วิทยานิพนธ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวกับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโค

STUDY ON THE RELATION OF WHITE SPOTTED KIDNEYS AND LEPTOSPIRES INFECTION IN CATTLE

นางสาวดาวรุ่ง ศิลาอ่อน

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์	กายวิภาคศาสตร์
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวกับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโค

Study on the Relation of White Spotted Kidneys and Leptospires Infection in Cattle

นามผู้วิจัย นางสาวดาวรุ่ง ศิลาอ่อน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์สมชัย พงศ์จรรยากุล, Dip. in Vet. Pathology)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พราพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวกับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโค

Study on the Relation of White Spotted Kidneys and Leptospires Infection in Cattle

โดย

นางสาวดาวรุ่ง ศิลาอ่อน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)
พ.ศ. 2550

ดาวรุ่ง ศิลาอ่อน 2550: การศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวกับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโค ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขากายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สมชัย พงศ์จรรยากุล, Dip. in Vet. Pathology, F.R.V.C.S. 73 หน้า

เก็บตัวอย่างไตที่มีจุดขาว เลือด ซีรั่ม และปัสสาวะของโคจำนวน 26 ตัวอย่างจากโรงงานฆ่าสัตว์เพื่อตรวจทางพยาธิวิทยา, Microscopic agglutination test (MAT), ค่าโลหิตวิทยา และการเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires ผลการทดลองพบว่าไตของโคทุกตัวอย่างพบวิการ Chronic interstitial nephritis เมื่อย้อมสี Silver impregnation ไม่พบเชื้อ Spirochaetes อยู่ในเนื้อเยื่อไตทุกตัวอย่าง ผลการวิจัยระดับภูมิคุ้มกันโรคด้วยวิธี MAT พบภูมิคุ้มกันโรคต่อ Leptospires ที่ระดับ Titer 1:50 และ 1:100 จำนวน 16 (61.53%) ตัวอย่าง และไม่พบภูมิคุ้มกันโรคต่อ Leptospires จำนวน 10(38.47%) ตัวอย่าง ที่ระดับ Titer 1:50 จำนวน 15 ตัวอย่างมีภูมิคุ้มกันโรคต่อ *L.ranarum*, *L.shermani*, *L.sejroe*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.cynopteri* และ *L.mini* จำนวน 11, 7, 4, 3, 1, 1 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ ที่ระดับ Titer 1:100 จำนวน 7 ตัวอย่างมีภูมิคุ้มโรคต่อ *L.ranarum*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.shermani* และ *L.sejroe* จำนวน 4, 3, 3, 3 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อจาก 16 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (MAT) พบการเจริญของเชื้อ Leptospires 1 ตัวอย่าง ผลการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อ Leptospires (MAT) พบว่าจำนวนเม็ดเล็ดเลือดขาวสูงกว่าปกติ 10 ตัวอย่าง และจากการทำ Differential count พบว่าจำนวน Monocyte, Lymphocyte และ Neutrophil สูงกว่าปกติ 8, 7 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงว่าไตที่เกิดวิการจุดขาวไม่ได้ติดเชื้อ Leptospires เสมอไป อาจจะเกิดจากการติดเชื้อชนิดอื่น

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Dawrung Sila-on 2007: Study on the Relation of White Spotted Kidneys and Leptospires Infection in Cattle. Master of Science (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Associate Professor Somchai Pongjunyakul, Dip. in Vet. Pathology, F.R.V.C.S. 73 pages.

Samples of white spotted kidney, blood, serum and urine of 26 cattle from slaughter house were collected for Histopathological examination, Microscopic agglutination test (MAT), Hematological assay and Leptospiral culture. All kidney samples from 26 cattle were found chronic interstitial nephritis. Silver impregnation staining were negative in all samples. Microscopic agglutination test of serums at titer of 1:50 and 1:100 were positive to leptospires 16 (61.53%) samples and negative to leptospires 10(38.47%) samples. The 15 positive samples at titer 1:50 to *L.ranarum*, *L.shermani*, *L.sejroe*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.cynopteri* and *L.mini* were 11, 7, 4, 3, 1, 1 and 1 samples, respectively. The 7 samples at titer 1:100 to *L.ranarum*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.shermani* and *L.sejroe* were 4, 3, 3, 3 and 2 samples, respectively. Leptospiral culture of 16 samples with MAT positive were found leptospires in 1 samples. Hematological assay of MAT positive 10(62.5%) samples were found high white blood cell count. Differential count were found monocytosis, lymphocytosis and neutrophilia in 8, 7 and 7 samples, respectively. The result show that white spotted kidney did not always infected by leptospires but may be caused by other pathogens.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ สมชัย พงศ์จรรยากุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตรจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธีระศักดิ์ พราพงษ์ กรรมการวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิริวรรณ พราพงษ์ กรรมการวิชารอง และผู้ช่วยศาสตรจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ศิริชัย วงษ์นาค เพ็ชร์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.มลิวัลย์ ชุนถนอม ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ขอกราบขอบพระคุณคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากรวิทยาเขตสารสนเทศเพชบุรีที่ให้ทุนการศึกษาและให้โอกาสในการเรียนระดับปริญญาโท และขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาค ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และนักวิทยาศาสตร์ของภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ขอบพระคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆนิสิตปริญญาโทของภาควิชากายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยาที่คอยให้กำลังใจ ขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ และพี่สาวทั้งสองคนที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

ดาวรุ่ง ศิลาอ่อน

ตุลาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	28
ผล	28
วิจารณ์	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	44
สรุป	44
ข้อเสนอแนะ	44
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	56
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลักษณะที่แตกต่างของ *L.interrogans* และ *L.biflexa*	6
2	แสดง Genomospecies ของเชื้อ Leptospires	7
3	แสดงแหล่งรังโรคของเชื้อ Leptospires	8
4	แสดงปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงเชื้อ Leptospires	18
5	แสดงระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires จากการตรวจซีรั่มโคที่ไตเกิดวิการจุดขาวด้วยวิธี MAT	32
6	แสดงจำนวน Serovar จากซีรั่มของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires	33
7	แสดงจำนวนตัวอย่างที่พบการเจริญของเชื้อทั้งจากตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires	33
8	แสดงค่าเฉลี่ยและค่า SEM ของปริมาณเม็ดเลือดแดง, เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดของโคที่ซีรั่มมีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires	35
9	แสดงค่าเฉลี่ยและค่า SEM ของ HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ RDW ของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires	36
10	แสดงจำนวนโคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวน Lymphocyte, จำนวน Monocyte และจำนวน Neutrophil ที่เพิ่มขึ้น และปกติจากค่าอ้างอิงของเลือด	37

ตารางผนวกที่

1	แสดงการจำแนก Serovar ของแต่ละ Species ของเชื้อ Leptospires	58
2	ค่าอ้างอิงปกติของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดของโค	72
3	ค่าเม็ดเลือดขาวของโค	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของเชื้อ Leptospires	5
2	แสดงการติดต่อและการแพร่กระจายของเชื้อ	9
3	แสดงการแพร่กระจายเชื้อจากสัตว์สู่คน	10
4	แสดงการวินิจฉัยโรค leptospirosis ในห้องปฏิบัติการ	17
5	แสดงจำนวนผู้ป่วยในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515-2550สำรวจครั้งสุดท้ายเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม 2550	22
6	พบวิการจุดขาวที่ไต	28
7	บริเวณ Renal Cortex พบ Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium	29
8	เกิด Fibrosis (F) รอบ Bowman's capsule ทำให้ Bowman's capsule หนาขึ้นมี Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium	29
9	เกิด Glomerular Atrophy (GA) ทำให้ส่วน Urinary space กว้างขึ้น, เกิด Fibrosis (F) รอบๆ Bowman's capsule ทำให้ Bowman's capsule หนาขึ้น และมี Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ที่ Interstitium	30
10	เกิด Tubular Epithelial degeneration จนทำให้ Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium	30
11	แสดงเนื้อเยื่อไตที่ย้อมสีด้วย Silver impregnation	31
12	แสดงเชื้อ Leptospires ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยดูจาก Dark field microscope	34
13	แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires	36
14	แสดงค่าเฉลี่ยของ HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ RDW ของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มโรคกันต่อเชื้อ Leptospires	37

ภาพผนวกที่

1	แสดงการจำแนกเชื้อ Leptospires	57

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CAAT	=	Cross-agglutinin absorbtion test
ELISA	=	The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMJH	=	Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris
HCT	=	Haematocrit
HGB	=	Haemoglobin
LPS	=	Lipopojysaccharide
MAT	=	Microscopic Agglutination Test
MCH	=	Mean Corpuscular Haemoglobin
MCHC	=	Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration
MCV	=	Mean Corpuscular Volume
MPV	=	Mean Platelet Volume
PLT	=	Platelet
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
RBC	=	Red Blood Cell
WBC	=	White Blood Cell

การศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวกับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโค

Study on the Relation of White Spotted Kidneys and Leptospires Infection in Cattle

คำนำ

ในประเทศไทยมีการระบาดของโรค Leptospirosis มากในช่วงเดือนตุลาคม และพฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงที่มีน้ำขังหรือเกิดภาวะน้ำท่วม พื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรค Leptospirosis ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนใต้ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ เช่น บุรีรัมย์ มหาสารคาม สุรินทร์ หนองบัวลำภู อุดรธานี เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ พิษณุโลก กรุงเทพฯ อยุธยา ชัยนาท สระแก้ว กระบี่

โรค Leptospirosis เป็นโรคที่พบในสัตว์หลายชนิด เช่น หนู โค กระบือ สุกร สุนัข เป็นต้น คนเป็นโรค Leptospirosis ได้โดยการติดเชื้อที่อยู่ในปัสสาวะของสัตว์หรือแหล่งน้ำธรรมชาติ อาหารหรือสิ่งอื่นๆที่ปนเปื้อนเชื้อจากปัสสาวะสัตว์ เชื้อ Leptospires เข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่มีบาดแผล รอยถลอก ผิวหนังที่แช่น้ำนานๆ และเยื่อเมือก อาชีพที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ ได้แก่ เกษตรกร, สัตวแพทย์, กรรมกรที่ทำงานเกี่ยวกับสิ่งโสโครก, พนักงานในโรงฆ่าสัตว์, และกรรมกรในโรงงานปลา

อันตรายของโรค Leptospirosis คือเมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเพิ่มจำนวนในกระแสเลือด ต่อมาเชื้อจะกระจายไปทั่วร่างกายและสร้างความเสียหายให้กับอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตับ ปอด เยื่อหุ้มสมอง และไต เป็นต้น โดยเฉพาะในไตเชื้อจะสร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก ทำให้การทำงานของไตผิดปกติ และเกิดพยาธิสภาพที่เรียกว่าวิการจุดขาว (White spot) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆอีก เช่น โรคดีซ่าน โรคปอดอักเสบ ตับและไตวาย เยื่อหุ้มสมองอักเสบ เป็นต้น

นอกจากเชื้อ Leptospires แล้วยังมีแบคทีเรียและไวรัสชนิดอื่นอีกที่ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาว (White spot) เช่น *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Escherichia coli*, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), Porcine circovirus type 2 (PCV2) และ Porcine parvovirus (PPV) ดังนั้นจึงต้องการวิธีวินิจฉัยโรคที่รวดเร็วและแม่นยำเพื่อรักษาโรคได้ถูกวิธีและเฝ้าระวัง

ไม่ให้เกิดการระบาดไปยังพื้นที่อื่นของประเทศ ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรค Leptospirosis มีหลายวิธี ได้แก่ Histopathology, Microscopic agglutination test (MAT), การเพาะเลี้ยงเชื้อ และ Silver impregnation

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของไตที่เกิดวิการจุดขาว (White spot) กับการติดเชื้อเลปโตสไปร์ในโคโดยวิธี Histopathology, Microscopic agglutination test (MAT), การเพาะเลี้ยงเชื้อ, และ Silver impregnation

2. ศึกษาวิธีการต่างๆในการวินิจฉัยโรค Leptospirosis ด้วยวิธีการต่างๆข้างต้น

3. เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ Leptospires ในโคที่เกิดวิการจุดขาวในไต (White spot) เพื่อหาวิธีการเฝ้าระวังและป้องกันการระบาดของโรคจากสัตว์ไปสู่คน

การตรวจเอกสาร

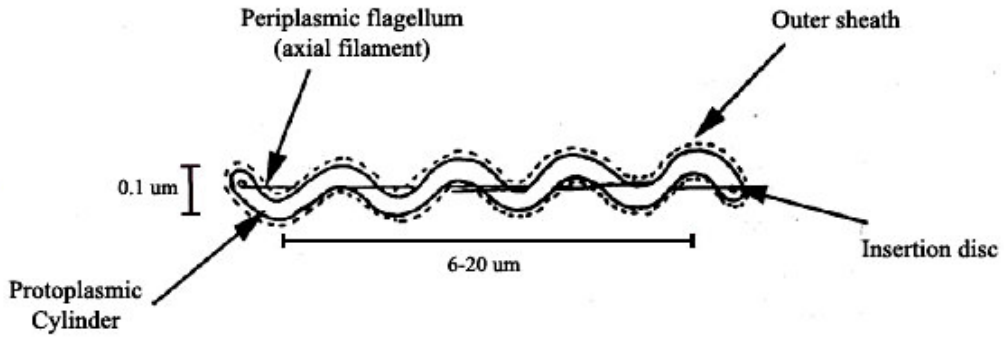
1. ลักษณะของเชื้อ (Morphology)

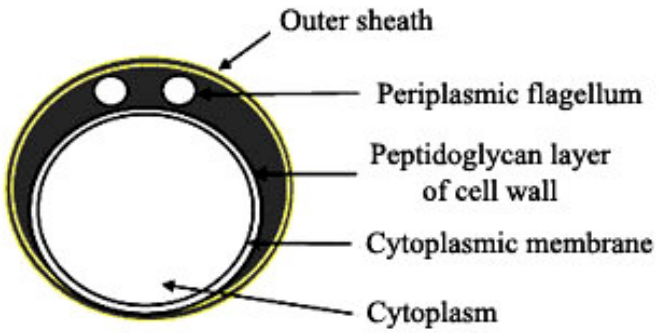
เชื้อ Leptospires เป็นแบคทีเรียชนิดสไปโรขีต (Spirochaete) มีลักษณะเป็นเกลียวบางแต่อาจจะพบเชื้อที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงได้ เชื้อมีขนาดกว้างประมาณ 0.1-0.15 ไมโครเมตร ยาว 6-20 ไมโครเมตร ความกว้างของแต่ละเกลียวประมาณ 0.5 ไมโครเมตร (Faine, 1982) แต่ถ้าเป็นเชื้อ Leptospires ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีโอกาสที่เชื้อจะมีความยาวมากขึ้น และรูปร่างของ Axial filament ไม่เป็นเกลียว (Bromley and Charon, 1979) บริเวณส่วนปลายจะมีขนาดบางกว่ากลางลำตัว และปลายทั้ง 2 ข้างหรือปลายข้างใดข้างหนึ่งจะโค้งหรืองอเป็นตะขอ (Alston and Broom, 1958; Quinn *et al.*, 1988; Levett, 2001)

เชื้อเคลื่อนไหวได้รวดเร็วโดยการหมุนรอบแกนกลาง (Spinning) หรือการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในทิศทางตรงหรือการเคลื่อนเป็นวงกลม (Goldstein and Charon, 1988) ส่วนเชื้อที่เป็นเส้นตรงจะหมุนและเคลื่อนไหวช้ากว่าเชื้อที่เป็นเกลียว ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งของเหลวเชื้อจะเคลื่อนที่แบบโค้งงอ (Timoney *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 1994; Bharti *et al.*, 2003)

เชื้อ Leptospires มีเยื่อหุ้ม 3 ชั้น ประกอบด้วย Outer sheath, Peptidoglycan และ Cytoplasmic membrane ซึ่งห่อหุ้มไซโตรพลาสซึม (Cytoplasm) ส่วนปลายเซลล์ทั้ง 2 ด้านจะมีแฟคเจลลา (Flagella) ที่ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ ดังภาพที่ 1 (Faine, 1982; Watt, 1997)

