Lepto rapa hr ₀	0	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	0	0
ตับ	Normal	+1	+1	+1
	Rapa	+1	+1	0
	Lepto	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₀	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₄₈	0	+1	0



รูปที่ 55 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในปอด ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



รูปที่ 56 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในไต ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



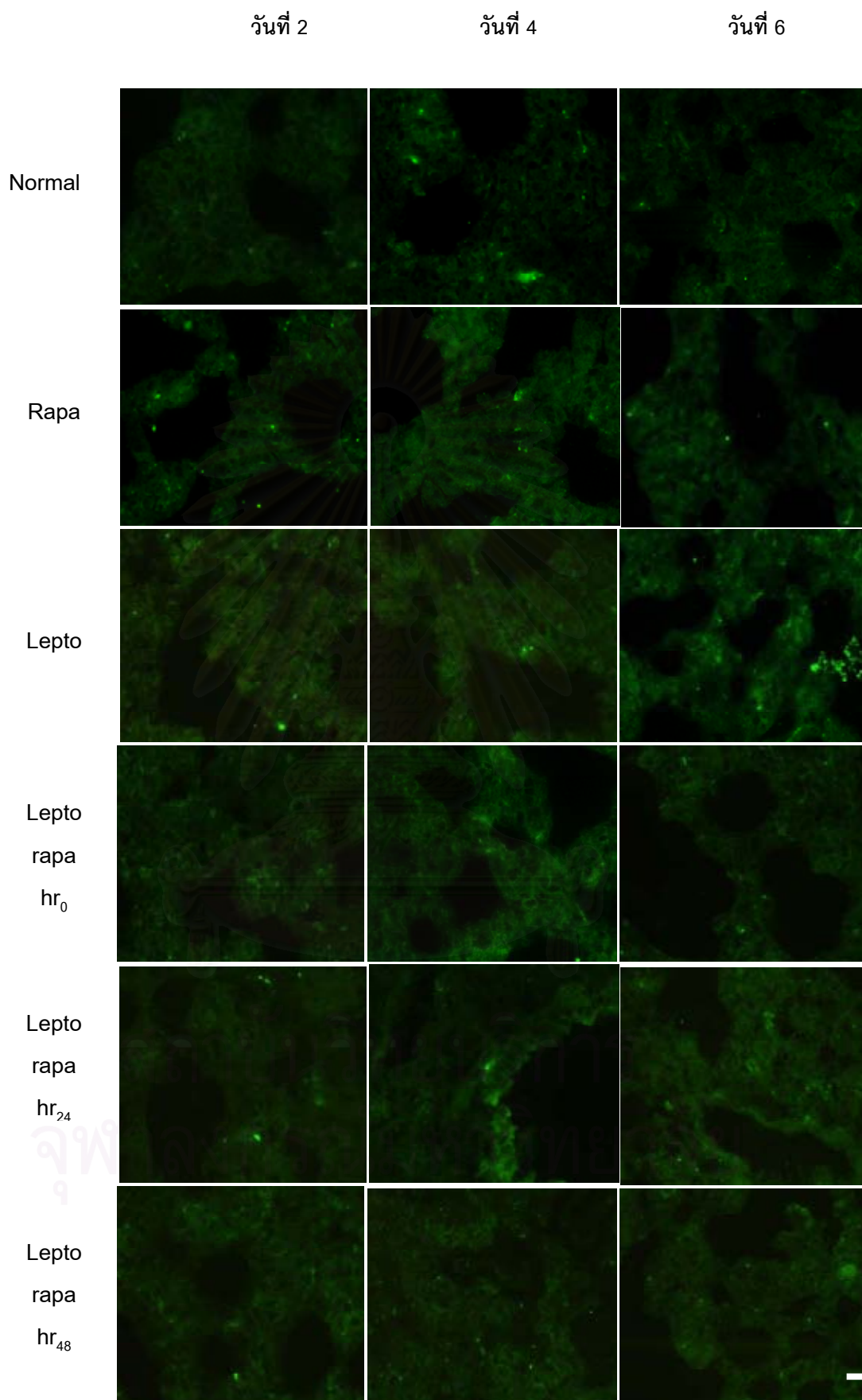
รูปที่ 57 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgG ในตับ ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m

4.7.3 ผลการตรวจการสะสมของ IgA ในปอด ไต และตับ

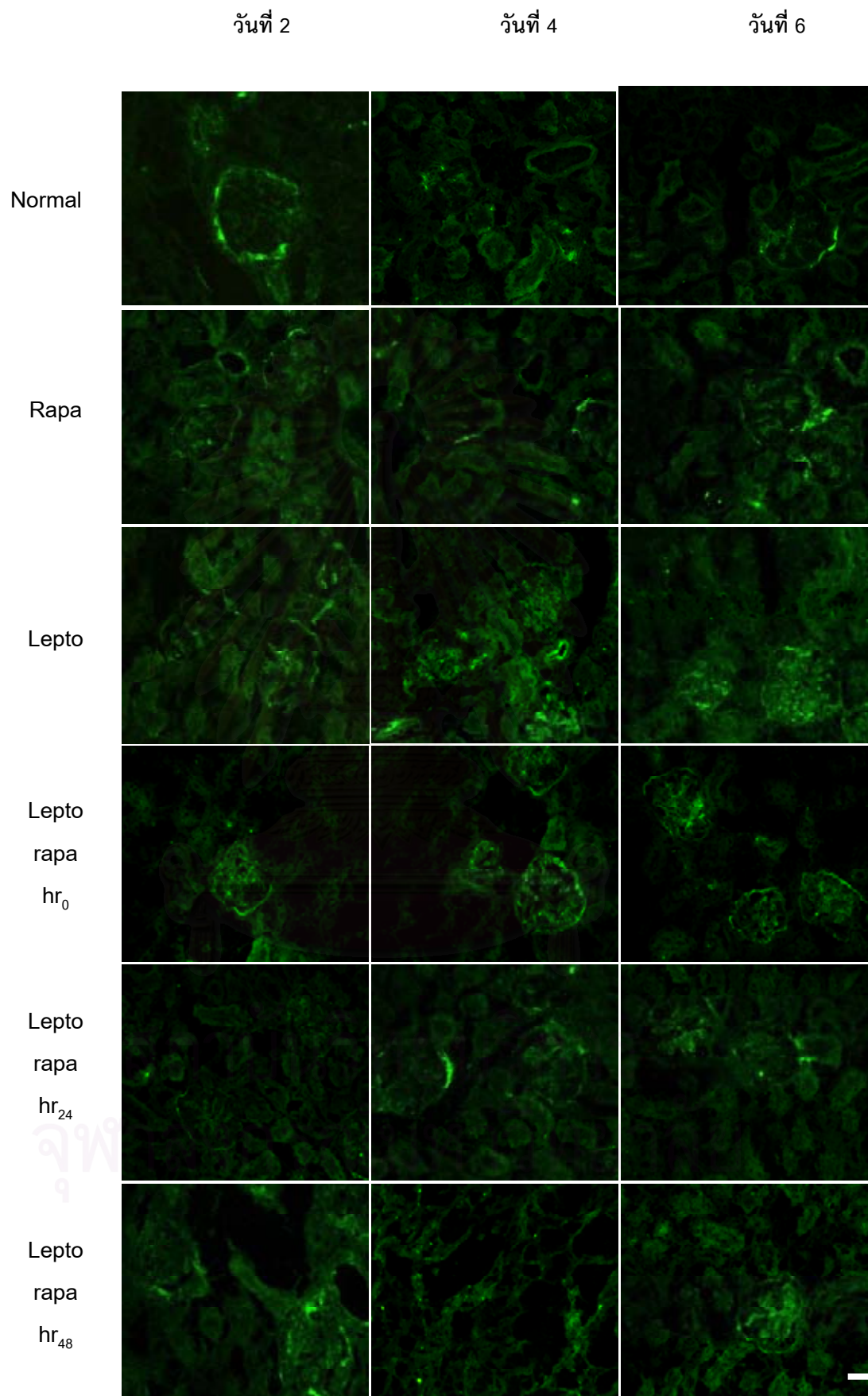
ทุกกลุ่มการทดลองไม่พบการสะสมของ IgA ที่ปอด แต่พบการสะสมของ IgA ปริมาณน้อยที่ไตในวันที่ 2 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ ในขณะที่พบการสะสมของ IgA ที่ตับ เฉพาะหนูตะเภาในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเท่านั้น โดยในกลุ่ม Lepto พบการสะสมของ IgA ปริมาณน้อยในวันที่ 2 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ และกลุ่มที่ได้รับยาร่วมด้วยทุกกลุ่มพบการสะสมของ IgA ปริมาณน้อยเฉพาะในวันที่ 6 (ตารางที่ 17 และรูปที่ 58-60)

ตารางที่ 17 แสดงผลการสะสมของ IgA ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT

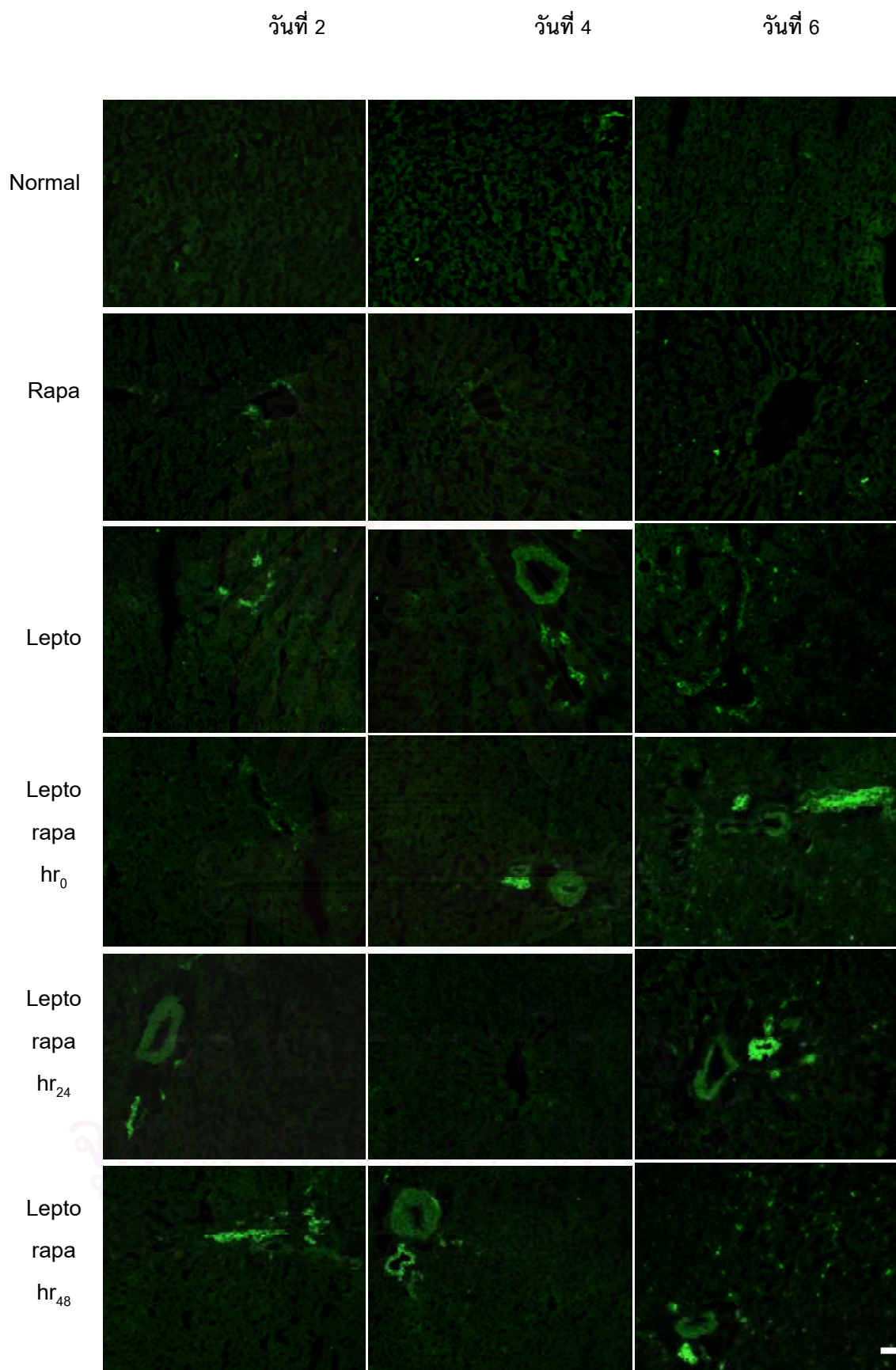
อวัยวะ	กลุ่มทดลอง (n=2)	คะแนนการย้อมติดสีเรืองแสงของ IgA ในเนื้อเยื่อ		
		วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
ปอด	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	0	0	0
	Lepto rapa hr ₀	0	0	0
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	0	0
ไต	Normal	+1	+1	+1
	Rapa	+1	+1	+1
	Lepto	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₀	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₄₈	+1	+1	+1
ตับ	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₀	0	0	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	+1
	Lepto rapa hr ₄₈	0	0	+1



รูปที่ 58 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในปอด ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



รูปที่ 59 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในไต ด้วยวิธี IFAT, bar = 20 μ m



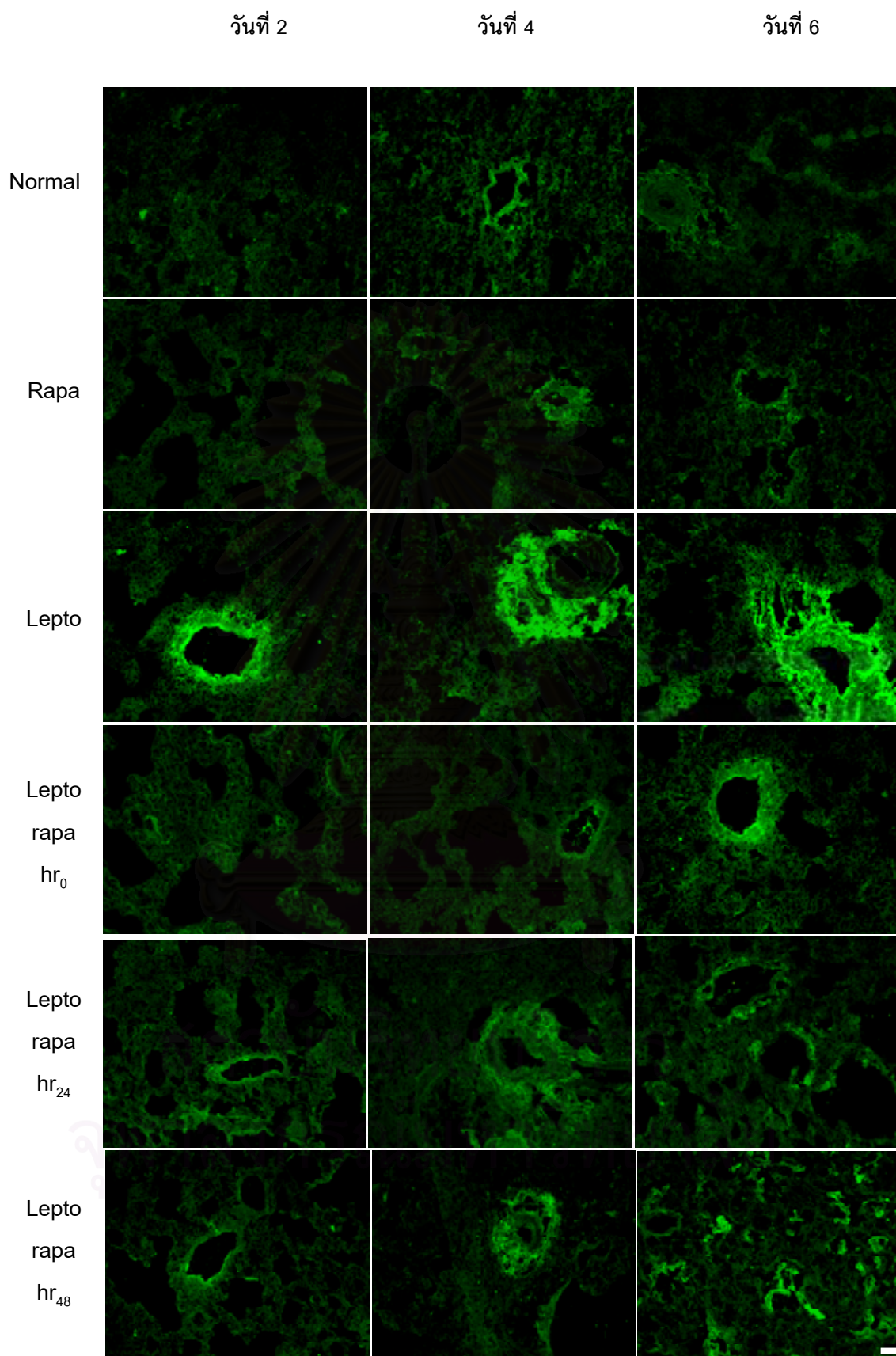
รูปที่ 60 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ IgA ในตับ ด้วยวิธี IFAT, bar = 50 μ m