เชื้อ Leptospires สามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน โคลน แอ่งน้ำ ร่องน้ำ น้ำตก แม่น้ำลำคลองได้เป็นเวลานาน (มีรายงานพบเชื้อในน้ำท่วมขังนานถึง 6 เดือน) สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมกับการอยู่รอดของเชื้อคือ บริเวณที่เป็นร่มเงา, แสงแดดส่องไม่ถึง, pH 7.2-8.0 และอุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส แต่ที่ pH สูงกว่า 8.0 หรือต่ำกว่า 6.0 และอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสขึ้นไปเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะกับการอยู่รอดของเชื้อ รวมทั้งแสงแดด (อุลตราไวโอเล็ต) และความแห้งจะทำลายเชื้อได้อย่างรวดเร็ว (Faine, 1982; Watt, 1997)





ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างของเชื้อ Leptospires
ที่มา: Quinn *et al.* (1994)

2. การจัดแบ่งกลุ่มเชื้อ (Classification)

เชื้อ Leptospires อยู่ใน Phylum Spirochaetes, Class Spirochaetes และ Order Spirochaetales ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 Familles คือ Leptospiraceae และ Spirochaetaceae Family Leptospiraceaec แบ่งออกเป็น 3 genus คือ Leptonema, Turneria และ Leptospira

การจำแนกเชื้อทำได้ 2 วิธีคือ การจำแนกเชื้อโดยทางพันธุกรรมสามารถแบ่งเชื้อ Leptospires ได้ 16 ชนิด (Species) ซึ่งในเชื้อชนิดเดียวกันจะต้องมี DNA ที่สัมพันธ์กันอย่างน้อยที่สุด 70% และการจำแนกโดยการศึกษาทางซีโรโลยีโดยใช้ความสัมพันธ์ในการสร้าง Antigen เป็นตัวจัดจำแนก ซึ่งสามารถแบ่งเชื้อ Leptospires ได้ 2 ชนิดคือ *L. interrogans* เป็นเชื้อที่ก่อโรคและ *L.biflexa* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นอีกในการจำแนกเชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ การ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างของเชื้อใน 1M NaCl และการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Quinn *et al.*, 1994) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะที่แตกต่างของ *L.interrogans* และ *L.biflexa*

	L.interrogans	*L.biflexa*
ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ	+	-
การเจริญเติบโตของเชื้อที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส	-	+
การเจริญเติบโตของเชื้อที่ตัวยับยั้ง 8-azaguanine (225 mg-ml)	+	-
การเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของเซลล์ใน 1M NaCl	+	-

+ = positive, - = negative

ที่มา: Quinn *et al.* (1994)

2.1 การจัดจำแนกเชื้อโดยทางซีโรโลยี

ในการศึกษาทางซีโรโลยีพบว่าจีนัสของเชื้อ Leptospires ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ *L.interrogans* เป็นเชื้อที่ก่อโรคและ *L.biflexa* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรคซึ่งสามารถแยกได้จากแหล่งน้ำจืดและในดินที่ชุ่มชื้นธรรมชาติ เชื้อทั้งสองชนิดนี้ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นหลายๆ Serovar โดยใช้ Cross-agglutinin adsorbtion test (CAAT) (Timoney *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 1994; Levett, 2001; Bharti *et al.*, 2003) ทั้งเชื้อ *L.interrogans* และ *L.biflexa* แยกเป็น Serovar ได้เป็นจำนวนมาก ประกอบด้วยเชื้อ *L.biflexa* มีมากกว่า 60 Serovar และเชื้อ *L.interrogans* มีมากกว่า 200 Serovar (Timoney *et al.*, 1988; Levett, 2001)

2.2 การจำแนกเชื้อโดยทางพันธุกรรม

การจัดจำแนกเชื้อโดยวิธีการทาง PCR มีการพัฒนาเทคนิคเพื่อจำแนกเชื้อ Leptospires ในระดับ Serovar เช่น Chromosome restriction endonuclease, PCR amplication ของ 23S rRNA และ DNA fingerprinting (Marshall *et al.*, 1981; Corney *et al.*, 1997)

การใช้ DNA ในจำแนกเชื้อ Leptospires พบว่าเชื้อ Leptospires แบ่งออกเป็น 11 Species และ 5 Genomospecies ซึ่งประกอบด้วย *Leptospira interrogans, Leptospira borgpetersenii, Leptospira meyeri, Leptospira santarosai, Leptospira inadai, Leptospira noguchii, Leptospira weilii, Leptospira kirschneri, Leptospira fainei*, *Leptospira biflexa, Leptospira wolbachii*, *Leptospira genomospecies 1* (serovars pinagchang และ sichuan), *Leptospira genomospecies 2* หรือ *Leptospira alexanderi* (serovars lushui, manhao 3, manzhuang, nanding, mengla และ yunnan), *Leptospira genomospecies 3* (serovar holland), *Leptospira genomospecies 4* (serovar hualin) และ *Leptospira genomospecies 5* (serovar saopaulo) ดังตารางที่ 2 (Brenner *et al.*, 1999)

ตารางที่ 2 แสดง Genomospecies ของเชื้อ Leptospires

Pathogenic species	Saprophytic species
1. Leptospira interrogans	*1. Leptospira biflexa*
2. Leptospira borgpetersenii	*2. Leptospira wolbachii*
3. Leptospira meyeri	*3. Leptospira genomospecies 3*
4. Leptospira santarosai	
5. Leptospira inadai	
6. Leptospira noguchii	
7. Leptospira weilii	
8. Leptospira kirschneri	
9. Leptospira fainei	
10. Leptospira alexanderi *(Leptospira genomospecies 2)*	
11. Leptospira genomospecies 1	
12. Leptospira genomospecies 4	
13. Leptospira genomospecies 5	

ที่มา: Brenner *et al.* (1999)

3. แหล่งรังโรค

สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคของเชื้อแต่ละ Serovars เช่น หนู สุกร โค กระบือ สุนัขและ แรคคูน ดังตารางที่ 3 ส่วน Serovar ที่พบในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำยังไม่มีรายงานว่าสามารถแพร่มาสู่คนได้ สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค (Reservoir) อาจไม่แสดงอาการ แต่มีการติดเชื้อในท่อไต (Renal tubule) และสามารถปล่อยเชื้อมากับปัสสาวะ (Leptospiruria) ได้เป็นเวลานานหลายสัปดาห์ หลายเดือนหรือนานตลอดชีวิต ทำให้เกิดการติดต่อของโรค Leptisoirosis ในฝูงโดยการเลียกินปัสสาวะ การผสมพันธุ์ การสัมผัสปัสสาวะที่ปะปนมากับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีการแพร่กระจายเชื้อจากแม่ไปสู่ลูกโดยผ่านทางรกหรือขณะคลอดหรือทางน้ำนม (Timoney *et al.*, 1988; Faine, 1982; Watt, 1997)

ในสัตว์ชนิดหนึ่งเป็นพาหะนำโรคได้มากกว่า 1 Serovar และแพร่กระจายเชื้อให้กับสัตว์ชนิดอื่นได้ นอกจากนี้สัตว์ที่ตรวจพบเชื้อ Leptospires ซึ่งเป็น Serovar ที่จำเพาะในพื้นที่หนึ่ง แต่จะไม่พบ Serovar นี้ในต่างพื้นที่ เช่น วัวที่ตรวจพบ Serovar pomona อยู่ในของประเทศสหรัฐอเมริกา แต่จะไม่พบในประเทศนิวซีแลนด์ (Alston and Broom, 1958; Timoney *et al.*, 1988)

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งรังโรคของเชื้อ Leptospires

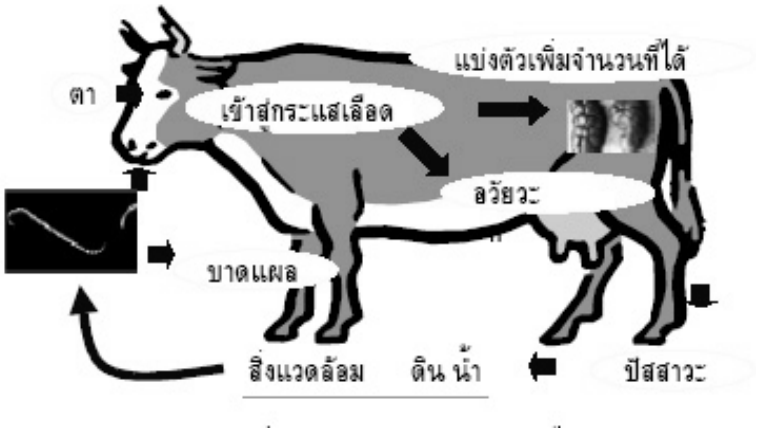
แหล่งรังโรค	Serovar
สุกร	pomona, tarassovi
วัว	hardjo, pomona
ม้า	bratislava
สุนัข	canicola
แกะ	hardjo
แรคคูน	grippotyphosa
หนู Rats	icterohaemorrhgiae, copenhageni
หนู Mice	ballum, arborea, bim
สัตว์ที่มีกระเป๋าหน้าท้อง	grippotyphosa
ค้างคาว	cynopteri, wolffi

ที่มา: Bharti *et al.* (2003)

4. การติดต่อของโรค

ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตอยู่ของเชื้อ คือ สภาพแวดล้อมที่ชุ่มชื้นและอากาศอบอุ่น เช่น บ่อน้ำ ทะเลสาบ เป็นต้น ซึ่งเชื้อที่ไม่ก่อโรคส่วนใหญ่จะอยู่ที่แหล่งน้ำ แต่ถ้าเป็นเชื้อที่ก่อโรคจะอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้ออยู่ในท่อไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Quinn *et al.*, 1994)

สัตว์ติดเชื้อจะปล่อยเชื้อออกมาปนเปื้อนมาอยู่ตามดินทราย น้ำ หรือพืชผัก จากนั้นคนและสัตว์ตัวอื่นติดเชื้อทางอ้อมจากการย่ำดินโคลน ลุยน้ำท่วมขังหรือว่ายน้ำ หรืออาจติดเชื้อโดยตรงจากการสัมผัสเชื้อในปัสสาวะสัตว์หรือเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อ หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนทำให้อวัยวะในร่างกายทำงานผิดปกติ ดังภาพที่ 2 นอกจากนี้เชื้ออาจจะเข้าสู่ร่างกายโดยการกินอาหารหรือน้ำ หรือการหายใจเอาละอองของเหลวที่ปนเปื้อนเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าโรค Leptospirosis ยังสามารถติดต่อจากคนสู่คนได้โดยผ่านทางน้ำนมแม่ที่ป่วยเป็นโรค Leptospirosis (Coghlan and Bain, 1969; Bolin and Koellner, 1988; Timoney *et al.*, 1988; Faine, 1982; Watt, 1997)

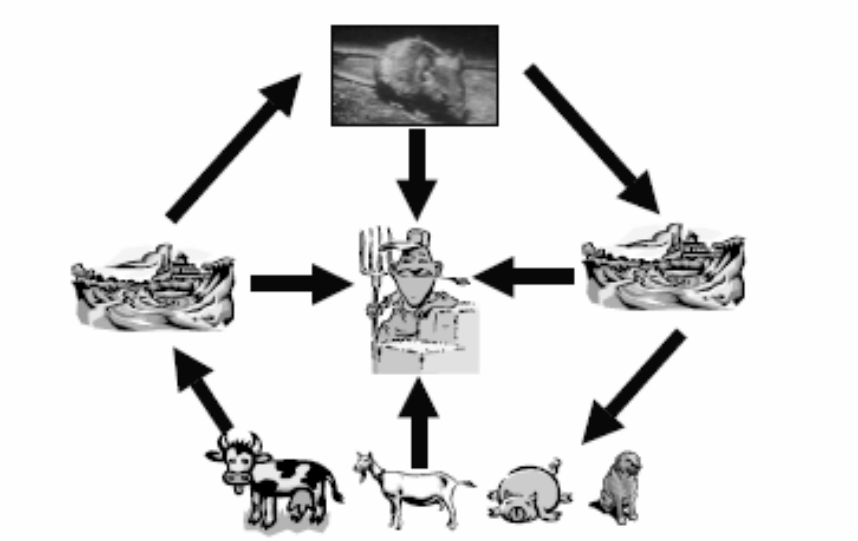


ภาพที่ 2 แสดงการติดต่อและการแพร่กระจายของเชื้อ
ที่มา: ดวงใจ (2548)

เชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (*L.biflexa*) หรือเชื้อที่ไม่รุนแรง (Avirulent leptospires) จะถูกทำลายโดยระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่เจาะจง (Non-specific immune) เช่น Opsonization และ

Phagocytosis ส่วนเชื้อที่รุนแรง (Virulent leptopsires) จะต้องใช้ภูมิคุ้มกันที่จำเพาะ (Specific immune) ในการทำลายเชื้อ ถ้าร่างกายมีภูมิคุ้มกันไม่เพียงพอจะทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายเข้าสู่อวัยวะต่างๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะที่ไตเป็นอวัยวะหลักที่เชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในท่อไต (Proximal convoluted tubule) โดยจะสร้างโคโลนีที่ผนังท่อไตและแบ่งจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเชื้อบางส่วนจะหลุดออกมาพร้อมกับปัสสาวะ (สุรศักดิ์, 2548)

การแพร่กระจายโรคจะเห็นว่าทั้งปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง และหนูสามารถเป็นตัวแพร่กระจายเชื้อได้ทั้งทางตรงคือจากการสัมผัสเชื้อที่ปนเปื้อนกับปัสสาวะ หรือทางอ้อมคือจากการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนปัสสาวะที่มีเชื้อ Leptospires ดังภาพที่ 3 (สุรศักดิ์, 2548)



ภาพที่ 3 แสดงการแพร่กระจายเชื้อจากสัตว์สู่คน
ที่มา: ดวงใจ (2548)

5. อาการของโรค

ลักษณะของโรคขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ภูมิคุ้มกันของร่างกาย ระยะเวลาในการติดเชื้อ อาการของโรคที่รุนแรงมักเกิดจากเชื้อ Leptospires Serovar Australis, Autumnalis, Bataviae, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Javanica หรือ Lai ซึ่งทำให้สัตว์เสียชีวิตได้ (ถ้าไม่ได้รับการรักษาให้ทันท่วงที) ผู้ป่วยมักมีอาการตัวเหลือง (Jaundice), Hemorrhage ที่ปอดและตับอ่อน, มี

โอกาสเกิดไตวายหรือตับวายสูง บางครั้งอาจจะมีการติดเชื้อที่เยื่อหุ้มสมอง (Meningitis) ในกรณีที่มีอาการไม่รุนแรงผู้ป่วยอาจมีไข้อยู่นาน 10-12 วัน มีอาการปวดกล้ามเนื้อ Serovar ที่ก่ออาการไม่รุนแรงได้แก่ Ballum, Hardjo, Grippothyphosa, Pomana และ Tarasovi (สุรศักดิ์, 2548; Daher *et al.*, 2003; Dolhnikoff *et al.*, 2007)

5.1. อาการของโรคในคน

อาการของคนไข้แต่ละรายนั้นจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเชื้อ อาการที่พบบ่อยได้แก่ ไข้เฉียบพลัน ปวดศรีษะรุนแรง หนาวสั่น ปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง (มักปวดที่น่อง โคนขา กล้ามเนื้อหลังและท้อง) ตาแดง อาจมีไข้ติดต่อกันหลายวันสลับกับไข้ลด มีผื่นที่เพดานปาก โลหิตจาง มีจุดเลือดออกตามผิวหนัง เยื่อเมือก ตับและไต เกิดโรคดีซ่าน และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ทำให้ผู้ป่วยแสดงอาการเพ้อ สับสน ซึม กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ อาจมีอาการทางระบบทางเดินหายใจ ไอมีเสมหะอาจมีเลือดปน และเจ็บหน้าอก (Faine, 1982; Watt, 1997)