4.7.4 ผลการตรวจการสะสมของ C3 ในปอด, ไต และตับ

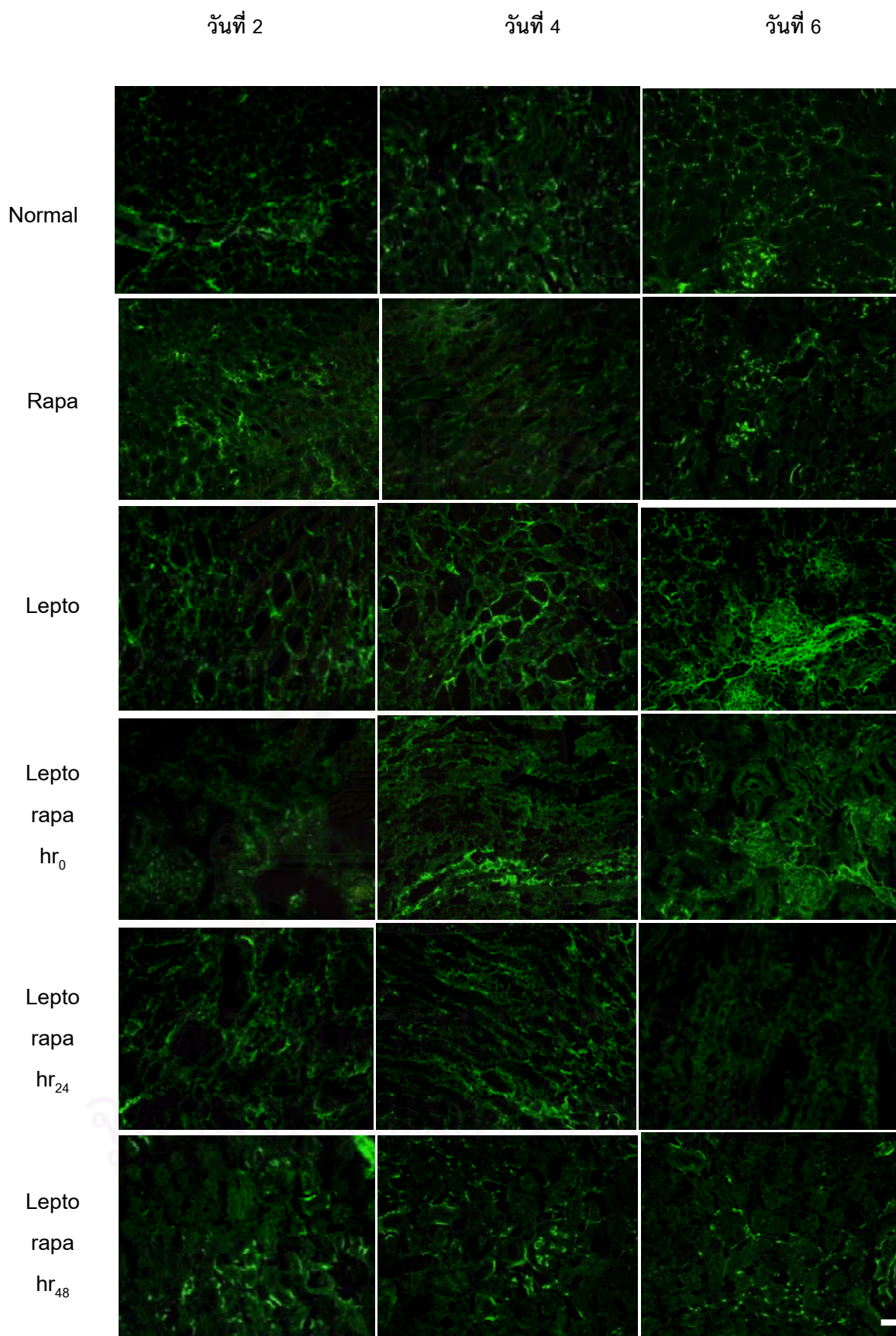
กลุ่ม Lepto สามารถตรวจพบการสะสมของ C3 ที่ปอดปานกลาง โดยพบที่ผนังถุงลม และรอบๆ หลอดเลือด ในวันที่ 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₄₈ พบการสะสมปริมาณน้อยในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อ และตรวจไม่พบการสะสมของ C3 ในกลุ่ม Normal Rapa และ Lepto rapa hr₂₄ สำหรับการสะสมของ C3 ที่ไต ตรวจพบปริมาณน้อยในทุกกลุ่มในวันที่ 2 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อ ส่วนการสะสมของ C3 ที่ตับ ตรวจพบปริมาณน้อยในทุกกลุ่มในวันที่ 2 4 และ 6 หลังฉีดเชื้อเช่นกัน ยกเว้นในกลุ่ม Normal ที่เริ่มพบเล็กน้อยในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อเท่านั้น (ตารางที่ 18 และรูปที่ 61-63)

ตารางที่ 18 แสดงผลการสะสมของ C3 ในปอด ไต และตับ ด้วยวิธี IFAT

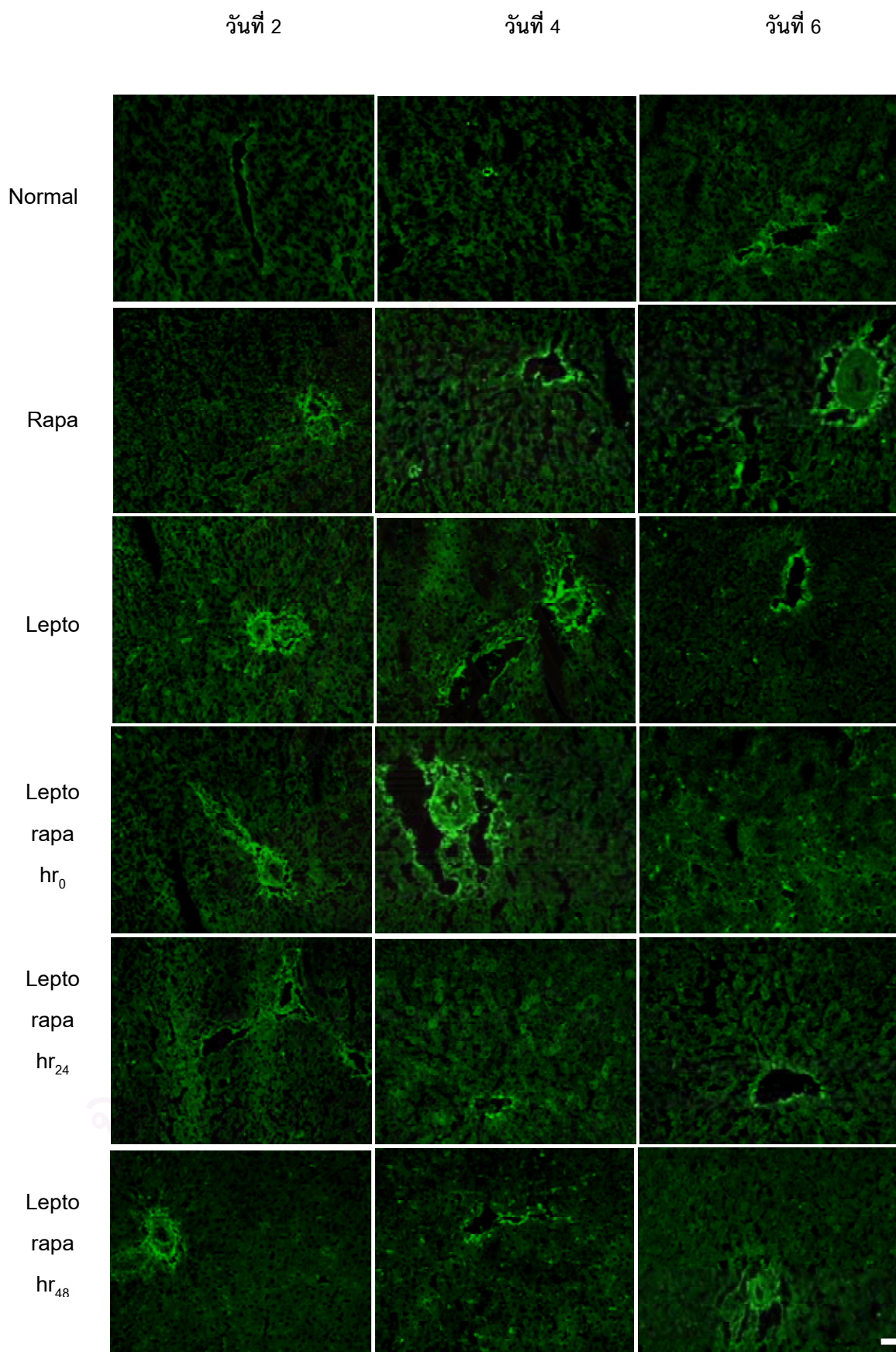
อวัยวะ	กลุ่มทดลอง (n=2)	คะแนนการย้อมติดสีเรืองแสงของ C3 ในเนื้อเยื่อ		
		วันที่ 2	วันที่ 4	วันที่ 6
ปอด	Normal	0	0	0
	Rapa	0	0	0
	Lepto	+1	+2	+2
	Lepto rapa hr ₀	0	0	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	0	0	0
	Lepto rapa hr ₄₈	0	+1	+1
ไต	Normal	+1	+1	+1
	Rapa	+1	0	+1
	Lepto	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₀	0	+1	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	+1	+1	0
	Lepto rapa hr ₄₈	+1	+1	+1
ตับ	Normal	0	0	+1
	Rapa	+1	+1	+1
	Lepto	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₀	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₂₄	+1	+1	+1
	Lepto rapa hr ₄₈	+1	+1	+1



รูปที่ 61 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในปอด ด้วยวิธี IFAT, bar = 50 μ m



รูปที่ 62 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในไต ด้วยวิธี IFAT, bar = 50 μ m



รูปที่ 63 แสดงผลการตรวจพบการสะสมของ C3 ในตับ ด้วยวิธี IFAT, bar = 50 μ m

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าหนูตะเภาในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราทั้งหมดได้แก่ กลุ่มที่ถูกฉีดเชื้ออย่างเดียว (Lepto) และกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราและได้รับการป้อนยารักษาไม่ขึ้น ทั้ง 3 กลุ่ม (Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈) เริ่มแสดงอาการป่วยที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่าหลังการฉีดเชื้อเลปโตสไปรา 4 วัน กล่าวคือ น้ำหนักตัวของหนูตะเภาในกลุ่มต่างๆ ดังกล่าวลดลง ในขณะที่น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มปกติ (Normal) และหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนยารักษาไม่ขึ้นอย่างเดียว (Rapa) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ ที่พบรอยโรคปื้นเลือดออก (patchy hemorrhage) ที่ผนังช่องท้อง พบจุดเลือดออกขนาดเล็ก (petechial hemorrhage) ที่ปอด และตับมีสีเหลือง (mild icterus) ในขณะที่หนูกลุ่ม Lepto พบจุดเลือดออกที่ปอด และผนังช่องท้องเช่นเดียวกับการศึกษาของทั้ง Nally และคณะ (2004) และ Ristow และคณะ (2007) แม้ว่าใช้เชื้อเลปโตสไปราต่างชนิดกัน โดยที่ Nally และคณะ (2004) ใช้ *L. interrogans* serovar copenhageni และ Ristow และคณะ (2007) ใช้ *L. interrogans* serovar Lai และความรุนแรงของรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ มีแนวโน้มมากขึ้น โดยในวันที่ 6 หลังฉีดเชื้อพบว่ากลุ่ม Lepto rapa hr₀, Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ เกิดปื้นเลือดออกอย่างรุนแรงมากขึ้นที่ผนังช่องท้อง และมีความรุนแรงมากกว่าในกลุ่ม Lepto รอยโรคที่ปอดพบจุดเลือดออกมากขึ้นในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมด โดยพบว่ากลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ พบจุดเลือดออกมากที่สุด รองลงมา ได้แก่กลุ่ม Lepto, Lepto rapa hr₀ และ Lepto rapa hr₂₄ ตามลำดับ และรอยโรคที่ตับของกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมด พบว่ามีสีเหลืองมากขึ้น (moderate to severe icterus) นอกจากนี้ในกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งหมด พบจุดเลือดออกที่ผิวของลำไส้ ในขณะที่กลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบรอยโรค

ในการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของปอดพบว่า กลุ่ม Normal และ Rapa ไม่พบรอยโรคตลอดการทดลอง ในขณะที่ตรวจพบรอยโรคได้ในทุกกลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราในวันที่ 2 หลังฉีดเชื้อ โดยพบว่ามีภารกิจเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลม ร่วมกับการหนาตัวของผนังถุงลม เนื่องจากมีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ ได้แก่ มาโครฟาจ, ลิมโฟไซต์ และนิวโทรฟิล ในวันที่ 4 หลังการฉีดเชื้อ รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปอดในแต่ละกลุ่มมีความรุนแรงมากขึ้น โดยกลุ่ม Lepto rapa hr₂₄ และ Lepto rapa hr₄₈ เกิดรอยโรคที่รุนแรงกว่ากลุ่ม Lepto และ Lepto rapa hr₀ กล่าวคือ ในสองกลุ่มแรกดังกล่าว พบภาวะเลือดออกทั้งที่ผนังถุงลม (interstitial

hemorrhage) และในถุงลม (alveolar hemorrhage) เป็นหย่อมๆ หลายหย่อม ในขณะที่ทั้งสองกลุ่มหลังไม่พบภาวะดังกล่าว ในวันที่ 6 หลังการฉีดเชื้อ กลุ่มที่ถูกฉีดเชื้อทั้งสี่กลุ่มพบการคั่งเลือดของเส้นเลือดฝอยของถุงลมอย่างเด่นชัด สามารถสังเกตเห็นการโป่งออกตรงตำแหน่งรอยต่อของเซลล์ผนังหลอดเลือดฝอยอย่างชัดเจน และเกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงที่ผนังถุงลม และในถุงลมเป็นบริเวณกว้างหลายๆบริเวณ อย่างไรก็ตามรอยโรคที่ปอดของกลุ่ม *Lepto rapa hr₄₈* มีความรุนแรงมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่ม *Lepto*, *Lepto rapa hr₀* และ *Lepto rapa hr₂₄* ตามลำดับ

ผลการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของตัดตลอดการทดลองพบว่า กลุ่ม *Normal* และ *Rapa* ไม่พบรอยโรค ในขณะที่กลุ่ม *Lepto rapa hr₄₈* และ *Lepto rapa hr₂₄* พบรอยโรคที่ตีบรุนแรงมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่ม *Lepto* และกลุ่ม *Lepto rapa hr₀* พบรอยโรคที่ตีบรุนแรงน้อยที่สุด กล่าวคือกลุ่ม *Lepto rapa hr₄₈* และ *Lepto rapa hr₂₄* พบการตายของเซลล์ตับมีลักษณะ pyknotic nuclei โดยพบเป็นหย่อมๆ หลายหย่อม (multifocal hepatocellular necrosis) ร่วมกับการพบการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ และหลอดเลือดแดง และการเกิดเนื้อตายของหลอดเลือด และเนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดนั้น ในขณะที่กลุ่ม *Lepto* พบการคั่งเลือดใน hepatic sinusoids อย่างรุนแรง ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ ส่วนกลุ่ม *Lepto rapa hr₀* พบเพียงการบวมของเซลล์ตับ ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดแดงเท่านั้น

ผลการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของตัดตลอดการทดลองพบว่า กลุ่ม *Normal* และ *Rapa* ไม่พบรอยโรค ในขณะที่กลุ่ม *Lepto* พบรอยโรคที่ตีบรุนแรงมากที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่ม *Lepto rapa hr₄₈*, *Lepto rapa hr₂₄* และ *Lepto rapa hr₀* ตามลำดับ กล่าวคือ ในขณะที่ในกลุ่ม *Lepto* พบการตายของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต พบเลือดออกทั้งรอบๆ หน่วยกรองไต และท่อไต ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต สำหรับกลุ่ม *Lepto rapa hr₂₄* และ *Lepto rapa hr₄₈* พบการคั่งเลือดของหลอดเลือดฝอยที่อยู่ระหว่างท่อไตส่วนต้น พบเลือดออกอย่างรุนแรงทั้งรอบๆ หน่วยกรองไต และท่อไต ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไต ส่วนกลุ่ม *Lepto rapa hr₀* พบเพียงภาวะเลือดออกที่ไตเล็กน้อย ร่วมกับการบวมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตเท่านั้น

ผลการวิเคราะห์หรือรอยโรคโดยรวมทั้งระดับมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา ที่ปอด ตับ และไต พบว่าหนูตะเภาในกลุ่ม *Lepto rapa hr₀* มีความรุนแรงของรอยโรคน้อยที่สุด ในขณะที่กลุ่ม *Lepto rapa hr₄₈* มีความรุนแรงของรอยโรคมากที่สุด สำหรับกลุ่มที่มีความรุนแรงมากรองลงมาได้แก่ กลุ่ม *Lepto* และ *Lepto rapa hr₂₄* ตามลำดับ ซึ่งอธิบายได้ว่าแม้ว่าเชื้อเลปโตสไปราจะสามารถกระตุ้นโมโนไซต์หลังไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบ และการติดเชื้อชนิดต่างๆ เช่น TNF- α และ IL-6 เป็นต้น ได้ตั้งแต่วินาที 6 ภายหลังจากฉีดเชื้อ (Dorigatti *et al.*, 2005)

โดยที่พบว่าปริมาณของ TNF- α ที่สูงมากสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคเลปโตสไปโรซิส และ อัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่สูงขึ้น (Tajiki and Salamao, 1996; Wagenaar *et al.*, 2007) และ IL-6 เป็นไซโตไคน์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสร้าง IgG, IgM และ IgA (Sehgal, 2003) ซึ่งเมื่อไซโตไคน์เหล่านี้ถูกยับยั้งการทำงานโดยฤทธิ์ของยารักษาไมซิน ซึ่งหนูตะเภาได้รับตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ภายหลังการฉีดเชื้อ หรือกล่าวอีกนัยคือ หนูได้รับยาก่อนที่จะมีการหลั่ง TNF- α และ IL-6 เป็นผลให้สามารถลดกระบวนการอักเสบ แต่อย่างไรก็ตามหนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₀ ยังคงพบรอยโรคต่างๆข้างต้น ในขณะที่กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ ได้รับยาภายหลังฉีดเชื้อ 2 วัน เป็นผลให้ไม่สามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นก่อน ทำให้หนูตะเภาในกลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เกิดรอยโรคที่รุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่น อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า หากมีเพียงบทบาทของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับรอยโรคที่เกิดขึ้นในอวัยวะต่างๆ กลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ น่าจะเกิดรอยโรคในลักษณะที่ใกล้เคียงกับกลุ่ม Lepto แต่จากการทดลองครั้งนี้พบว่ากลุ่ม Lepto rapa hr₄₈ เกิดรอยโรคที่รุนแรงกว่ากลุ่ม Lepto มาก

ในการศึกษาด้วยวิธี IFAT พบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายของหนูตะเภาที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปรา เนื่องจากพบการสะสม IgM, IgG และ C3 ที่ผนังถุงลม และในถุงลมของปอด และที่หน่วยกรองของไต สอดคล้องกับการศึกษาของ Nally คณะ (2004) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายดังกล่าว อาจเป็นผลทำให้เกิดภาวะเลือดออกที่ปอด (Abdulkader *et al.*, 2002; Nally *et al.*, 2004; Yang and Hsu, 2005) แต่ในการศึกษานี้ การให้ยารักษาไมซินซึ่งเป็นยากดภูมิคุ้มกัน แม้จะสามารถลดการสะสมของอิมมูโนโกลบูลินชนิดต่างๆดังกล่าวที่ผนังถุงลม และในถุงลมได้ แต่ยังคงพบการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรง โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับยาช้าที่สุด (Lepto rapa hr₄₈) สอดคล้องกับการศึกษาของ Viriyakosol และคณะ (2006) กล่าวคือ เมื่อทำการฉีดเชื้อ *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae แก่หนูถีบจักรชนิด C3H/HeJ (เป็นสัตว์ทดลองที่ไวต่อการติดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคเช่นเดียวกับหนูตะเภาที่ใช้ในการศึกษานี้) และหนูถีบจักรชนิด C3H/HeJ-SCID (เป็นหนูชนิด C3H/HeJ ที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายบกพร่องเนื่องจากขาดทั้งลิมโฟไซต์ ชนิดที และบี) เปรียบเทียบกับหนูชนิด C3H/Ouj (เป็นหนูถีบจักรชนิด wild-type) ผลการศึกษาพบว่าหนูชนิด C3H/HeJ-SCID ตายเร็วกว่าหนูชนิด C3H/HeJ และผลการชันสูตรซากพบว่าหนูชนิด C3H/HeJ และ C3H/HeJ-SCID เกิดรอยโรคต่างๆในลักษณะแบบเดียวกันคือ สภาพชากเหลือง (icterus) มีเลือดออกที่ปอด และม้ามโต ในขณะที่หนูชนิด C3H/Ouj ไม่แสดงอาการป่วยและตาย และไม่พบรอยโรคจากการชันสูตรซาก ซึ่งคณะผู้วิจัยสรุปว่า แม้จะกระทำให้เกิดความบกพร่องต่อการผลิตแอนติบอดี และ ลิมโฟไซต์ ชนิดที และบี ก็ไม่สามารถป้องกันการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดจากโรคเลปโตสไปโรซิสได้