โรค Leptospirosis แบบไม่เป็นดีซ่าน (Anicteric leptospirosis) เป็นการติดเชื้อ Leptospires ที่มีความรุนแรงน้อย ระยะแรกคือ การติดเชื้อในกระแสเลือดจะพบว่าผู้ป่วยมีไข้ หนาว ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ ปวดท้อง ส่วนระยะที่ 2 ผู้ป่วยมีไข้ ม่านตาอักเสบ ผิวหนังเป็นผื่น ปวดหัว และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ การเป็นไข้จะเกิดขึ้นทั้ง 2 ระยะ และเกิดขึ้นอีกครั้งหลังจากไข้ลด 3-4 วัน อาการปวดหัวจะเกิดขึ้นอย่างรุนแรงคล้ายกับเป็นโรคไข้เลือดออก (Faine, 1982)

โรค Leptospirosis แบบเป็นดีซ่าน (Icteric leptospirosis) มีระดับของ Bilirubin ในซีรั่มสูง และจะหายเป็นปกติได้ต้องใช้เวลาหลายสัปดาห์ โรค Leptospirosis แบบเป็นดีซ่านนี้เป็นสาเหตุของโรคไตวายอย่างฉับพลัน จำนวนเกล็ดเลือดลดลง (Levett, 2001; Yang *et al.*, 2006) Weil's syndrome เป็นกลุ่มอาการของโรค Leptospirosis ซึ่งพบวิการที่ตับและไต ทำให้ตับและไตทำงานผิดปกติ อาการไข้นั้นมีระยะเวลานานโดยไม่มีการส่างไข้ อัตราการตายอยู่ระหว่าง 5-10% (Arimitsu *et al.*, 1982; Feigin and Anderson, 1998) โรคดีซ่านเป็นลักษณะเฉพาะของ Weil's syndrome (Edwards and Domm, 1960; Arimitsu *et al.*, 1982)

5.2. อาการของโรคในสัตว์

5.2.1. การติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (Acute infection) อาการเริ่มแรกของสัตว์ทุกชนิดมักคล้ายคลึงกันและไม่มีลักษณะเฉพาะ ได้แก่ มีไข้อย่างเฉียบพลัน ซึม เบื่ออาหารและเยื่อบุตาอักเสบต่อมาอาการที่แสดงออกจะเป็นลักษณะเฉพาะของโรคนี้มากขึ้น เช่น อาการเลือดออกที่ปอด อาการดีซ่าน อาการทางระบบประสาทส่วนกลาง และอาการตับกับไตวาย ในโคนมตอนท้ายๆของระยะเฉียบพลันอาจพบอาการเต้านมอักเสบ (Mastitis) การตายคลอด (Stillbrith) หรือแท้งลูก (Faine, 1982; Lai *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1997; Watt, 1997; Ruhl-Fehlert *et al.*, 2000; Delbem *et al.*, 2002; Nally *et al.*, 2004)

5.2.2. การติดเชื้อแบบเรื้อรัง (Chronic infection) โดยทั่วไปพบการติดเชื้อในไต ซึ่งอาจพบในสัตว์ป่วยที่ผ่านพ้นระยะเฉียบพลันไปแล้ว โดยที่สัตว์อาจแสดงหรือไม่แสดงอาการให้เห็นก็ได้ ในระยะที่สัตว์เป็นพาหะ (Carrier) นั้น สัตว์จะปล่อยเชื้อออกมาพร้อมกับปัสสาวะ (Leptospiruria) เป็นระยะๆ และทำให้สัตว์อื่นติดเชื้อด้วย ในสัตว์ที่ไม่แสดงอาการหรือในสัตว์ที่เกิดภาวะไตอักเสบ (Nephritis) สามารถตรวจหาเชื้อ Leptospires ได้โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การที่สัตว์มีการปล่อยเชื้อ Leptospires ออกมาพร้อมกับปัสสาวะอาจตรวจดูเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดหรือโดยการเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH แต่อาจไม่พบเชื้อ Leptospires เสมอไป เนื่องจากสัตว์ไม่ได้ปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะตลอดเวลา ดังเช่น การเพาะแยกเชื้อ Leptospires จากเนื้อเยื่อไตของหนูแฮมสเตอร์พบการเจริญของเชื้อ *Leptospira interrogan* serovar autumnalis, grippotyphosa และ Pomona แต่เมื่อนำปัสสาวะมาเพาะแยกเชื้อกลับไม่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires เลย (Faine, 1982; Van den Ingh and Hartman, 1986; Venugopal and Ratnam, 1990; Oliva *et al.*, 1994; Adamus *et al.*, 1997; Watt, 1997)

6. กลไกการทำให้เกิดโรค

เมื่อเชื้อเข้าสู่ผิวหนังหรือเยื่อบุผิว เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดและแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย (Faine, 1956a; Faine, 1956b) การเกิดพยาธิสภาพที่ไตของโรค Leptospirosis เกิดจากเชื้อ Leptospires ทำลายหลอดเลือดที่ชั้น Cortex ของไต ซึ่งส่งผลให้การทำงานของท่อไตผิดปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเกิด Tubular degeneration ด้วย จนในที่สุดอาจทำให้เกิดไตวาย ยังผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิต ลักษณะอาการของผู้ป่วยมีได้หลายแบบขึ้นกับจำนวนหลอดเลือดที่ถูกทำลายในอวัยวะต่างๆของร่างกาย การทำลายหลอดเลือดในตับทำให้ผู้ป่วยมีตัวเหลือง เซลล์ตับตาย และตับวาย

ความรุนแรงของโรคในสัตว์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับอายุ เพศ อาหารสัตว์ ชนิดของสัตว์ ความสามารถในการตอบสนองของสัตว์ และชนิดของเชื้อ (Faine, 1956a) คนไข้ที่ตายด้วยโรค Leptospirosis จะตรวจพบอาการเลือดคั่งกระจายไปทั่วผิวหนัง และเยื่อเมือก อาการเลือดคั่งนี้เกิดจากเชื้อไชทะลุเส้นเลือดและทำลาย Endothelium

การปวดกล้ามเนื้อเป็นลักษณะของโรค Leptospirosis ในระยะแรก ซึ่งอาการปวดกล้ามเนื้อเกิดจากการที่เชื้อเคลื่อนตัวเข้าสู่กล้ามเนื้อ และกล้ามเนื้อเกิดพยาธิสภาพคือมีเลือดคั่งและ Myofibril สลายไปบางส่วนหรือทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด อาการปวดกล้ามเนื้อจะหายไป เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ Agglutinin (Laurain, 1955; Solbrig *et al.*, 1987)

การเกิดจุดเลือดออก (Petechial haemorrhages) ในอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายที่มีการติดเชื้อเป็นสิ่งที่พบได้บ่อยมาก โดยเฉพาะปอด, Omentum, Pericardium การเกิดเลือดออกที่ปอด (Pulmonary haemorrhage) มักพบในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *L.interrogans* Serovar Lai (สุรศักดิ์, 2548)

7. การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

กลไกในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อโรค Leptospirosis คือ Antibody ที่จำเพาะกับ Outer membrane ของเชื้อ Leptospires (Adler *et al.*, 1980) ลักษณะของ Immunoglobulins (Ig) และระดับ Ig อยู่ในร่างกายนั้นแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ แม้ว่าจะเป็นในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันก็แตกต่างกัน ภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นในระยะแรกคือ IgM จะพบได้ภายใน 7-20 วันภายหลังจากการติดเชื้อ ตามมาด้วย IgG ซึ่งจะป้องกันการเกิดโรคจากเชื้อที่เป็น Serovar เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน (Chapman *et al.*, 1988; Lupidi *et al.*, 1991)

ภูมิคุ้มกันไม่สามารถต่อต้านเชื้อต่าง Species กันได้ เช่น Serum ของคนไข้ที่ติดเชื้อ *L.icterrohaemorrhagiae* นำมาทดลองกับเชื้อ *L. copenhageni* ซึ่งอยู่ใน Serogroup เดียวกันและ *L.grippotyphosa* ซึ่งอยู่ต่าง Serogroup กันด้วยวิธี ELISA พบว่า Serum ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *L.copenhageni* ได้มากกว่า *L.grippotyphosa* (Terpstra *et al.*, 1985)

อัตราการทำลายเชื้อโดยอาศัย IgM และ Opsonization จะมีผลต่ออาการของโรคที่เกิดขึ้น ถ้าสัตว์ได้รับเชื้อเข้าไปมากร่างกายก็จะสร้าง Antibody ขึ้นเร็ว ถ้าคนที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติหรือไม่สมบูรณ์จะมีอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูงมาก (สุรศักดิ์, 2548)

ส่วน Outer sheath ของเชื้อ Leptospires ประกอบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นตัวชักนำให้ Lymphocyte เกิด Tumor Necrosis Factor (TNF)-α ส่งผลให้ Lymphocyte เกิด Apoptosis แล้ว Macrophage จะกลืนกิน (Phagocytosis) เชื้อ Leptospires

นอกจากนี้ LPS เป็นตัวกระตุ้นให้ B-cell เพิ่มจำนวนมากและชักนำให้ Tumor Necrosis Factor (TNF)- α เพิ่มขึ้นและจะลดลงทีละน้อยในเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากนั้น 3-6 ชั่วโมงพบปริมาณ Interleukin-6(IL-6) เพิ่มขึ้นนอกจากนี้ LPS เป็นตัวกลางทำให้ Polymorphonuclear cell (PMN) และ Platelet-Activating Factor (PAF) ยึดติดกันเกิดเป็น PMN-Platelet mixture (Levett, 2001)

เชื้อ Leptospires สามารถอยู่ในร่างกายได้ในบริเวณระบบภูมิคุ้มกันต้านทานของร่างกายไปไม่ถึง ซึ่งตำแหน่งที่พบว่ามีการแอบแฝงของเชื้อนี้อยู่บ่อยๆ คือที่ Renal tubule เมื่อมีการติดเชื้อมักพบเชื้อ Leptospires ที่ไตภายใน 2-4 สัปดาห์ ในสัตว์ที่ติดเชื้อสามารถปล่อยเชื้อออกมาพร้อมกับปัสสาวะได้เป็นช่วงๆ หรือตลอดเวลาเป็นระยะเวลาหลายเดือน หรือตลอดชีวิตของสัตว์ จำนวนเชื้อที่ถูกขับออกมาจะแตกต่างไปในสัตว์แต่ละชนิด อาจมีเชื้อที่ถูกขับออกมาเพียงเล็กน้อยจนถึง 108 ตัวต่อ 1 มล.ของปัสสาวะ ถ้ามีการขับเชื้อออกทางปัสสาวะเป็นเวลานานแสดงว่ามีการรวมกันของเชื้อในบริเวณ Renal tubule เมื่อผู้ป่วยอาการดีขึ้นก็จะไม่มีเชื้อขับออกมาในปัสสาวะ นอกจากไตแล้วยังมีอวัยวะอื่นๆที่พบว่าจะมีการติดเชื้อแอบแฝง เช่น สมองและตา เป็นต้น (สุรศักดิ์, 2548)

เชื้อ Leptospires จะถูกทำลายโดย Antibody จำเพาะต่อ LPS ที่อยู่บนเชื้อ Leptospires และ B cell ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อในสัตว์ด้วยเช่นกัน การติดเชื้อ Leptospires อาจจะเกิด Chronic inflammation ในไต เช่นในหมู, สุนัข หรือ หนูทดลอง แต่อย่างไรก็ตามไม่มีหลักฐานยืนยันว่าการตอบสนองแบบอาศัย Cell-mediated immunity เช่น Lymphocyte, Monocyte มีความสำคัญในการทำลายเชื้อมากกว่า Antibody ในไต (สุรศักดิ์, 2548)

8. การวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

กรณีที่ผู้ป่วยมีอาการไม่รุนแรง การตรวจสอบตามขั้นตอนต่างๆ (ภาพที่ 4) ทางห้องปฏิบัติการทำให้การวินิจฉัยโรค และการดูแลผู้ป่วยทำได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง ถ้าสามารถบอกชนิดของเชื้อ (Serovar หรืออย่างน้อย ซีโรกรุป) ได้ ก็จะช่วยในการป้องกันและควบคุมโรคในชุมชน (Babudieri, 1961; Terpstra *et al.*, 1998)

8.1 การตรวจหาแบคทีเรีย อาจตรวจหาเชื้อ Leptospires ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยการเก็บตัวอย่างเลือดภายใน 7 วัน ส่วนปัสสาวะหรือน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยควรเก็บในช่วงที่ป่วยได้ 10 วันเป็นต้นไป ถ้าตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (Dark field microscope) จะเห็นเชื้อเป็นเส้นเล็กๆ เคลื่อนที่เร็ว แต่วิธีนี้การอ่านผลอาจสับสนกับสิ่งแปลกปลอมที่ปะปนอยู่ การตรวจพบเชื้อด้วยวิธีนี้จะไม่ถือเป็นการยืนยันการวินิจฉัยโรค (Babudieri, 1961; Quinn *et al.*, 1994; Terpstra *et al.*, 1998; Levett, 2001; Brarti *et al.*, 2003)

การตรวจหาเชื้อก่อโรคในสิ่งที่ส่งตรวจโดยตรง (Direct examination) ด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืดมีข้อด้อยคือ ต้องการผู้ที่มีความชำนาญสูงในการดูกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด นอกจากนี้ยังมีวิธีในการตรวจหาเชื้อ Leptospires ที่ไวกว่าและดีกว่าวิธีแรกคือ Direct immunofluorescent แต่ก็ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญและกล้อง Fluorescent ซึ่งมีราคาแพง

8.2 การย้อมสี เช่น การย้อมด้วย Silver impregnation, Immunofluorescence, Immunoperoxidase, Immunogold เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อ (Timoney *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 1994; Levett, 2001) การย้อมสีด้วย Immunofluorescence คือการย้อมสีด้วย Antibody ที่จำเพาะกับ Serovar โดย Antibody จับกับสารเรืองแสงแล้วก็ไปจับ Antigen ทำให้ง่ายต่อการมองเห็น ถึงแม้ว่าจะมีเชื้อเพียงปริมาณน้อยก็สามารถตรวจหาเชื้อได้ (Miller *et al.*, 1989)การใช้เทคนิค Immunohistochemistry ในตอนแรกนั้นใช้การย้อมสีจากการ Smear เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (Tripathy and Hanson, 1974) ต่อมามีการพัฒนาโดยนำมาใช้ย้อมเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เนื้อเยื่อไตพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ Leptospires ได้ที่ Proximal convoluted tubule (Scanziani *et*

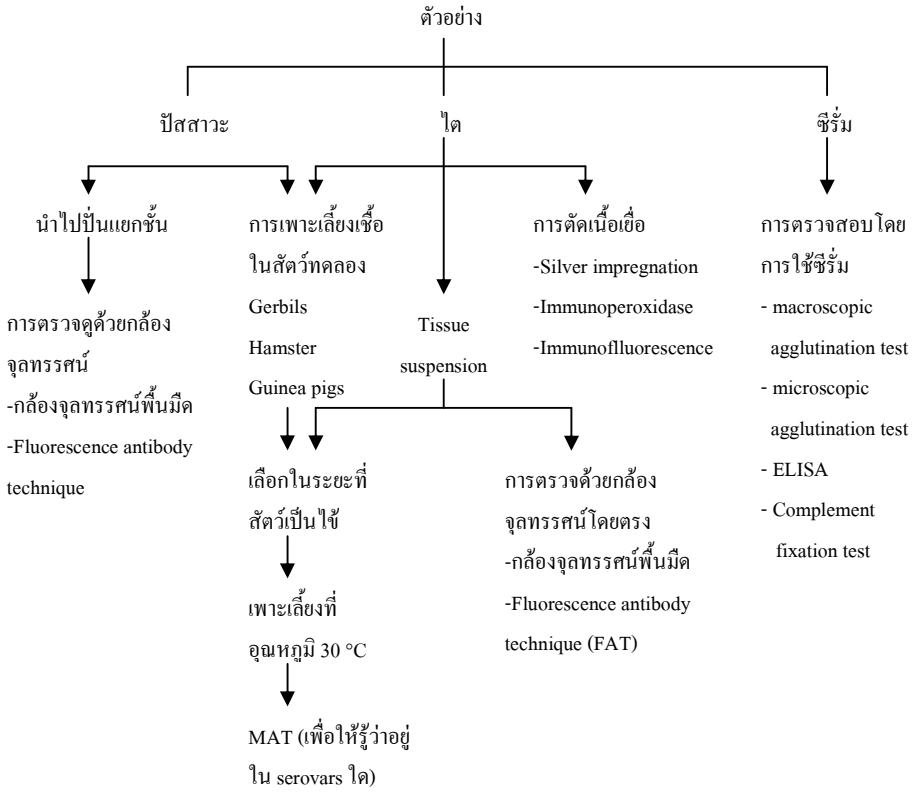
al., 1989; Yener and Keles, 2001; Colagross-Schouten *et al.*, 2002; Boqvist *et al.*, 2003; Rossetti *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาเชื้อ Leptospires ในตับ ปอดและมดลูกด้วย (Slee *et al.*, 1983; Alves *et al.*, 1987; Silva *et al.*, 2005)