การทดลองนี้พบว่าหนูตะเภาที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yang และคณะ (2006b) อย่างไรก็ตามหนูที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปรา และได้รับยารักษาไมซินในทุกกลุ่ม เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (severe thrombocytopenia) ความรุนแรงที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากยารักษาไมซิน เนื่องจากหนูตะเภาที่ได้รับยารักษาไมซินอย่างเดียวกัมีแนวโน้มของภาวะเกล็ดเลือดต่ำ แต่หนูตะเภาในกลุ่มนี้ไม่พบรอยโรคเลือดออกที่อวัยวะใดเลย ภาวะเกล็ดเลือดต่ำในโรคเลปโตสไปโรซิสในการศึกษาคั้งนี้ สอดคล้องกับรายงานผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มักพบภาวะเกล็ดเลือดต่ำร่วมด้วยเสมอ (Tantitanawat and Tanjatham, 2003; Yang *et al.*, 2006b; Dursun *et al.*, 2007; Wagenaar *et al.*, 2007, Chierakul *et al.*, 2008) ซึ่งกลไกการเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำในโรคนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม Yang และคณะ (2006b) อธิบายการเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำในหนูตะเภาที่ถูกฉีดเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคว่า อาจผลมาจากการไปอยู่รวมกันของเกล็ดเลือด (aggregation of platelets) และถูกเก็บกิน (phagocytosis) โดย Kupffer cell ในตับ นอกจากนี้พบว่าสาร lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นสารพิษจากผิวของตัวของเชื้อเลปโตสไปรา (outer membrane) สามารถลดการทำงานของไซกระดุกซึ่งเป็นอวัยวะที่สร้างเกล็ดเลือด (Faine *et al.*, 1999; Somers *et al.*, 2003)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาตัวเชื้อเลปโตสไปราในอวัยวะต่างๆ ด้วยการย้อมสีสไลด์ด้วยวิธี Warthin-Starry method และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบเชื้อในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ปอด ตับ และไต โดยพบเชื้อภายในเซลล์ ทั้งในเซลล์ตับ (hepatic parenchymal cell) และเซลล์เยื่อท่อไต (renal tubular cell) เป็นต้น เป็นที่น่าสังเกตว่าเซลล์เหล่านั้นส่วนใหญ่ไม่พบรอยโรค สอดคล้องกับการศึกษาของ Merian และคณะ (1998) บ่งชี้ว่ารอยโรคที่เกิดขึ้นไม่ได้เป็นผลมาจากการเคลื่อนที่ของตัวเชื้อ

เมื่อพิจารณาลำดับความรุนแรงของภาวะเลือดออกที่ปอด ตับ และไตจากมากไปน้อย พบว่าขณะที่ปอดเกิดภาวะเลือดออกที่รุนแรงมากที่สุด รองลงมาคือ ตับ และไตตามลำดับ แต่ในการศึกษานี้ตรวจพบตัวเชื้อเลปโตสไปราที่ไตและตับ มากกว่าที่ปอด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ (Nally *et al.*, 2004; Viriyakosol *et al.*, 2006) ผลจากการที่พบว่าปอดเกิดภาวะเลือดออกอย่างรุนแรงมากกว่าอวัยวะอื่นๆ ในขณะที่พบตัวเชื้อเลปโตสไปราค่อนข้างน้อยมาก อาจเป็นผลมาจากสารพิษที่ผลิตจากตัวเชื้อที่อยู่ในอวัยวะอื่นๆ แพร่กระจายในเลือด และไปมีผลที่ปอด (Dolhnikoff *et al.*, 2007) นอกจากนี้การพบการตายของเซลล์ตับ ที่มีการแทรกตัวของเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิล และลิมโฟไซต์รอบๆ หลอดเลือดดำ และหลอดเลือดแดง ร่วมกับการเกิดเนื้อตายของหลอดเลือด และเนื้อเยื่อรอบๆ หลอดเลือดนั้น สนับสนุนบทบาทของสารพิษจากเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคที่อวัยวะต่างๆ ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารพิษจากตัวเชื้อเลปโตสไปรามีหลายชนิด

ได้แก่ glycoproteins, hemolysin (Yang *et al.*, 2006b) และ lipopolysaccharides (Werts *et al.*, 2001; Nally *et al.*, 2005)

กล่าวโดยสรุป แม้ว่ายารักษาไม่ขึ้นสามารถลดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และลดรอยโรคที่ปอด ตับ และไตในหนูตะเภาได้ แต่หนูตะเภาต้องได้รับยาทันทีภายหลังการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม ยารักษาไม่ขึ้นไม่สามารถป้องกันการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดในโรคเลปโตสไปโรซิส และถ้าได้รับยาภายหลังการติดเชื้อ 48 ชั่วโมง ยามีผลทำให้เกิดรอยโรคที่อวัยวะต่างๆ ที่รุนแรงมากขึ้น และพบว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรงในโรคเลปโตสไปโรซิส

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้แม้ไม่สามารถหาวิธีการรักษา หรือบรรเทาภาวะเลือดออกในปอดแก่ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสได้ แต่บทสรุปของการศึกษานี้ช่วยสนับสนุนว่า การลดหรือการยับยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถบรรเทาภาวะเลือดออกในปอดได้ และจะเป็นอันตรายมากขึ้น หากทำการการลดหรือยับยั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วย การให้ยากดภูมิคุ้มกัน ในช่วงระยะติดเชื้อ

และแม้ว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง อาจไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่มีผลต่อการเกิดภาวะเลือดออกที่ปอดอย่างรุนแรงในโรคเลปโตสไปโรซิส แต่การศึกษาในอนาคตน่าจะทำการศึกษาผลของการรักษาภาวะเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง ด้วยการการเพิ่มเกล็ดเลือดหรือด้วยวิธีการใดใดว่ามีผลในการลดหรือบรรเทาภาวะเลือดออกที่ปอดได้หรือไม่ อย่างไร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ฐิติพงษ์ ยิ่งยง, ศศิธร ตีคำรัมย์, ปวีณา วงศ์สุวรรณค์ และคณะ. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 38, 48 (ธันวาคม 2550)
- ธีรศักดิ์ ชักนำ และ ประวิทย์ ชุมเกษียร. รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์. 38, 19 (พฤษภาคม 2550)

ภาษาอังกฤษ

- Abbas, K. A. and Lichtman, H. A. 2004. Immune response against tumors and transplant. In: Basic immunology : functions and disorders of the immune system. 2nd edition. Philadelphia: Saunder, pp. 190.
- Abdulkader, R.C., Daher, E.F., Camargo, E.D., Spinosa, C. and da Silva M.V. 2002. Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 44(2):79-83.
- Adler, B., Faine, S., Christopher, W. L. and Chappel, R. J. 1986. Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical material. Vet. Microbiol. 12(4):377-381.
- Arokianathan, D., Trower K., Pooboni, S., Sosnowski, A., Moss, P. and Thaker, H. 2005. Leptospirosis: a case report of a patient with pulmonary haemorrhage successfully managed with extra corporeal membrane oxygenation. J. Infect. 50(2):158-162.
- Bharti, R.A. , Nally, E.J., Ricaldi, N.J., Matthias, A.M., Diaz, M.M., Lovett, A.M., Levett, N.P., Gilman, R.H. , Willig, R.M. , Gotuzzo E. and Vinetz M. J. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet. 3(12):757-771.
- Borer, A., Metz, I., Gilad, J., Riesenber, K., Weksler, N., Weber, G., Alkan, M. and Horowitz, J. 1999. Massive pulmonary haemorrhage caused by leptospirosis successfully treated with nitric oxide inhalation and haemofiltration. J. Infect. 38(1):42-45.

- Broccard, F. A., Hotchkiss, J. R., Kuwayama, N., Olson, A. D., Jamal, S., Wangenstein, O. D. and Marini, J. J. 1998. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 157(6):1935–1942.
- Burth, P., Younes-Ibrahim, M., Gonzalez, F.H.F.S., Costa, E.R. and Faria, M.V.C. 1997. Purification and characterization of a Na⁺,K⁺ ATPase inhibitor found in an endotoxin of *Leptospira interrogans*. Infect. Immun. 65(4):1557-1560.
- Chantamaneechote, T., Kongkrong, C. and Ruchikuan, S. 2002. Demonstration of spirochetes by Warthin-Starry method using the microwave oven. Kaset. Vet. 12(3):10-16.
- Chen, L., Hallmark, T., Wieslander, J. and Bolton, K.W. 2003. Immunodominant epitopes of 23(IV)NC1 induce autoimmune glomerulonephritis in rats. Kidney Int. 64:2108-2120.
- Chierakul, W., Tientadakul, P., Suputtamongkol, Y., Wuthiekanun, V., Phimda, K., Limpaboon, R., Opartkiattikul, N., White, N.J., Peacock, S.J. and Day, N.P. 2008. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. Clin. Inf. Dis. 46(2):254-60.
- Clifford, H.D. 1984. Preanesthesia, anesthesia, analgesia, and euthanasia. In : Fox, G.J., Cohen, J.B. and Loew, M.F. (eds.) Laboratory animal medicine. Florida: Academic Press. pp. 527-562.
- Diament, D., Brunialti, M.K.C., Romeo, E.C., Kallas, E.G. and Salamao, R. 2002. Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. Infect. Immun. 70(4):1677-1683.
- Dolhnikoff, M., Mauad, T., Bethlem, E.P. and Carvalho C.R. 2007. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. Braz. J. Infect. Dis. 11(1):142-148.
- Dorigatti, F., Beunialti, M.K.C., Romero, E.C., Kallas, E.G. and Salomao, R. 2005. *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. Braz. J. Med. Biol. Res. 38: 909-914.

- Dursun, B., Bostan, F., Artac, M., Varan, H.I. and Suleymanlar, G. 2007. Severe pulmonary haemorrhage accompanying hepatorenal failure in fulminant leptospirosis. Int. J. Clin. Pract. 61(1):164-167.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C. and Perolat, P. 1999. Pathogenesis, virulence and immunity. In: Leptospira and Leptospirosis. 2nd edition. Medsci, Melbourne. pp. 82.
- Francischi, J.N., Conroy, D.M., Maghni, K. and Sirois, P. 1993. Inhibition by rapamycin of leucocyte migration and bronchial hyperreactivity induced by injection of sephadox beads to guinea pigs. Br. J. Pharmacol. 110(4):1381-1386.
- Hung, C.C., Chang, C.T., Tian, Y.C. Wu, M.S., Yu, C.C., Pan, M.J., Vandewalle, A. and Yang, C.W. 2006. Leptospiral membrane proteins stimulate pro-inflammatory cytokines secretion by renal tubule epithelial cells through toll-like receptor 2 and p38 mitogen activated protein kinase. Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official publication of the European Dialysis and Transplantation Association-European Renal Association. 21(4):898-910.
- Isogai, E., Isogai, H., Fujii, N. and Oguma, K. 1990. Biological effects of leptospiral lipopolysaccharide to mouse B, T and NK cells. Nippon Juigaku Zasshi. 52(5):923-930.
- Koizumi, N. and Watanabe, H. 2003. Identification of a novel antigen of pathogenic *Leptospira* spp. that reacted with convalescent mice sera. J. Med. Microbiol. 52:585-589.
- Laurent, P., Laurent, R., Veronique, B. and Bernard, L. 2003. Desmopressin therapy for massive hemoptysis associated with severe leptospirosis. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 167: 726-728.
- Levett, N.P. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14(2):296-326.
- Librizzi, L., Pastori, C., Grazia, U., Croci, D. and Curtis, M. 2005. Rapid *in vitro* elimination of anesthetic dose of thiopental in the isolated guinea pig brain. Neurosci. Lett. 380(1-2):66-69.
- Luna, L.G. 1994. Manual of Histologic Stainig Method of the Armed Force Institute of Pathology. 3rd edition. New York: McGraw-Hill, pp. 12-20, 32-45,153-154, 159-160, 203-204.

- Merien, F., Truccolo, J., Rougier, Y., Baranton, G. and Perolat, P. 1998. *In vivo* apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiol. Lett. 169:95-102.
- Molne, J., Breimer, E.M. and Svalander, T.C. 2005. Immunoperoxidase versus immunofluorescence in the assessment of human renal biopsies. Am. J. Kidney Dis. 45(4):674-683.
- Nally, J.E., Chantranuwat, C., Wu, X., Fishbein, M.C., Pereira, M.M., da Silva, J.J.P., Blanco, D.R. and Lovett, M.A. 2004. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. Am. J. Pathol. 163(4):1115-1127.
- Nally, J.E., Fishbein, M.C., Blanco, D.R. and Lovett, M.A. 2005. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. Infect. Immun. 73(10):7014-7017.
- National Academy Press. 1996. Guide for the care and use of laboratory animal. Washington, D.C.: National Academy Press, pp.1-79.
- Paganin, F., Bourdin, A., Dalban, C., Courtin, J.P., Poubeau, P., Borgherini, G., Michault, A., Sally, J.C., Tixier, F., Genin, R. and Arvin-Berod, C. 2007. Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): analysis of factors associated with severity in 147 confirmed cases. Intensive Care. Med. 33(11):1959-66.
- Panaphut, T., Domrongkitchaiporn, S. and Thinkompop, B. 2002. Prognostic factors of death in leptospirosis: a prospective cohort study in Khon Kaen, Thailand. Int. J. Infect. Dis. 6(1):52-59.
- Pappas, G. and Cascio, A. 2006. Optimal treatment of leptospirosis: queries and projections. Int. J. Antimicrob. Agents. 28:491-496.
- Pereira, M.M., Pereira da Silva, J.J., Pinto, M.A., Franca da Silva, M., Machado, M.P., Lenzi, H.L. and Marchevsky, R.S. 2005. Experimental leptospirosis in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*): a new model for studies of severe pulmonary leptospirosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72(1):13-20.
- Pilakasiri, K., Phulsuksombati, D., Muensoongnoen, J., Sangjun, N., Sripaoraya, K., Koedpuech, K. and Pilakasiri, C. 2001. A microanatomical study of the organs of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leptospira interrogans*, serovar

- pyrogenes which caused an outbreak in Thailand 1999. Siriraj Hosp. Gaz. 53(12):2001.
- Plank, R. and Dean, D. 2000. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. Microbes. Infect. 2(10):1265-1276.
- Ponticelli, C., Macdonald, A.S., Rajagopalan, P., Sindhi, R. and Mathew, T. 2001. Phase III trial of rapamycin versus placebo in primary renal allograft recipients. Transplant. Proc. 33(3):2271-2272.
- Praditpornsilpa, K., Sangjun, N., Kittikowit, W., Phulsuksombati, D., Avihingsanon, Y., Kansanabuch, T., Tungsanga, K. and Eiam-Ong, S. 2006. Alleviation of renal and pulmonary injury by immunomodulation in leptospirosis: hamster model. J. Med. Assoc. Thai. 89 (Suppl 2:S) 178-187.
- Ristow, P., Bourhy, P., McBride, F.W., Figueira, C.P., Huerre, M., Ave, P., Girons, I.S., Ko, A.I. and Picardeau, M. 2007. The OmpA-like protein loa22 is essential for leptospiral virulence. PLoS Pathog. 3(7):e97.
- Sehgal, S.N. 1998. Rapamune[®] (Rapa, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. Clin. Biochem. 31(5):335-340.
- Sehgal, S.N. 2003. Sirolimus: Its discovery, biological properties, and mechanism of action. Transplant. Proc. 35(3A):7S-14S.
- Somers, C.J., Al-Kindi, S., Montague, S., O'Connor, R., Murphy, P.G., Jeffers, M. and Enright, H. 2003. Erythroid hypoplasia associated with leptospirosis. J. Infect. 47(1):85-86.
- Spicher, A., Moock, M., Chapola, E.G. and Vinetz, J. 2005. Weil's Disease : An unusually fulminant presentation characterized by pulmonary hemorrhage and shock. Braz. J. Infect. Dis. 9(3):336-340.
- Suputtamongkol Y., Niwattayakul K., Suttinont C., Losuwanaluk K., Limpai boon R., Chierakul W., Wuthiekanun V., Triengrim S., Chenchittikul M. and White J. N. 2004. An open, randomized, controlled trial of penicillin, doxycycline, and cefotaxime for patients with severe leptospirosis. Clin. Infect. Dis. 39:1417-1424.