Morison and Wright (1976) ได้ตรวจหาเชื้อ *Leptospira canicola* ในไตของสุนัขด้วยวิธี Immunohistochemistry พบ Antigen ของเชื้อ *Leptosira canicola* อยู่ที่ Proximal tubule, Interstritum และ Macrophage ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (Morrison and Wright, 1976)

8.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในสัตว์ทดลอง ใช้สำหรับการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อหรือ Body fluid ที่ปนเปื้อนไปด้วยเชื้อ โดยการนำเชื้อหรือสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ที่เป็นโรค Leptospirosis ไปฉีดสัตว์ทดลอง เช่น หนูแฮมสเตอร์ หนูตะเภา เป็นต้น การเลือกสัตว์ทดลองต้องคำนึงถึงธรรมชาติของเชื้อ การเกิดโรคในสัตว์ทดลองนั้นแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ การฉีดเชื้อเข้าสู่ร่างกายควรฉีดเข้าทาง เยื่อบุช่องท้อง และสามารถตรวจหาเชื้อได้จากเลือด ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง (Faine, 1982)

8.4 การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อ Leptospires โดยอาศัยเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งวิธีนี้ใช้ตรวจหาเชื้อ Leptospires ได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง เทคนิคนี้มีราคาแพงและต้องอาศัยนักวิทยาศาสตร์ที่มีความชำนาญสูง (Babudieri, 1961; Merien *et al.*, 1992; Terpstra *et al.*, 1998; Levett, 2001; Brarti *et al.*, 2003) การวินิจฉัยโรคด้วยวิธี PCR สามารถตรวจหาเชื้อ Leptospies ได้จากเลือด, ปัสสาวะ, Aqueous humor, Semen และ Cerebrospinal fluid (Van-Eys *et al.*, 1989; Bal *et al.*, 1994; Masri *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1998; Faber *et al.*, 2000; Fonsecaa *et al.*, 2006;)

ประโยชน์ของเทคนิค PCR คือใช้จำแนกเชื้อที่ก่อโรคกับเชื้อที่ไม่ก่อโรคได้ (Kee *et al.*, 1994) สามารถใช้วินิจฉัยโรคได้ทั้งในระยะที่กำลังพักฟื้นและระยะสุดท้ายของโรค Leptospirosis หรือใช้สำหรับการวินิจฉัยย้อนหลังได้และสามารถตรวจหาเชื้อได้ถึงแม้ว่าจะมีเชื้อจำนวนน้อย (Brown *et al.*, 1995)



ภาพที่ 4 แสดงการวินิจฉัยโรค leptospirosis ในห้องปฏิบัติการ
ที่มา: Quinn *et al.* (1994)

8.5. การเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากปศุสัตว์จะมีเชื้อก่อโรคปนออกมากับปัสสาวะเป็นเวลานานหลายสัปดาห์จนถึงหลายเดือนหรือตลอดชีวิต และพบเชื้อเป็นปริมาณมากหลายล้านตัวต่อปัสสาวะ 1 ซีซี

การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ (Bacterial isolation) ต้องใช้เวลานานเป็นสัปดาห์หรือเป็นเดือน ซึ่งมักไม่ช่วยในการรักษา ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องใช้ชนิดพิเศษและมีราคาแพง ผู้ปฏิบัติการต้องมีความชำนาญมาก นอกจากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังอาจเพาะเชื้อในสัตว์ทดลอง เช่น หนูแฮมสเตอร์ หนูตะเภาที่เพิ่งหย่านม เป็นต้น โดยฉีดสิ่งส่งตรวจเข้าช่องท้องของสัตว์ จะทำให้สัตว์ป่วยแล้วจึงนำน้ำในช่องท้องหรือเลือดไปตรวจหาตัวเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

การเก็บตัวอย่างตามเวลาที่เหมาะสม เช่น เลือดเก็บภายใน 7 วันหลังเริ่มป่วย หรือน้ำไขสันหลังระยะ 4-10 วันหลังเริ่มป่วย ถ้าเป็นปัสสาวะควรเก็บหลังจากเริ่มป่วย 10 วันเป็นต้นไป และต้องทำให้ปัสสาวะเป็นด่างก่อน การเพาะเลี้ยงเชื้ออาจทำในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษสำหรับเชื้อ Leptospires ได้แก่ EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) หรือ Fletcher semisolid medium

ตารางที่ 4 แสดงปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงเชื้อ Leptospires

ส่วนประกอบ	จุดประสงค์
Peptone	เป็นแหล่งโปรตีน
Asparagine	สามารถใช้แทน Peptone
Beef extract	เป็นแหล่งโปรตีน
Fatty acid	เชื้อจะเจริญเติบโตได้ขึ้นอยู่กับกรดไขมันใช้สำหรับการสร้างพลังงานและเป็นแหล่งคาร์บอน
Sodium-Pyruvate	เพื่อยกระดับการเจริญเติบโตในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อ
Glycerine	เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต
Salts	ความเข้มข้นของเกลือนั้นมีผลต่อการคงสภาพเนื้อเยื่อและการเจริญเติบโตของเซลล์
Ammonium	เป็นแหล่งไนโตเจนของเชื้อ
Rabbit serum	เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของซีรั่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึง 12% มีผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้น
5-Fluorouracil	Uracil เป็น Pyrimidine ซึ่งทำให้แบคทีเรียตายยกเว้นเชื้อ Leptospires

ที่มา: Quinn *et al.* (1994)

การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH และ Fletcher ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และ pH 6.8-7.4 พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH รวดเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Fletcher ที่มี Rabbit serum (8-10% v/v) ดังตารางที่ 4 (Babudieri, 1961; Terpstra *et al.*, 1998; Levett, 2001; Bhrarti *et al.*, 2003)

ซีรั่มหรือ Albumin, Polysorbate, Protein-free synthetic media serum, วิตามินบี 1 (Thiamine) และ 12 (Cyanocobalamin) เป็นปัจจัยที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อ Leptospires (Alston and Broom, 1958) ซึ่งโดยทั่วไปจะเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น Oleic acid-albumin medium (EMJH)

ดวงพร และคณะ (2542) ใช้การเพาะแยกเชื้อ Leptospiresในหลอดทดลองด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดกึ่งแข็ง สามารถแยกเชื้อ Leptospiresได้จากหนูพุกใหญ่ที่ดักจับได้จากพื้นที่ระบาดเท่านั้นส่วนในพื้นที่ที่ไม่มีการระบาดของโรคตรวจไม่พบเชื้อ Leptospires จากหนูชนิดใดๆ

Herr *et al.* (1982) แยกเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pomona ได้จากปัสสาวะวัวโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ที่เติม 5-fluorouracil ต่อมานำเชื้อที่แยกได้นี้ฉีดให้กับหนูแฮมสเตอร์ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ตับและไต

8.6 การทดสอบทางซีโรโลยี เป็นการตรวจหา Antibodyในซีรั่ม ซึ่งวิธีที่มีความจำเพาะและเชื่อถือได้พอสมควรคือ วิธี Microscopic agglutination test (MAT) ในการเตรียม MAT test ต้องมีเชื้อ Leptospires หลายๆ Strain เป็น Antigen ซึ่งในปัจจุบันได้มีการจัดตั้ง Reference laboratory กลางสำ หรับเตรียม Antigen มาตรฐานใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการทั่วโลก

การทดสอบทางซีโรโลยีทำได้ 2 วิธี คือ

8.6.1 Genus-specific test วิธีนี้บอกได้ว่าเป็นโรค Leptospirosis มีประโยชน์ในการใช้ตรวจกรอง (Screening test) แต่ไม่สามารถบอก Group หรือ Serovar ของ *L. interrogans* ได้ ได้แก่วิธี Macroscopic slide agglutination, Hemagglutination, Complement fixation test, ELISA, Immunofluorescent test, Latex agglutination test เป็นต้น

8.6.2 Group-specific test โดยวิธีนี้จะสามารถบอกได้ว่าติดเชื้อ *L.interrogans* serovar ใด วิธีที่ใช้คือ Microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลก (Faine, 1982)

ปัจจุบันห้องปฏิบัติการตรวจโรค Leptospirosis โดยวิธี MAT (Microscopic agglutination test) ได้ใช้ Antigen ซึ่งเป็นเชื้อ Leptospires จำนวน 24 serovars คือ *L.australis*, *L.autumnalis*, *L.ballum*, *L.bataviae*, *L.canicola*, *L.celledoni*, *L.cynopteri*, *L.djasiman*, *L.grippotyphosa*, *L.hebdomadis*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.javanica*, *L.louisiana*, *L.manhao*, *L.mini*, *L.panama*, *L.pomona*, *L.pyrogenes*, *L.ranarum*, *L.sarmin*, *L.sejroe*, *L.shermani*, *L.tarassovi* และ *L.patoc*

วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจเพื่อยืนยัน Serovar ของเชื้อ คือ Microscopic Agglutination Test (MAT) โดยเจาะเลือดครั้งแรก 6-7 วันหลังเริ่มป่วย และครั้งที่สองห่างจากครั้งแรกประมาณ 2 สัปดาห์โดยใช้ซีรั่มของคนไข้ทำปฏิกิริยากับ Antigen ของเชื้อ หลังจากนั้นก็เอาไปบ่มเพื่อให้ซีรั่มและ Antigen ผสมกันและเกิดการ Agglutination (Levett, 2001) ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลามาก เนื่องจากต้องใช้เชื้อ Leptospires หลาย Serovars

การแปรผลระดับ Antibody คือถ้าระดับ Antibody ต่ำกว่า 100 ให้ถือว่าสัตว์เคยติดเชื้อ Leptospires ในอดีต ส่วน Antibody ที่น่าจะบ่งบอกถึงการติดเชื้อในปัจจุบันคือในช่วงแรกระดับ Antibody จะอยู่ที่ 200-800 และหลังจากนั้น 1-2 สัปดาห์ ระดับ Antibody จะสูงขึ้นจากช่วงแรก ดังนั้นการวินิจฉัยเพื่อดูการติดเชื้อปัจจุบันต้องดูจากระดับ Antibody ที่เพิ่มขึ้นจากเดิม (สุรศักดิ์, 2548)

ในการทดสอบเชื้อกับซีรั่มจึงจำเป็นต้องมีการ Subculture เชื้อทุกสัปดาห์เพื่อไม่ให้เชื้อตาย (Bhrarti *et al.*, 2003; Babudieri, 1961; Terpstra *et al.*, 1998) วิธีนี้มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสอบมากว่าวิธีการอื่น เพื่อเป็นการชี้ให้เห็นว่าเชื้อ Leptospires นั้นอยู่ใน Serovar ใด (Bhrarti *et al.*, 2003) การทดสอบ Antibody ได้แก่ Microscopic agglutination test (MAT), an indirect hemagglutination assay (IHA), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ Indirect fluorescent antibody (IFA) (Bajani *et al.*, 2003)

9. ระบาดวิทยา

คนทุกเพศทุกวัยสามารถเป็นโรค Leptospirosis ได้ แต่จะพบในผู้ใหญ่มากกว่าเพราะมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อระหว่างการทำงานสูง กลุ่มอาชีพที่มีโอกาสติดเชื้อได้แก่ เกษตรกร สัตวแพทย์ คนตัดไม้ คนที่ทำงานในท่อระบายน้ำเสีย ในปศุสัตว์ และโรงฆ่าสัตว์ หรือบุคคลที่ได้สัมผัสกับสัตว์และ

น้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ การติดเชื้อ Leptospires นั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกๆเดือนของปี แต่จะพบบ่อยในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงของฤดู

จำนวนคนไข้มีความแปรผันปีต่อปี ซึ่งขึ้นอยู่กับเกิดฝนตก น้ำท่วม ความหนาแน่นของประชากรหนูและการติดเชื้อในสัตว์ โรคเลปโตสไปโรซิสเกิดการระบาดสูงกับกลุ่มคนที่แช่ในน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเป็นเวลานาน (Faine, 1982)

ถึงแม้ว่ามนุษย์ไม่ได้เป็นแหล่งของโรคแต่ก็สามารถปล่อยปัสสาวะที่ปนเปื้อนเชื้อ Leptospiresได้นานหลายสัปดาห์ หลายเดือน หรือมากกว่า 1 ปี และมนุษย์สามารถติดเชื้อได้จากการสัมผัสปัสสาวะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นพาหะนำโรคทั้งการสัมผัสโดยตรงและที่ปะปนมากับดินหรือน้ำ

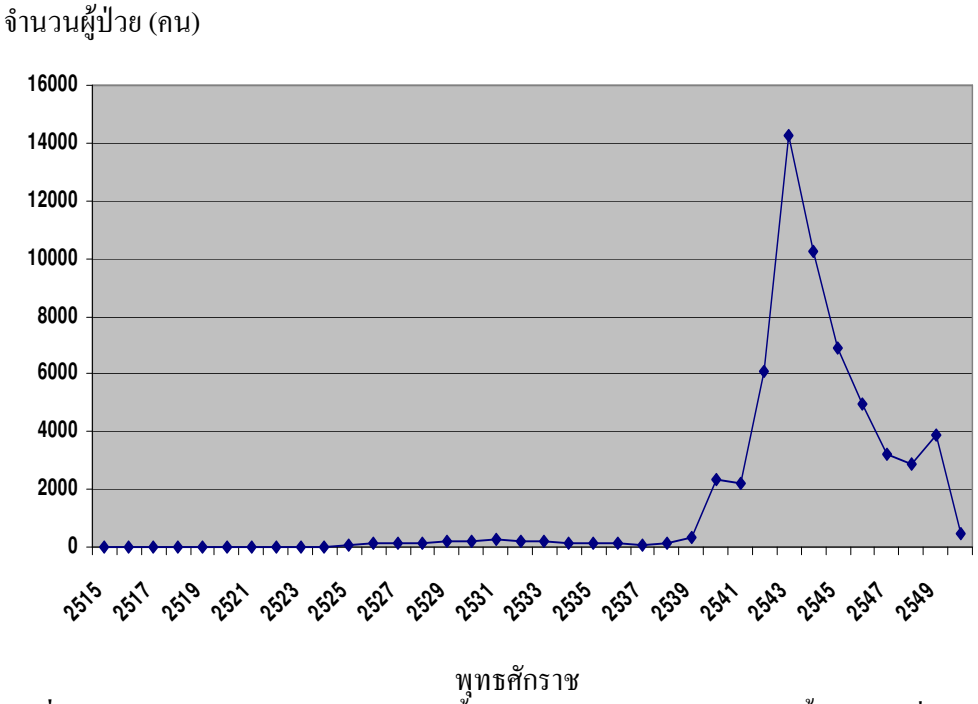
การระบาดของ Serovar ที่แตกต่างกันภายในประชากรมนุษย์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดสัตว์ที่เป็นพาหะ ชนิดของเชื้อที่อยู่ในสัตว์ที่เป็นพาหะนำโรค และสภาพแวดล้อม นอกจากนั้นสัตว์ที่เป็นพาหะหนึ่งชนิดสามารถมีเชื้อได้หลาย Serovar (Bhrarti *et al.*, 2003)

10. สถานการณ์โรค Leptospirosis ในประเทศไทย

ในประเทศไทยตรวจพบผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสครั้งแรกในปี พ.ศ.2486 ที่โรงพยาบาลศิริราช ตั้งแต่นั้นมาก็พบคนไข้หลายรายในหลายๆจังหวัด ระหว่างปี พ.ศ.2491-2493 พบคนไข้ 52 ราย เสียชีวิต 5 ราย ซึ่งเป็นสาเหตุมาจากเชื้อ Leptospires Serovar *L.bataviae, L.rachmati, L.icterohaemorrhagiae* และ *L.canicola* ในปี พ.ศ.2503 บริเวณภาคเหนือตอนล่างพบคนไข้ 20 ราย ติดเชื้อ Leptospires serovar *L.icterohaemorrhagiae, L.hebdomadis* และ*L.bataviae* ช่วงปี พ.ศ.2504–2505 จังหวัดเชียงใหม่พบคนไข้ 42 รายและสามารถแยก Serovar *เป็น L.icterohaemorrhagiae, L.hebdomadis* และ *L.autumnalis* ส่วนที่กรุงเทพฯพบ 54 ราย และแยก Serovar เป็น *L.icterohaemorrhagiae* และ *L.bataviae* ตั้งแต่นั้นมาก็พบว่ามีคนไข้ลดลงในทุกๆจังหวัด

ในปี พ.ศ.2539 พบคนไข้ 358 ราย ระหว่างปี พ.ศ. 2540-2543 นั้นมามีรายงานว่าพบคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสเพิ่มมากขึ้นจาก 2,334 รายเป็น 14,285 ราย ต่อมาพ.ศ. 2544-2548 พบคนไข้ที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสลดลงจาก 10,217 เป็น 2,868 ราย และในปี พ.ศ.2549 จำนวนคนไข้เพิ่มขึ้นเป็น 3,881 ราย ส่วนในปี พ.ศ. 2550 ซึ่งสำรวจครั้งสุดท้ายเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม มีจำนวนคนไข้ 448 ราย ซึ่งคนไข้ส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และคลุกคลีสัมผัสสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ทั้งสัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ โดยเฉพาะโคซึ่งเป็นแหล่งรังโรคและอาจมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อและการระบาดของโรค ดังภาพที่ 3 (สำนักระบาดวิทยา, 2550; Simon *et al*., 1999)

ในการสำรวจคนไข้ที่เป็นโรค Leptospirosis ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2545 ในโรงพยาบาลร้อยเอ็ด จ.ร้อยเอ็ด โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ และ MAT พบเชื้อ Leptospires serovar *L.bratislava, L.Autumnalis, L.New, L.Australis, L.Bangkok* และ *L.Ranarum* (Niwetpathomwat *et al*., 2005)



ภาพที่ 5 แสดงจำนวนผู้ป่วยในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2515-2550 สำรวจครั้งสุดท้ายเมื่อวันที่ 15 พฤษภาคม 2550

ที่มา: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospiresในประชากรหนูในจังหวัดที่มีการระบาด (บุรีรัมย์ สุรินทร์ ขอนแก่น กาฬสินธุ์) พบว่าอัตราการติดเชื้อ Leptospiresในหนู 7 ชนิด ได้แก่ หนูท่อ (*Rattus norvegicus*) ร้อยละ 36.7 หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) ร้อยละ 13.1 หนูนาเล็ก (*Rattus losea*) ร้อยละ 7.7 หนูท้องขาว (*Rattus rattus*) ร้อยละ 7.1 หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) ร้อยละ 6.2 หนูพุกเล็ก (*Bandicota savilei*) ร้อยละ 6.0 หนูจิ๊ด (*Rattus exulans*) ร้อยละ 1.0 (ดวงพร และคณะ, 2544)

ธรรมวรรณ และคณะ (2548) ได้สำรวจความชุกโรค Leptospirosis ของโคและกระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยวิธี MAT พบว่าโคมีอัตราการติดเชื้อ 23.7% และกระบือมีอัตราการติดเชื้อ 72.5%

ความรู้ การรับรู้ และความเชื่อเกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรซิสของชาวบ้านมีผลต่อการวางแผนป้องกันและควบคุมโรค ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ชาวบ้านมีความเชื่อเกี่ยวกับสาเหตุและการติดต่อของโรคไม่ถูกต้อง สังคมมีบทบาทต่อการปฏิบัติตัวของผู้ป่วย การให้ข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรซิสของรัฐที่ผ่านมายังไม่ทั่วถึง ขาดความต่อเนื่อง และยังคงใช้สื่อที่ไม่เหมาะสมกับชาวบ้าน (เสาวภาและคณะ, 2544)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัด
2. ขวดเก็บตัวอย่าง
3. อุปกรณ์ในการหล่อเนื้อเยื่อ
   3.1. เครื่องเตรียมเนื้อเยื่อแบบอัตโนมัติ (Automatic tissue processor)
   3.2. เครื่องหยอดพาราฟิน (Dispenser)
4. อุปกรณ์ในการตัดเนื้อเยื่อ
   4.1. เครื่อง Microtome
   4.2. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
5 อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเชื้อ
   5.1. อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดเหลว
   5.2. Phosphate buffer saline (PBS)
   5.3. ไซริงค์ปราศจากเชื้อ
   5.4. Autoclave
   5.5. Dark field microscopy
6 ตู้ดูดไอสารพิษ (Flume hood)
7 กล้องจุลทรรศน์
8 สีย้อม
   8.1. สีไรต์-จิมซา
   8.2. สี Hematoxylin
   8.3. สี Eosin
9. สารเคมี
   9.1. Formalin
   9.2. Paraffin
   9.3. Xylene
   9.4. Silver nitrate

วิธีการ

เก็บไตที่มีวิการจุดขาว (White spot) เลือด ซีรั่ม และปัสสาวะของโคจากโรงฆ่าสัตว์จำนวน 26 ตัว เพื่อตรวจหาการติดเชื้อ Leptospires ดังนี้

1. การศึกษาทางพยาธิวิทยา (Histopathological examination) โดยการย้อมสี Haematoxylin and Eosin และ Silver impregnation

นำชิ้นเนื้อไต Fixed ใน 10% Neutral buffer formalin เพื่อให้เนื้อเยื่อคงที่ประมาณ 24 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อมาล้างโดยเปิดน้ำปะปาไหลผ่านประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำไป Dehydration, Clearing, Wax Impregnation และ Embedding โดยใช้เครื่องมือ Automatic tissue processor นำบล็อกที่ได้มาตัดให้เป็นแผ่นบางโดยเครื่องไมโครโตม ให้เนื้อเยื่อมีความหนา 3-5 ไมครอน นำเนื้อเยื่อมาย้อมสี ดังนี้

1.1. Haematoxylin and Eosin

1.1.1 ล้างพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มใน Xylene แล้ว Hydration ด้วย 100%Alcohol, 95%Alcohol, 70%Alcohol และล้างด้วยน้ำประปา ตามลำดับ

1.1.2 จุ่มเนื้อเยื่อลงในสี Hematoxylin นาน 5-7 นาที แล้วใช้น้ำปะปาล้างสีส่วนเกินออกจนกระทั่งไม่มีสีละลายออกมากับน้ำ

1.1.3 ล้างสีส่วนเกินด้วย 1%Acid alcohol แล้วล้างน้ำ ต่อมาจุ่มลงในสารละลายอิ่มตัวของ Litium carbonate เพื่อทำให้เนื้อเยื่อเป็นกลาง แล้วล้างน้ำ

1.1.4 ย้อมสีซ้ำด้วย Eosin นาน 2-3 นาที

1.1.5 นำเนื้อเยื่อมา Dehydration, Clearing และ Mount (Drury and Wallington, 1967)

1.2. Silver impregnation

1.2.1.ล้างพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มใน Xylene แล้ว Hydration ด้วย 100%Alcohol, 95%Alcohol, 70%Alcohol และล้างด้วยน้ำประปา ตามลำดับ

1.2.2. แช่เนื้อเยื่อลงใน 1%Silver nitate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ระหว่างนั้นให้เตรียม Developer solution

1.2.3. แช่เนื้อเยื่อลงใน Developer solution ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทอง

1.2.4. ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แล้วแช่ลงใน Buffer solution

1.2.5. นำเนื้อเยื่อมา Dehydrate, Clearing และ Mount

1.2.6. ผลที่ได้คือ Spirochaete ติดสีดำ และเนื้อเยื่อโดยทั่วไปติดสีน้ำตาลเหลือง (Drury and Wallington, 1967)

2. Microscopic agglutination test (MAT)

นำเลือดจากโค 10 มิลลิลิตรปล่อยให้แข็ง นำมาปั่นเก็บส่วนซีรั่มแล้วนำมาเจือจางให้เป็น 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 ด้วย Phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นตรวจซีรั่มด้วยระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires โดยใช้เชื้อ Leptospires มาตรฐานทั้ง 24 Serovar ประกอบด้วย *L.australis*, *L.autumnalis*, *L.ballum*, *L.bataviae*, *L.canicola*, *L.celledoni*, *L.cynopteri*, *L.djasiman*, *L.grippotyphosa*, *L.hebdomadis*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.javanica*, *L.louisiana*, *L.manhao*, *L.mini*, *L.panama*, *L.pomona*, *L.pyrogenes*, *L.ranarum*, *L.sarmin*, *L.sejroe*, *L.shermani*, *L.tarassovi* และ *L.patoc* ใช้เชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 Serovar เป็น Antigen ทำปฏิกิริยากับ Antibody ในซีรั่มของสัตว์ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรซิสเกิดปฏิกิริยา Agglutination ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อ Leptospiresมีลักษณะเป็น Lysis ball หรือเห็นจับกลุ่มกันเป็นก้อนหรือจุด ซึ่งเป็น Gold standard test ขององค์การอนามัยโลก (Faine, 1982)

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Leptospiral Culture)

3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Ellinghausen and McCullough, modified by Johnson and Harris (EMJH) ที่เติม 5-fluorouracil

3.2 ใช้ไซริงค์ปราศจากเชื้อขนาด 3 มิลลิลิตรดูดน้ำปัสสาวะจากกระเพาะปัสสาวะ แล้วหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดเหลว 2-4 หยด

3.3 ส่วนเนื้อเยื่อไตแบ่งออกเป็น 2 ชิ้นคือ ชิ้นแรกตัดชิ้นไตขนาด 1 ลบ.ซม. ลงในหลอดทดลอง ชิ้นที่สอง นำชิ้นไตมาบดแล้วเติมสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS) หยอดสารละลายของเนื้อเยื่อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH ชนิดเหลว 2-4 หยด

3.4 หลังจากนั้นนำหลอดบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสในที่มืด ตรวจหาเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืดทุกวันในสัปดาห์ที่ 1 และหลังจากนั้นตรวจทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และตรวจทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลาอีก 2 เดือน เมื่อไม่พบเชื้อจึงมั่นใจได้ว่าเป็นผลลบ (Mayer, 1985)

4. การตรวจวิเคราะห์เลือด (Hematological assay)

4.1 นำเลือดที่ได้มาเข้าเครื่อง Automatic Hematological Analyzer (Cell Dyn 3500, Abbot®) เพื่อตรวจวัดค่า Wbc, Rbc, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW และ PLT

4.2 นำเลือดมาสเมียร์บนแผ่นสไลด์ แล้วนำสไลด์มาคงสภาพเม็ดเลือดโดยการใช้ 100% เมทิลแอลกอฮอล์นาน 3 นาที ย้อมสีด้วยสี Wright-Giemsa นาน 6-7 นาที นำมาแช่ในบัฟเฟอร์นาน 3 นาที ล้างด้วยน้ำปะปาเบาๆเพื่อเอาสีส่วนเกินออก แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง ตรวจแยกนับจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว (Differential count) แต่ละชนิดด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Drury and Wallington, 1967)

4.3 วิเคราะห์ค่าเลือดโดยการเปรียบเทียบค่าเลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (MAT positive) และโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (MAT negative) โดยการใช้ t-test ด้วยโปรแกรม SPSS®15

ผลและวิจารณ์

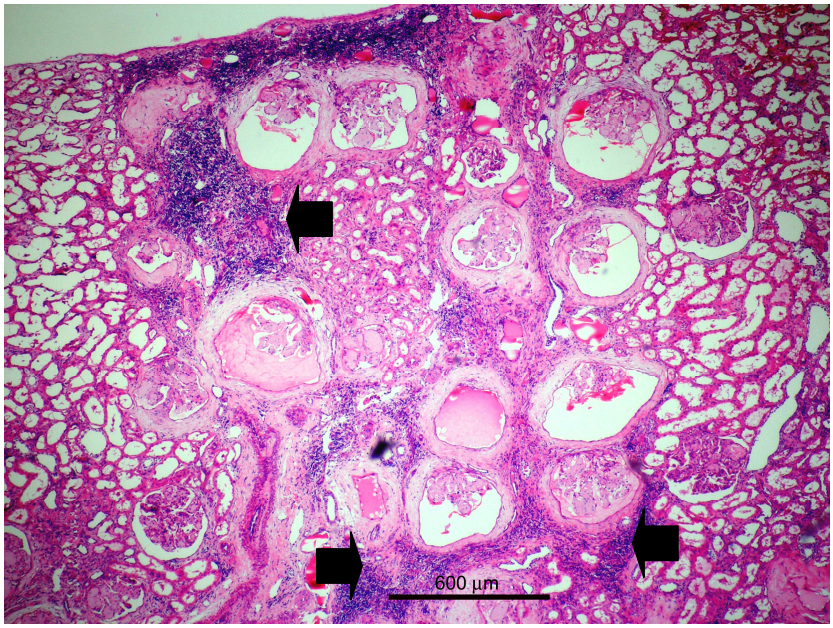
ผล

1. ลักษณะทางพยาวิทยาของไตที่เกิดวิการจุดขาว

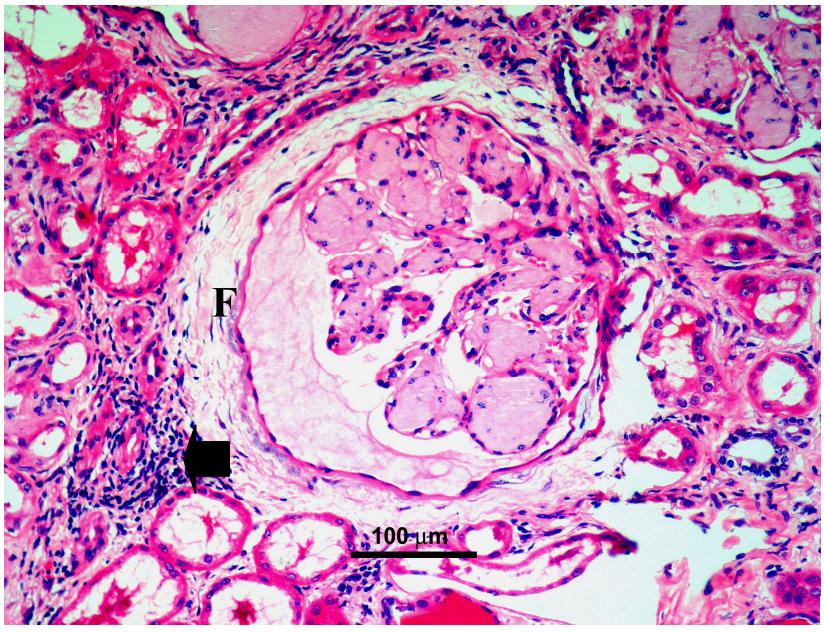
วิการในไตเมื่อดูด้วยตาเปล่าพบจุดสีขาวหรือสีเทากระจายอยู่ทั่วไต หรือพบจุดขาวเกิดขึ้นเป็นบางส่วนของไต ดังภาพที่ 6 ลักษณะทาง Histopathology ของไตที่เกิดวิการจุดขาว (White spotted kidney) พบว่าไตทุกตัวอย่างเกิด Chronic Interstitial nephritis มี Mononuclear cell และ Fibrous tissue จำนวนมากแทรกเข้าไปที่ Interstitium, รอบ Glomerulus และ Renal tubule ดังภาพที่ 7 นอกจากนี้ยังเกิด Fibrosis รอบ Bowman's capsule ทำให้ Bowman's capsule หนาขึ้นดังภาพที่ 8, เกิด Glomerular atrophy ทำให้ Urinary space กว้างขึ้น ดังภาพที่ 9 และเกิด Renal tubular degeneration มี Mononuclear cell เข้ามาแทนที่บริเวณที่เกิด Degeneration ดังภาพที่ 10

เมื่อนำเนื้อเยื่อไตทั้ง 26 ตัวอย่างมาตรวจหาเชื้อ Spirochaetes ด้วยการย้อมสี Silver impregnation ไม่พบเชื้อ Spirochaetes ทุกตัวอย่าง ดังภาพที่ 11

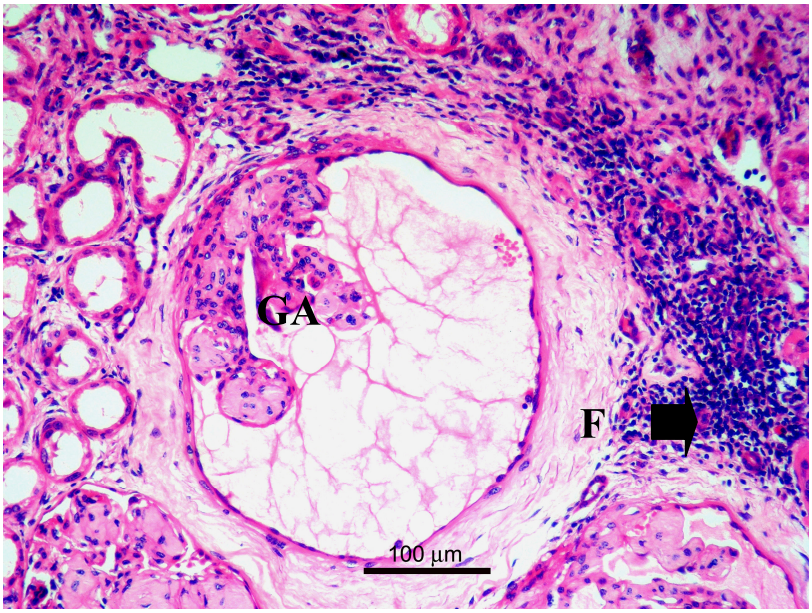
ภาพที่ 6 พบวิการจุดขาวที่ไต



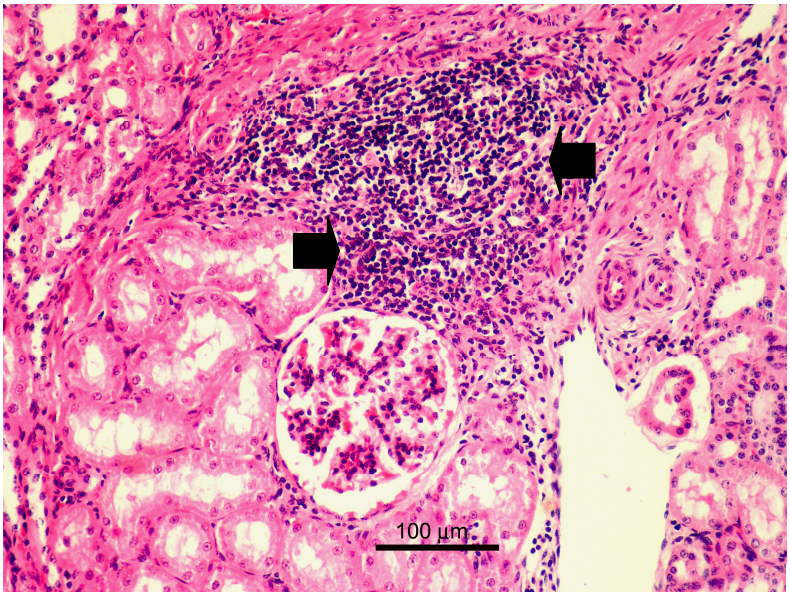
ภาพที่ 7 บริเวณ Renal Cortex พบ Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium (ลูกศรชี้)



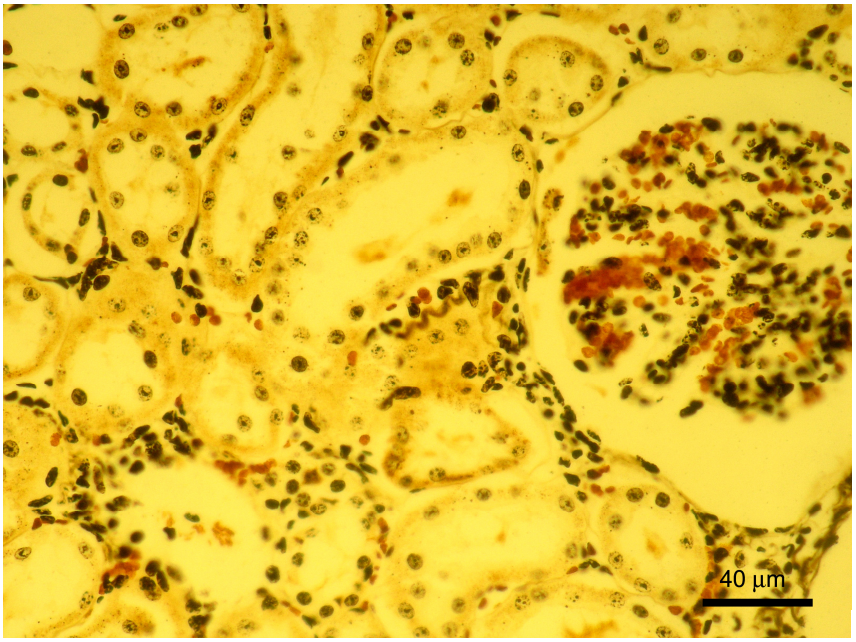
ภาพที่ 8 เกิด Fibrosis (F) รอบ Bowman's capsule ทำให้ Bowman's capsule หนาขึ้นมี Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 9 เกิด Glomerular Atrophy (GA) ทำให้ส่วน Urinary space กว้างขึ้น, เกิด Fibrosis (F) รอบๆ Bowman's capsule ทำให้ Bowman's capsule หนาขึ้น และมี Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ที่ Interstitium (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 10 เกิด Tubular Epithelial degeneration จนทำให้ Mononuclear cell และ Fibrous tissue แทรกอยู่ใน Interstitium (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 11 แสดงเนื้อเยื่อไตที่ย้อมสีด้วย Silver impregnation

2. ผลการตรวจซีรั่มโคที่ไตเกิดวิการจุดขาวด้วยวิธี Microscopic agglutination test (MAT)

ผลการตรวจความคุ้มโรคต่อเชื้อ Leptospires จากซีรั่มของโคที่ไตเกิดวิการจุดขาว 26 ตัวอย่างด้วยวิธี MAT พบว่า ซีรั่มจากโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ที่ Titer 1:50 และ 1:100 มีจำนวน 16 (61.53 %) ตัวอย่าง และซีรั่มโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีจำนวน 10 (38.47%) ตัวอย่าง ซึ่งส่วนใหญ่ซีรั่มมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ *L.ranarum* มากที่สุดคือ ที่ระดับ Titer 1:50 มีจำนวน 11 ตัวอย่าง และที่ระดับ Titer 1:100 มีจำนวน 4 ตัวอย่าง รองลงมาคือเชื้อ *L. shermani*, *L.sejroe*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.mini* และ *L.cynopteri*

ซีรั่มโคที่ระดับ Titer 1:50 พบว่ามีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเชื้อ *L.ranarum*, *L.shermani*, *L.sejroe*, *L.tarasovi*, *L.cynoptera*, *L.hebdomadis* และ *L.mini* มีจำนวน 11(73.33%), 7(46.67%), 4(26.67%), 3(20%), 1(6.67%), 1(6.67%) และ 1(6.67%) ตัวอย่างตามลำดับ

ซีรั่มโคที่ระดับ Titer 1:100 พบว่ามีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *L.ranarum*, *L.tarasovi*, *L.hebdomadis*, *L.shermani* และ *L.sejroe* มีจำนวน 4(57.14%), 3(42.86%), 3(42.86%), 3(42.86%) และ 2(28.57%) ตัวอย่างตามลำดับ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires จากการตรวจซีรั่มโคที่ไตเกิดวิการจุดขาวด้วยวิธี MAT

Serovars	Titer	
	1:50	1:100
L.ranarum	11 (73.33%)	4 (57.14%)
L.shermani	7 (46.67%)	3 (42.86%)
L.sejroe	4 (26.67%)	2 (28.57%)
L.tarasovi	3 (20%)	3 (42.86%)
L.cynoptera	1 (6.67%)	0
L.hebdomadis	1 (6.67%)	3 (42.86%)
L.mini	1 (6.67%)	0

นอกจากนี้ยังพบว่าซีรั่มโคมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ได้ตั้งแต่ 1 Serovers ไปจนถึง 5 Serovars ประกอบด้วยซีรั่มโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires 5 Serovars มีจำนวน 2 ตัวอย่าง, 4 Serovars มีจำนวน 2 ตัวอย่าง, 3 Serovars มีจำนวน 5 ตัวอย่าง, 2 Serovars มีจำนวน 3 ตัวอย่าง และ 1 Serovar มีจำนวน 4 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 6

3. ผลการตรวจโรคเลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires

ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires จากไตที่เกิดวิการจุดขาว 26 ตัวอย่างด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจหาเชื้อด้วยกล้อง Dark field microscopy พบการเจริญของเชื้อ 3 ตัวอย่าง 1 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires และ 2 ตัวอย่างที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ดังตารางที่ 7

การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires จาก 16 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบการเจริญของเชื้อจากปัสสาวะ 1(6.25%) ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 5 Serovars ประกอบด้วยเชื้อ *L.cynopteri* และ *L.mini* ที่ะดับ Titer 1:50 และเชื้อ *L.ranarum*, *L.sejroe* และ *L.hebdomadis* ที่ระดับ Titer 1:100

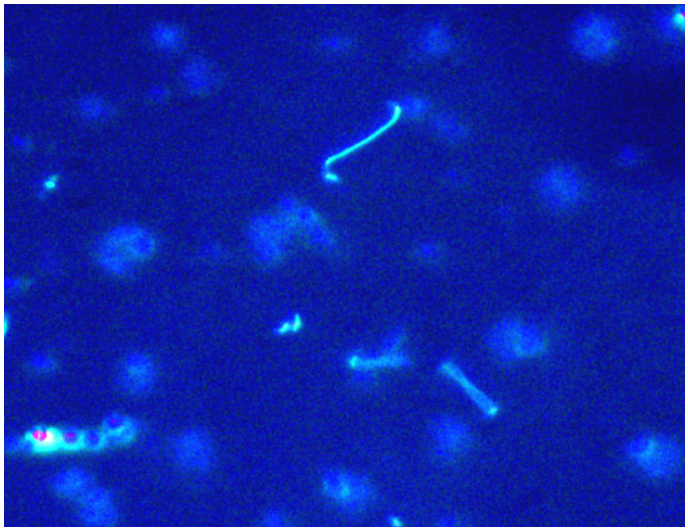
การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires 10 ตัวอย่างที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบการเจริญของเชื้อ 2(20%) ตัวอย่าง ประกอบด้วย 1 ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเชื้อได้จากปัสสาวะและอีก 1 ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงเชื้อได้จากทั้งปัสสาวะ ไตบดและไตชิ้น ดังภาพที่ 12

ตารางที่ 6 แสดงจำนวน Serovar จากซีรั่มของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires

จำนวน Serovars	จำนวนตัวอย่าง	ลำดับที่	ระดับ Titer ของเชื้อ Leptospires ที่ตรวจพบ						
			L.ran	*L.sher*	*L.sej*	*L.heb*	*L.tar*	*L.cyn*	*L.mini*
5	2	1	1:50	1:100	1:100	1:100	1:100	-	-
	(12.5%)	2	1:100	-	1:100	1:100	-	1:50	1:50
4	2	1	1:50	1:50	1:50	1:100	-	-	-
	(12.5%)	2	1:50	1:50	1:50	1:50	-	-	-
3	5	1	1:50	1:50	-	-	1:100	-	-
	(31.25%)	2	1:100	1:100	-	-	1:100	-	-
		3	1:50	1:50	-	-	1:50	-	-
		4	1:100	1:50	-	-	1:50	-	-
		5	1:100	1:100	1:50	-	-	-	-
2	3	1	-	1:50	1:50	-	-	-	-
	(18.75%)	2	1:50	-	-	-	1:50	-	-
		3	1:50	1:50	-	-	-	-	-
1	4(25%)	1	1:50	-	-	-	-	-	-
		2	1:50	-	-	-	-	-	-
		3	1:50	-	-	-	-	-	-
		4	1:50	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนตัวอย่างที่พบการเจริญของเชื้อจากตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires

	MAT positive	MAT negative
Culture positive	1	2
Culture negative	15	8



ภาพที่ 12 แสดงเชื้อ Leptospires ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยดูจาก Dark field microscope

4. ผลการตรวจเลือดจากโคที่ไตเกิดวิการจุดขาว

โคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดขาวแดง, จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดเท่ากับ 8.67±0.35x10^6/ml, 15.82±1.61x10^3/ml และ 24.80±67.57x10^3/ml ตามลำดับ โคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดขาวแดง, จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดเท่ากับ 8.59±0.27 x10^6/ml, 11.13±0.98 x10^3/ml และ 575.21±191.73 x10^3/ml ตามลำดับ ดังตารางที่ 8

เลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (P=0.348 และ P=0.159 ตามลำดับ) โคที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่าโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (P=0.0125) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 13

โคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบว่าค่าเฉลี่ย Haemoglobin (HGB), Haematocrit (HCT), Mean corpuscular volumn (MCV), Mean corpuscular Haemoglobin (MCH), Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) และ Red cell distribution width (RDW) เท่ากับ 12.29±0.697 g/dL, 34.14±1.161%, 39.76±1.56 fl, 14.05±0.62 pg, 35.70±1.36 g/dL และ 21.13±0.63% ตามลำดับ

โคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires พบว่าค่าเฉลี่ย Haemoglobin (HGB), Haematocrit (HCT), Mean corpuscular volumn (MCV), Mean corpuscular Haemoglobin (MCH), Mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) และ Red cell distribution width (RDW) เท่ากับ 12.74±0.58 g/dL, 34.87±1.75%, 41.09±2.07 fl, 14.96±0.62 pg, 36.61±0.47 g/dL และ 25.63±2.71% ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

เลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires มีค่าเฉลี่ยของ HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ RDW ไม่แตกต่างจากโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires (P=0.622, P=0.729, P=0.615, P=309, P=0.612 และ P=0.158 ตามลำดับ) ซึ่งเป็นค่าที่สนับสนุนว่าเม็ดเลือดแดงของโคทั้งที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires อยู่ในเกณฑ์ปกติ ดังภาพที่ 14

จากการทำ Differential count ของเลือดโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปกติ 10 ตัวอย่าง, จำนวน Monocyte สูงกว่าปกติ 8 ตัวอย่าง, จำนวน Lymphocyte สูงกว่าปกติ 7 ตัวอย่าง และจำนวน Neutrophil สูงกว่าปกติ 7 ตัวอย่าง ส่วนเลือดของโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปกติ 3 ตัวอย่าง, จำนวน Monocyte สูงกว่าปกติ 5 ตัวอย่าง, จำนวน Lymphocyte สูงกว่าปกติ 2 ตัวอย่าง และจำนวน Neutrophil สูงกว่าปกติ 1 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 10 ส่วนจำนวน Eosinophil และ Basophil ของเลือดโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีค่าปกติ

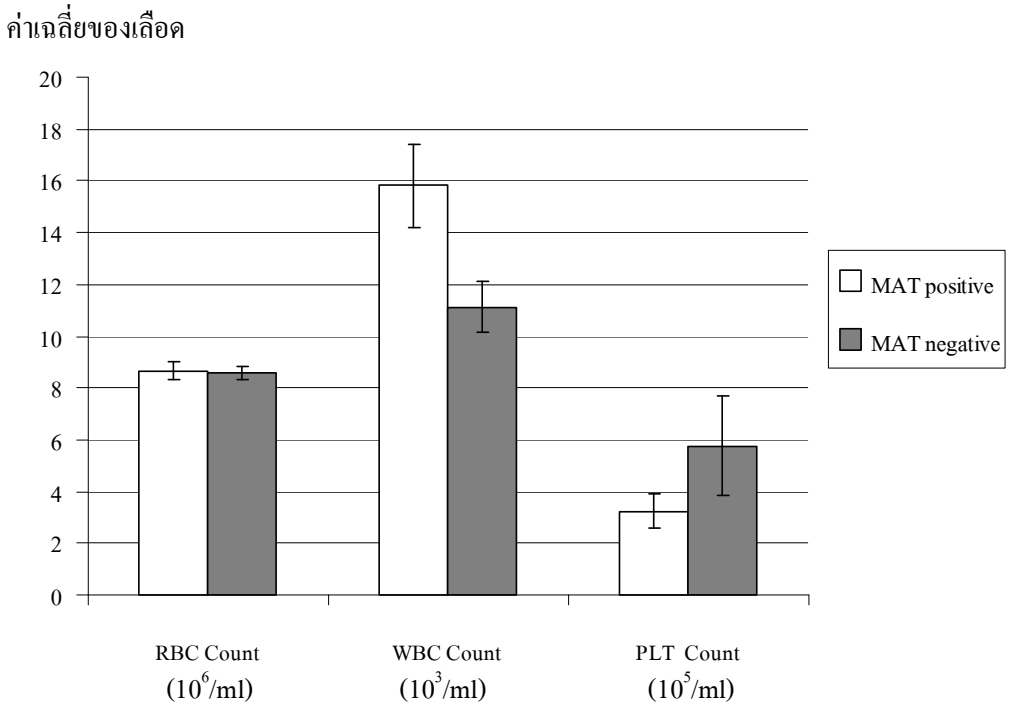
ตารางที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยและค่า SEM ของปริมาณเม็ดเลือดแดง, เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires

ค่าเลือด	ค่าเฉลี่ยของเลือดและค่า SEM	
	MAT positive	MAT negative
ปริมาณเม็ดเลือดแดง (10^6/ml)	8.67±0.35	8.59±0.27
ปริมาณเม็ดเลือดขาว (10^3/ml)	15.82±1.61*	11.13±0.98*
ปริมาณเกล็ดเลือด (10^5/ml)	3.248±0.676	5.752±1.917

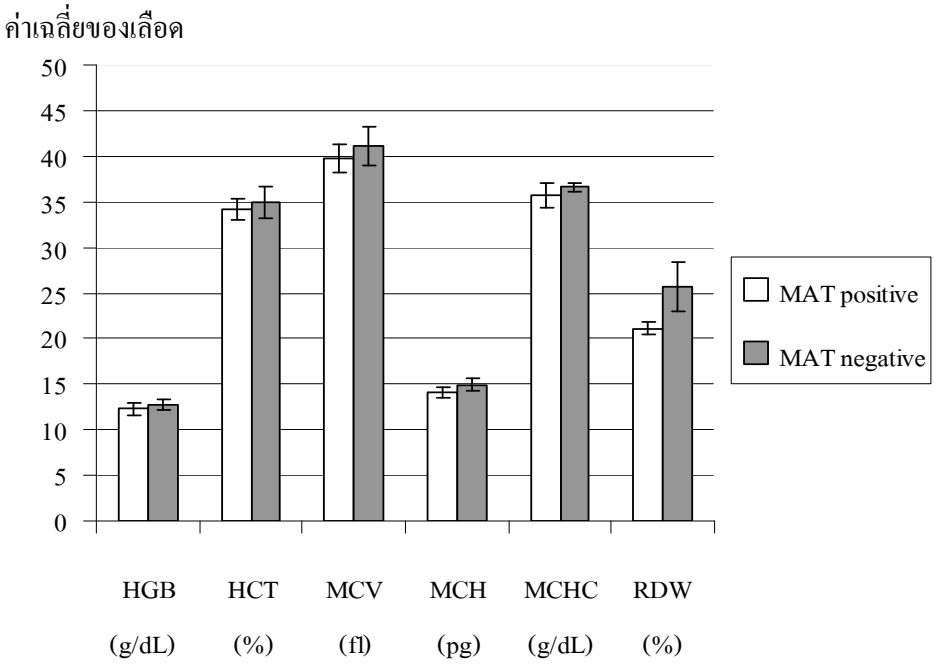
* P = 0.0125 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยและค่า SEM ของ HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ RDW ของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires

ค่าเลือด	ค่าเฉลี่ยของเลือดและค่า SEM	
	MAT positive	MAT negative
HGB (g/dL)	12.29±0.697	12.74±0.58
HCT (%)	34.14±1.161	34.87±1.75
MCV (fl)	39.76±1.56	41.09±2.07
MCH (pg)	14.05±0.62	14.96±0.62
MCHC (g/dL)	35.70±1.36	36.61±0.47
RDW (%)	21.13±0.63	25.63±2.71



ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires



ภาพที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยของ HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC และ RDW ของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มโรคกันต่อเชื้อ Leptospires

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนโคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวน Lymphocyte, จำนวน Monocyte และจำนวน Neutrophil ที่เพิ่มขึ้น และปกติจากค่าอ้างอิงของเลือด

		จำนวนโค	
		MAT positive	MAT negative
จำนวนเม็ดเลือดขาว	สูงขึ้น	10 (62.5%)	3(30%)
	ปกติ	6 (37.5%)	7(70%)
จำนวน Monocyte	สูงขึ้น	8(50%)	5(50%)
	ปกติ	8(50%)	5(50%)
จำนวน Lymphocyte	สูงขึ้น	7(43.75%)	2(20%)
	ปกติ	9(56.25%)	8(80%)
จำนวน Neutrophil	สูงขึ้น	7(43.75%)	1 (10%)
	ปกติ	9(56.25%)	9 (90%)

วิจารณ์

อันตรายของโรค Leptospirosis คือเมื่อเชื้อ Leptospires เข้าสู่ร่างกายแล้วเพิ่มจำนวนในกระแสเลือดต่อมาเชื้อจะกระจายไปทั่วร่างกายและสร้างความเสียหายให้กับอวัยวะต่างๆ เช่นตับ ปอด เยื่อหุ้มสมอง และไตเป็นต้น โดยเฉพาะในไต เชื้อจะทำให้การทำงานของไตผิดปกติ และเกิดพยาธิสภาพที่เรียกว่า วิการจุดขาว (White spotted kidney) และเมื่อศึกษาทาง Histopathology พบ Chronic interstitial nephritis (Terpstra, 2003; Maxie, 1993) ซึ่งนอกจากเชื้อ Leptospires ที่ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาวแล้ว ยังมีแบคทีเรียและไวรัสชนิดอื่นอีกที่ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาวได้ เช่น *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *Escherichia coli*, Porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV), Porcine parvovirus (PPV), Porcine circovirus 2 (PCV2) เป็นต้น (Maxie, 1993; Martinez *et al*., 2006) ดังนั้นการวินิจฉัยว่าการเกิดวิการจุดขาวเกิดจากเชื้อ Leptospires นั้นต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย เช่น Microscopic agglutination test (MAT), การเพาะเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

จากการศึกษาไตที่เกิดวิการจุดขาวทั้ง 26 ตัวอย่างพบวิการ Chronic Interstitial nephritis ทุกตัวอย่างมีอยู่ 16(61.54%) ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boqvist *et al.* (2003) ที่รายงานว่าไตที่เกิด Interstitial nephritis 32 ตัวอย่าง มีอยู่ 18 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ส่วน Delbem *et al.* (2002) พบว่าไตที่เกิดวิการ Interstitial nephritis 7 ตัวอย่างมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ทุกตัวอย่าง และ Uzal *et al.* (2002) สำรวจโค 72 ตัวอย่างที่ไตเกิดวิการจุดขาว ซึ่งมีอยู่ 6 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires นอกจากนี้สัตว์ที่เป็นโรค Leptospirosis ยังพบวิการอื่นๆ อีกเช่น Fibrosis รอบๆ Bowman's capsule, Tubular epithelial degeneration และ Glomerular atrophy เป็นต้น (Skilbeck *et al*., 1988; Yener and Keles, 2001; Uzal *et al*., 2002)

สาเหตุของการเกิดพยาธิสภาพในไตของสัตว์ที่เป็นโรค Leptospirosis เกิดจากการเคลื่อนที่ของเชื้อ Leptospires ผ่าน Vascular endothelium มาอยู่ที่ Interstitium ต่อมาเชื้อเข้าสู่ Renal Tubule โดยเคลื่อนผ่านทาง Lateral intercellular junctions ส่วนการเกิด Renal tubular degeneration เกิดจาก Endotoxin ของเชื้อ Leptospires เช่น Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PG) และ Lipoprotein เป็นต้น ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ Cell membrane และเป็นส่วนที่ทำให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (Cheville *et al*., 1980; Yang *et al.*, 2001)

เชื้อ Leptospires ทำให้ไตเกิด Interstitial nephritis, เกิด Fibrosis รอบๆ Bowman's capsule, Glomerular atrophy, Tubular degeneration ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อ Leptospires ต่าง Strain กันอาจจะทำให้ระดับการเกิดวิการที่แตกต่างกันสอดคล้องกับงานวิจัยของ Greenlee *et al.* (2004) ซึ่งฉีดเชื้อ *L. kischneri* strains RM 52 และ strain 82 ให้สุนัข พบว่าหลังการฉีดเชื้อวันที่ 12 ทั้งเชื้อ Strain 82 และ Strain RM 52 ทำให้เกิด Interstitial nephritis, Tubular degeneration และ Tubular dilatation ยกเว้น Tubular mineralization (แร่ธาตุคั่งค้างอยู่ที่ Tubular lumen) ที่เกิดจาก Strain 82 เท่านั้น

นอกจากเชื้อ Leptospires ที่ทำให้เกิด Interstitial nephritis ยังพบว่ามีปัจจัยอื่นอีกที่ทำให้เกิด Interstitial nephritis คือ เชื้อแบคทีเรีย เช่น *Salmonella* spp., *Brucellus* spp., *E.coli*, *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Borrelia* spp. เป็นต้น หรือสารพิษจากเชื้อรา ได้แก่ สาร Ochratoxin จากเชื้อรา *Asperillus orchraceus* และ *Penicillium verrucosum* เป็นต้น หรือเชื้อไวรัส เช่น PRRSV, PPV และ PCV2 เป็นต้น (Maxie, 1993 and Michel and Kelly, 1998; Drolet *et al*., 2002; Gresham *et al*., 2006) รวมทั้งเชื้อ *Borrelia burgdurferi* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Spirochaetes เช่นเดียวกับเชื้อ Leptospires ทำให้เกิด Interstitial nephritis ได้เหมือนกัน (Dambach *et al*., 1997) ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นในการบ่งชี้ว่าไตที่เกิด Interstitial nephritis เกิดจากเชื้อ Leptospires เช่น การย้อมสี Silver impregnation และการเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires จากเนื้อเยื่อไต

การย้อมสีเนื้อเยื่อไตทั้ง 26 ตัวอย่างด้วยวิธี Silver impregnation ไม่พบเชื้อ Spirochaete ในเนื้อเยื่อไตทุกตัวอย่าง แต่ Saadi *et al.* (1976) ใช้การย้อมสี Silver impregnation ในการตรวจหาเชื้อ Spirochaetes ในเนื้อเยื่อไตพบเชื้อ Spirochates อยู่ใน Renal tubule แต่เมื่อนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH กลับไม่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires สี Silver impregnation นอกจากจะใช้ย้อม Leptospires แล้วยังใช้ย้อมสี Spirocheates ชนิดอื่นด้วย เช่น *Borrelia* spp. ดังการรายงานของ Dambach *et al.* (1997) ที่ใช้ Silver impregnation ย้อมสีเนื้อเยื่อไตที่เกิด Interstitial nephritis จากการติดเชื้อ *Borrelia burgdorferi* พบเชื้อ *Borrelia* spp. อยู่ใน Urinary space และ Tubular lumen ของเนื้อเยื่อไต ดังนั้นการใช้ Silver impregnation ในการตรวจหาเชื้อ Leptospires มีความจำเพาะน้อยจึงต้องใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires และ MAT ร่วมด้วยเพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยโรค

การศึกษานี้พบว่าโคที่เกิดวิการจุดขาวไม่ได้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires เสมอไป เช่นเดียวกับการรายงานของ Uzal *et al*. (2002), Delbem *et al*. (2002) Boqvist *et al*. (2003) รายงานว่าไตที่เกิดวิการจุดขาวไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires แต่ Martinez *et al*. (2006) สำรวจสุกรที่ไตเกิดวิการจุดขาวจำนวน 14 ตัวอย่างพบว่าสุกรมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ *L.bratislava* จำนวน 10(71.4%) ตัวอย่าง และเชื้อไวรัส PPV จำนวน 6(58.33%) ตัวอย่าง และ Drolet *et al.* (2002) ตรวจพบเชื้อ PPV ในไตสุกรที่เกิดวิการจุดขาวโดยวิธี PCR ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งเชื้อ Leptospires และเชื้อไวรัส PPV ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาว

ซีรั่มที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ที่ระดับ Titer น้อยกว่า 1:100 ให้ถือว่าเป็นสัตว์ที่เคยได้รับเชื้อ Leptospires (สุรศักดิ์, 2548) ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าซีรั่มโคทั้ง 16 ตัวอย่างที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires อยู่ที่ระดับ Titer 1:50 และ 1:100 แสดงว่าโคทั้ง 16 ตัวอย่างเคยได้รับเชื้อ Leptospires และมีโอกาสเป็นไปได้ว่าวิการจุดขาวที่ไตเกิดจากเชื้อ Leptospires ส่วนการวินิจฉัยว่าสัตว์ได้รับเชื้อ Leptospires ในปัจจุบันหรือไม่นั้นให้พิจารณาจากระดับ Titer ของสัตว์ที่เพิ่มขึ้น (สุรศักดิ์, 2548)

ภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires เกิด Cross protection กันระหว่าง Serovar แล้วยังสามารถเกิด Cross protection กับภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Spirochaete ชนิดอื่นได้อีก ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Shin *et al*. (1993) ที่พบว่าซีรั่มของสุนัขที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ทั้ง 5 Serovars คือ *L.pomona*, *L.hardjo*, *L.canicola*, *L.icterohaemorrhagiae* และ *L.grippotyphosa* เกิด Cross-protection กับซีรั่มที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ *Borrelia burgdorferi* ซึ่งจัดอยู่ใน Family Spirochaete เดียวกัน

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างไตเกิดวิการจุดขาวไม่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires เสมอไป ซึ่งมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires จากไตที่เกิดวิการจุดขาวแล้วไม่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires แต่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น *E.coli*, *Streptococcus spp.*, *Stapphylococcus spp.* และ *Conynebacteria spp*. (Skilbeck *et al*., 1988; Scanziani *et al*., 1989; Uzal *et al*., 2002; Boqvist *et al*., 2003; Martinez *et al*., 2006) Prescott *et al*. (1987) สำรวจไต 117 ตัวอย่างพบการเจริญของเชื้อ *L.borgpeterseni* และ *L.kennewicki* เท่ากับ 9.4% และ 0.8% ตามลำดับ และ Baker *et al*. (1989) สำรวจไต 197 ตัวอย่าง พบการเจริญของเชื้อ Leptospires 19.23% ของไตที่เกิดวิการจุดขาวในสุกรทั้งหมด แต่ทั้ง Baker *et al*. (1989) และ Prescott *et al*. (1987) ก็สรุปว่าไตที่เกิดวิการจุดขาวไม่ได้พบการเจริญของเชื้อ Leptospires เสมอไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires 16 ตัวอย่าง มีอยู่ 1 ตัวอย่างที่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires จากปัสสาวะและเป็นโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จำนวน 5 Serovars ประกอบด้วย เชื้อ *L.cynopteri* และ *L.mini* ที่ะดับ Titer 1:50 และเชื้อ *L.ranarum*, *L.sejroe* และ *L.hebdomadis* ที่ระดับ Titer 1:100 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ Leptospires ที่เพาะเลี้ยงได้อาจไม่ได้เป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับเชื้อ Leptospires ที่ตรวจพบด้วยวิธี MAT เสมอไปเช่นเดียวกับ White *et al* . (1982) ที่รายงานว่าโคมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ *L.hardjo* จำนวน 162 ตัวอย่าง แต่เมื่อนำไตวัวไปเพาะแยกเชื้อพบการเจริญของเชื้อ *L.hardjo*, *L.balcanica* และ *L.pomona* จำนวน 45, 3 และ 3 ตัวอย่างตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ *L.hardjo* เกิด Cross-protection กับ *L.balcanica* แล *L.pomona*

การศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires 16 ตัวอย่าง มีอยู่ 15 ตัวอย่างที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires ซึ่งเชื้อที่โคได้รับไม่มีความรุนแรงมากทำให้ Antibody สามารถทำลายเชื้อ Leptospires ได้จึงไม่พบเชื้อ Leptospires จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Johnson and Harris (1967) ที่พบว่า Antibody ทำลายเชื้อ Leptospires ที่ไม่รุนแรงได้รวดเร็วกว่าเชื้อ Leptospires ที่มีความรุนแรง

การเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires จากซีรั่มที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires 10 ตัวอย่าง มีอยู่ 2 ตัวอย่างที่พบการเจริญของเชื้อ Leptospires จากปัสสาวะซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gregoire *et al*. (1987) พบการเจริญของเชื้อ 35 ตัวอย่างจากไตที่เกิดวิการจุดขาว ซึ่งมีอยู่ 2 ตัวอย่างที่ซีรั่มโคไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ส่วน Thiermann (1983) พบการเจริญของเชื้อ Leptospires 13 ตัวอย่างซึ่งมีอยู่ 4 ตัวอย่างที่ซีรั่มโคไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires และ Miller *et al*. (1991) พบการเจริญของเชื้อ Leptospires 88 ตัวอย่าง ซึ่งมีอยู่ 3 ตัวอย่างที่ซีรั่มไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ซึ่งจากการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าซีรั่มโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires อาจจะพบการเจริญของเชื้อ Leptospires ได้ ดังนั้นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้จากปัสสาวะโคนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปว่าเป็นเชื้อ Serovar ใด ซึ่งการตรวจจำแนกชนิดของ Serovar ของเชื้อที่เพาะแยกได้ สามารถตรวจสอบได้ด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มกับ Antiserum มาตรฐานที่จำเพาะกับ Serovar แต่ละชนิด และยืนยันโดยวิธี Cross Agglutination Absorbtion Test (CAAT) หรือตรวจสอบด้วย Monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ Serovar แต่ละชนิด ซึ่งในประเทศไทยมีสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติที่ใช้เทคนิค CAAT ในตรวจจำแนกชนิดของ Serovar ของเชื้อที่เพาะแยกได้ แต่ Antibody ที่ใช้ตรวจจำแนกยังไม่ครบทุก Serovar สาเหตุที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ Leptospires ได้จากโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ

Leptospires ได้นั้น Steinan *et al.* (1992) รายงานว่าเชื้อ Leptospires อยู่ใน Renal tubule ซึ่งเป็นบริเวณที่ภูมิคุ้มกันเข้าไม่ถึง ต่อมาระดับภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ลดลงจนในที่สุดไม่พบภูมิคุ้มกันเลยแต่เชื้อยังคงเพิ่มจำนวนได้ใน Renal tubule

โคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (P=0.348 และ P=0.159) ซึ่งแตกต่างจาก Keenan *et al*. (1978) และ Yang *et al*. (2006) ซึ่งรายงานว่าสัตว์ติดเชื้อ Leptospires มีปริมาณเกล็ดเลือดน้อยกว่าสัตว์ที่ไม่ติดเชื้อ Leptospires เนื่องจากทั้ง Keenan *et al*. (1978) และ Yang *et al*. (2006) ศึกษาสัตว์ที่ติดเชื้อ Leptospires ในระยะการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แต่การศึกษานี้เป็นการศึกษาไตที่เกิดวิการจุดขาวซึ่งอยู่ในระยะการติดเชื้อแบบเรื้อรังจึงไม่พบว่าเกิดภาวะ Thrombocytopenia ส่วนค่า HCT, HGB, MCV, MCH, MCHC และ RDW ทั้งโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคและไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires นั้นไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่าค่าเม็ดเลือดแดงดังกล่าวอยู่ในภาวะปกติ

โคที่ซีรั่มมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่าโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires (P=0.0125) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานของ Nally *et al*. (2004) ที่พบว่าหนูตะเภาที่ติดเชื้อ Leptospires มีจำนวนเม็ดเลือดขาวมากกว่าหนูตะเภาที่ไม่ติดเชื้อ Leptospires

การศึกษานี้โคที่ซีรั่มมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ Leptospires มีค่า Neutrophil, Monocyte และ Lymphocyte สูงกว่าปกติซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Keenan *et al.* (1978) และ Nally *et al.*(2004) ซึ่งพบว่าสัตว์ที่ติดเชื้อ Leptospires มีเพียงปริมาณ Monocyte เท่านั้นที่สูงกว่าปกติ แต่รายงานของ Prescott *et al.* (2002) พบว่าสุนัขที่ติดเชื้อ Leptospires พบทั้งปริมาณ Neutrophil และ Monocyte สูงกว่าปกติ

การศึกษาทั้งหมดนี้พบว่าไตที่เกิดวิการจุดขาวไม่ได้เกิดจากเชื้อเลปโตสไปโรซิสเสมอไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Boqvist *et al*. (2003) ที่รายงานว่าไตเกิดวิการจุดขาวพบ Interstitial nephritis และการเกิด Interstitial nephritis นี้ไม่ได้เกิดจากเชื้อ Leptospires เสมอไป แต่อาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าโคมีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ที่ก่อโรคในคนได้แก่ *L.sejroe*, *L.shermani*, *L.cynopteri* และ *L.mini* (วิมล และคณะ, 2549) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมี

การป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ Leptospire จากโคมาสู่คน การฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อ Leptospires ให้กับโค หรือหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับสารคัดหลั่งจากสัตว์ เช่น เลือด ปัสสาวะ เป็นต้น ด้วยการใส่ถุงมือ และรองเท้าบู๊ท ก่อนเข้าทำงานในโรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น

ในไตปกติก็ยังพบเชื้อ Leptospires ได้เช่นกันซึ่งอาจจะเกิดจากสัตว์ได้รับเชื้อ Leptospires ในระยะแรกๆ หรืออาจเกิดจากการสร้างเสริมสู่สภาพปกติของไตจึงไม่เห็นพยาธิสภาพที่ไต ทั้งนี้ การเกิดพยาธิสภาพที่ไตขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ Leptospires ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์แต่ละชนิด และปริมาณของเชื้อที่สัตว์ได้รับ (วนิดา และคณะ, 2550)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. วิการของไตเมื่อมองด้วยตาเปล่าพบจุดขาวที่ไตแล้วนำไปศึกษาทางพยาธิวิทยาพบ Chronic interstitial nephritis ทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบ Glomerular atrophy, Fibrosis รอบ Glomerulus และ Renal tubular degeneration เมื่อนำเนื้อเยื่อไตมาตรวจด้วยวิธี Silver impregnation กลับไม่พบเชื้อ Spirochaete อยู่ในไตทุกตัวอย่างเลย

2. การตรวจภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires จากซีรั่มโคใช้วิธี Microscopic agglutination test สรุปได้ว่าโคที่เกิดวิการจุดขาวพบภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires 61.54 เปอร์เซ็นต์ของไตที่เกิดวิการจุดขาวทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไตที่เกิดวิการจุดขาวไม่พบภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires เสมอไป จึงทำการศึกษาต่อไปด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งพบการเจริญของเชื้อ 1 ตัวอย่าง จากปัสสาวะโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ซึ่งทำให้มั่นใจมากยิ่งขึ้นว่าโคที่ไตเกิดวิการจุดขาวตัวนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อ Leptospires แต่ในการวิจัยครั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไปว่ามีสาเหตุอื่นอีกหรือไม่ที่ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาว

3. การตรวจค่าโลหิตวิทยาของโคที่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่าโคที่ไม่มีภูมิคุ้มกันโรคต่อเชื้อ Leptospires ซึ่งประกอบด้วย Monocytosis, Lymphocytosis และ Neutrophilia

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาสาเหตุของโรคอื่นที่ทำให้ไตเกิดวิการจุดขาว เช่น โรค Brucellosis, Salmonellosis, Colibacillosis เป็นต้น

2. ควรทำการศึกษาการย้อมสีเนื้อเยื่อไตด้วยวิธีอื่น เช่นการย้อมสี Immunohistochemistry เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อ Leptospires ในเนื้อเยื่อไตแล้วทำให้ไตเกิดวิการจุดขาว

3. ควรทำจัดจำแนกเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงว่าเป็นเชื้อ Leptospires สายพันธุ์ใด เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ Leptospires ที่ได้จากการตรวจด้วยวิธี MAT ว่าเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อชนิดเดียวกันกับเชื้อที่ตรวจด้วยวิธี MAT

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เฉลียว ศาลากิจ. 2540. **โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์.** โรงพิมพ์อักษรสมัย, กรุงเทพฯ.

ดวงพร พลูสุขสมบัติ, วราลักษณ์ ตังคณะกุล, ดาริกา กิ่งเนตร, นภดล แสงจันทร์, ยุวลักษณ์ ขอประเสริญ และเกียงศักดิ์ อมฤต. 2542. การเพาะเลี้ยงเชื้อเลปโตสไปร์ในหนูจังหวัดนครราชศรีมา พ.ศ. 2542. **วารสารวิชาการสาธารณสุข** 8 (3): 360-369.

ดวงพร พลูสุขสมบัติ, นภดล แสงจันทร์, ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ, ดาริกา กิ่งเนตร และวราลักษณ์ ตังคณะกุล. 2544. เชื้อเลปโตสไปราในหนู ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปี 2542-2543. **วารสารวิชาการสาธารณสุข** 10 (3): 516-525.

ธรรมวรรณ หนุนไธสง, โรจน์ชนะ ปรากฏชื่อ และ ยุทธภูมิ สืบขำเพชร. 2548. การสำรวจความชุกโรคเลปโตสไปโรซีสทางซีรั่มวิทยาของโค กระบือในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปี พ.ศ. 2544. **รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา** 11 (111): 1-8.

วนิดา บัวศร, อมรพันธุ์ เสรีมาศ และจินตนา จิรถาวร. 2550. การพบจุลพยาธิสภาพใหม่ของอวัยวะที่ติดเชื้อ Leptospira interrogans: ผลการศึกษาในหนูแฮมสเตอร์, น. 38. *ใน* สุขุมาล จงธรรมคุณ, บรรณาธิการ. **การประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30.** คณะแพทยศาสตร์ และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาเชียงใหม่ และสมาคมกายวิภาคศาสตร์ (ประเทศไทย)

วิมล เพชรกาญจนาพงศ์, ศุภลักษณ์ ยะแสง และ พรชัย จันทเพ็ชร. 2549. ซีโรกรุ๊ปของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจพบในปี 2548. **รายงานการเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา** 37 (16): 273-277.

เสาวภา พรสิริพงษ์, เรณู เมืองเกลี้ยง, พรทิพย์ อุศุภรัตน์, วราลักษณ์ ตังคณะกุล, ดาริกา กิ่งเนตร, เดชชนะ จันทร์โพธิ์ศรี, และศุภมิตร ชุณห์สุทธิวัฒน์. 2544. ความรู้เกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรซิสในประชากรกลุ่มเสี่ยง. **วารสารวิชาการสาธารณสุข** 10 (2): 253-261.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2550. โรค Leptospirosis. แหล่งที่มา: http://epid.moph.go.th/, 15 พฤษภาคม 2550.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. โรคฉี่หนู (Leptospirosis). โครงการบริการวิชาการและแก้ปัญหาสุขภาพของประชาชน โดยมหาวิทยาลัยขอนแก่น และหน่วยงานสาธารณสุขในเขต 6 (โครงการ กบส. 6). ฝ่ายวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Adamus, C., M. Buggin-Daubie, A. Izembart, C. Sonrier-Pierre, L. Guigand, M.T. Masson, G. Andre-Fontaine and M. Wyers. 1997. Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. **J Comp Pathol** 117: 311-328.

Adler, B., S. Faine, H.K. Muller and D.E. Green. 1980. Maturation of the humeral immune response determines the susceptibility of guinea pigs to leptospirosis. **Pathol** 12: 529-538.

Alston, J.M. and J.C. Broom. 1958. **Leptospirosis in Man and Animals.** E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh, London.

Alves, V.A.F., M.R. Vianna, P.H. Yasuda and T.D. Brito. 1987. Detection of Leptospiral Antigen in the human liver and kidney using an immunoperoxidase staining proceture. **J Pathol** 151: 125-131.

Arimitsu, Y., S. Kobayashi , K. Akama and T. Matuhasi. 1982. Development of a simple serological method for diagnosing leptospirosis: a microcapsule agglutination test. **J Clin Microbiol** 15: 835-841.

Babudieri B. 1961. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. **Bull Wld Hlth Org** 24: 45-58.

Bajani, M.D., D.A. Ashford, S.L. Bragg, C.W. Woods, T. Aye, R.A. Spiegel, B.D. Plikaytis, B.A. Perkins, M. Phelan, P.N. Levett and R.S. Weyant. 2003. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. **J Clin Microbiol** 41: 803-809.

Baker, T.M., S.C. McEwen, J.F. Prescott and A.H. Meek. 1988. The prevalence of Leptospirosis and its association with multifocal interstitial nephritis in swine at slaughter. **Can J Vet Res** 53: 290-294.

Bal, A.E., C. Gravekamp, R.A. Hartskeerl, J.D. Meza-Brewster, H. Korver and W.J. Terpstra. 1994. Detection of Leptospires in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis. **J Clin Microbiol** 32: 1894-1898.

Bhrarti, A.R., J.E. Nally, J.N. Ricaldi, M.A. Matthias, M.M. Diaz, M.A. Lovett, P.N. Levett, R.H. Gilman, M.R. Willig, E. Gotuzzo and J.M. Vinetz. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis** 3: 757-771.

Bolin, C.A. and P. Koellner. 1988. Human-to-Human Transmission of Leptospira interogans by Milk. **J Infect Dis** 158 (1): 246-247.

Boqvist, S., J.M. Montgomery, M. Hurst, H.T.V. Thu, E.O. Engvall, A. Gunnarsson and U. Magnusson. 2003. Leptospira in slaughtered fattening pigs in southern Vietnam: presence of the bacteria in the kidneys and association with morphological findings. **Vet Microbiol** 93: 361-368.

Brenner, D.J., A.F. Kaufmann, K.R. Sulzer, A.G. Steigerwalt, F.C. Rogers and R.S. Weyant. 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira genomospecies*. **Int J Syst Bacteriol** 49: 839-858.

Bromley, D.B. and N.W. Charon. 1979. Axial Filament Involvement in the Motility of *Leptospira interrogans*. **J Bacteriol** 137: 1406-1412.

Brown, P.D., C. Gravekamp, D.G. Carrington, H.V.D. Kemp, R.A. Hartskwwrl, C.N. Edwards, C.O.R. Everard, W.J. Terpstra and P.N. Levett. 1995. Evaluation of the Polymerase Chain Reacyion for early diagnosis of leptospirosis. **J Med Microbiol** 43: 110-114.

Chapman, A.J., B. Adler and S. Faine. 1988. Antigens recognized by the human immune response to infection with *Leptospira interrogens* serovar hardjo. **J Med Microbiol** 25: 269-278.

Cheville, N.F., R. Huhn and R.C. Cutlip. 1980. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by *Leptospira pomona*. **Vet Pathol** 17: 338-351.

Coghlan, J.D. and A.D. Bain. 1969. Leptospirosis in Human Pregnancy followed by Death of the Foetus. **BMJ** 1: 228-230.

Colagross-Schouten, A.M., J.A.K. Mazet, F.M.D. Gulland, M.A. Miller and S. Hietala. 2002. Diagnosis and seeroprevalence of Leptospirosis in California sea lions from Coastal California. **J Wildl Dis** 38: 7-17.

Corney, B.G., J. Colley and G.C. Graham. 1997. Simplified Analysis of Pathologenic leptospiral serovars by random amplified polymorphic DNA fingerprinting **J Med Microbiol** 46: 927-932.

Daher, E.D.F., D.M. Brunetta, G.B.D. Silva Junior, R.A. Puster and R.M.S.V. Patrocinio. 2003. Pancreatic involvement in fetal human leptospirosis: Clinical and histopathological Feature. **Rev Inst Med trop S Paulo** 45 (6): 307-313.

Dambach, D.M., C. A. Smith, R. M. Lewis and T. J