- Tajiki, H and Salomao, R. 1996. Association of plasma levels of tumor necrosis factor alpha with severity of disease and mortality among patients with leptospirosis. Clin Infect. Dis. 23(5):1177-1178.
- Tangkanakul, W., Smits, H.L., Jatanasen, S. and Ashford, D.A. 2005. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health. 36(2):281-288.
- Tantitanawat and Tanjatham, 2003. Prognostic factors associated with severe leptospirosis. J. Med. Assoc. Thai. 86(10):925-931.
- Thammakumpee, K., Silpapojukul, K. and Burrirak, B. 2005. Leptospirosis and its pulmonary complications. Respirology. 10(5):656-659.
- Truccolo, J., Charavay, F., Merien, F. and Perolat, P. 2002. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. Antimicrob. Agents Chemother. 46(3):848-853.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P. and Haake, D. 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. Int. Microbiol. 7(1):35-39.
- Vinetz, J.M. 2001. Leptospirosis. Curr Opin. Infect. Dis. 14:527-538.
- Viriyakosol, S., Matthias, M.A., Swancutt, M.A., Kirkland, T.N. and Vinetz, J.M. 2006. Toll-like receptor 4 protects against lethal *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae infection and contributes to *in vivo* control of leptospiral burden. Infect. Immun. 74(2):887-95.
- Visith, S. and Kearkiat, P. 2005. Nephropathy in leptospirosis. J. Postgrad. Med. 51(3):184-188.
- Wagenaar, J.F., Goris, M.G., Sakundarno, M.S., Gasem, M.H., Mairuhu, A.T., de Kruif, M.D., Ten Cate, H., Hartskeerl, R., Brandjes, D.P. and van Gorp, E.C. 2007. What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? Trop. Med. Int. Health. 12(1):111-22.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Kirschning, C.J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. 2001. Leptospiral

- lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat. Immunol. 2(4):346-52.
- Whitmore, A.C., Neely, H.R., Diz, R. and Flood, P.M. 2004. Rapid induction of splenic and peritoneal B-1a cells in adult mice by thymus-independent type-2 antigen. J. Immunol. 20: 5406-5414.
- Yang, C.W., Wu, M.S. and Pan, M.J. 2001. Leptospirosis renal disease. Nephrol. Dial. Transplant. 16(5):73-77.
- Yang, G.G. and Hsu, Y.H. 2005. Nitric oxide production and immunoglobulin deposition in leptospiral hemorrhagic respiratory failure. J. Formos. Med. Assoc. 104(10):759-763.
- Yang, C.W., Hang, C.C., Wu, M.S., Tian, Y.C., Chang C.T., Pan, M.J. and Vandewall, A. 2006a. Toll-like receptor 2 mediate early inflammation by leptospiral outer membrane protein in proximal tubule cells. Kidney International. 69(5):815-822.
- Yang, H.L., Jiang, X.C., Zhang, X.Y., LI, W.J., HU, B.Y., Zhao, G.P. and Guo X.K. 2006b. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. BMC Infect. Dis. 6:19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปรา EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris)

สารเคมี

1. Na_2HPO_4
2. KH_2PO_4
3. Glycerol
4. Bovine serum albumin fraction V (BSA)
5. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
7. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
8. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
9. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
10. Vitamin B 12 (cyanocobalamin)
11. Tween 80
12. Na-Pyruvate
13. Leptospira medium base EMJH
14. Agar Noble

การเตรียม Stock solution

1. การเตรียม Albumin fatty acid supplement stock solution

ตารางที่ 19 แสดงการเตรียมสารเคมีสำหรับ Albumin fatty acid supplement stock solution

สารเคมี	ปริมาณของสาร (กรัม) ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.3
Vitamin B 12	0.02
Tween 80	10.0

2.การเตรียม Basal medium stock solution

ตารางที่ 20 แสดงการเตรียมสารเคมีสำหรับ Basal medium stock solution

สารเคมี	ปริมาณของสาร (กรัม) ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
Na-Pyruvate	10.0
Glycerol	10.0

การเตรียมอาหาร EMJH ในขนาด 1,000 มิลลิลิตร

ก.วิธีการเตรียม Albumin fatty acid supplement 100 มิลลิลิตร

- ละลาย BSA 10 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer
- ค่อยๆเติม stock solution ต่อไปนี้

CaCl ₂ · 2H ₂ O + MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.50 มิลลิลิตร
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.00 มิลลิลิตร
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.10 มิลลิลิตร
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 กรัม
Vitamin B 12	1.00 มิลลิลิตร
Tween 80	12.50 มิลลิลิตร
- เมื่อสารต่างๆละลายสมบูรณ์แล้ว นำมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.4
- เติม 5-Fluorouracil (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) 1.00 มิลลิลิตร
- เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยแผ่นกรอง 0.45 ไมโครเมตร
- นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ข.วิธีการเตรียม Basal medium 900 มิลลิลิตร

- เตรียมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร
- เติมสารต่างๆดังนี้

Leptospira medium base EMJH	2.30 กรัม
Na-pyruvate	1.00 มิลลิลิตร
Glycerol	1.00 มิลลิลิตร

(กรณีเตรียมอาหารชนิดอาหารกึ่งแข็ง เติม Agar 2 กรัม แล้วต้มให้ละลาย)

3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7.4
4. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องนึ่งทำลายเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

ค.ผสม ก. และ ข. เขย่าเบาๆ ให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ง. แบ่งใส่หลอดเพาะเชื้อหลอดละ 5 มิลลิลิตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลาย developer สำหรับ Warthin-Starry method สารเคมี

1. Silver nitrate
2. Gelatin
3. Hydroquinone ($C_6H_6O_2$)
4. Citric acid

การเตรียม acidulated water

1. ละลาย Citric acid 0.5 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร
2. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 3.6-3.8

การเตรียมสารละลาย developer

สารละลาย developer ประกอบด้วย

1. สารละลาย 2% Silver nitrate 1.5 มิลลิลิตร
(silver nitrate 2 กรัม ละลายใน acidulated water 100 มิลลิลิตร)
2. สารละลาย 5% Gelatin 3.75 มิลลิลิตร
(Gelatin 5 กรัม ละลายใน acidulated water 100 มิลลิลิตร)
3. สารละลายไฮโดรควิโนน 0.15 % 2.0 มิลลิลิตร
(Hydroquinone 0.15 กรัม ละลายใน acidulated water 100 มิลลิลิตร)

ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 21 แสดงน้ำหนักตัวของหนูตะเภาในการทดลองครั้งที่ 1

กลุ่มทดลอง	ตัวที่	น้ำหนักตัว (กรัม)						
		วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
Normal	1	160	200	205				
	2	200	225	245	260	260		
	3	200	235	250	260	265	280	290
Rapa	1	185	185	170				
	2	215	225	230	220	230		
	3	225	240	235	235	235	240	250
Lepto	1	170	175	180				
	2	180	185	190	195	200		
	3	190	200	210	215	215	200	200
Lepto rapa hr ₀	1	205	200	200				
	2	195	210	210	200	195		
	3	195	200	200	200	190	185	180
Lepto rapa hr ₂₄	1	240	250	260				
	2	190	200	200	200	180		
	3	195	200	200	200	190	180	170
Lepto rapa hr ₄₈	1	210	220	230				
	2	190	195	200	210	190		
	3	200	210	220	205	200	180	170

ตารางที่ 22 แสดงน้ำหนักตัวของหนูตะเภาในการทดลองครั้งที่ 2

กลุ่มทดลอง	ตัวที่	น้ำหนักตัว (กรัม)						
		วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
Normal	1	160	200	205				
	2	200	225	245	260	260		
	3	200	235	250	260	265	280	290
Rapa	1	170	190	200				
	2	175	205	220	215	220		
	3	180	215	220	230	240	240	250
Lepto	1	180	200	210				
	2	180	200	215	210	230		
	3	205	220	230	235	250	230	230
Lepto rapa hr ₀	1	250	260	265				
	2	200	205	210	215	195		
	3	200	200	215	210	200	200	195
Lepto rapa hr ₂₄	1	240	240	250				
	2	200	220	245	240	230		
	3	210	240	250	240	245	240	225
Lepto rapa hr ₄₈	1	200	200	210				
	2	200	210	220	215	225		
	3	210	200	230	235	245	230	205

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

พ.ต. นพดล แสงจันทร์ เกิดวันที่ 31 มีนาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดพิษณุโลก เป็นบุตรของนายทวี แสงจันทร์ และนางจินตนา แสงจันทร์ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537 ปัจจุบันรับราชการทหาร สังกัดสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย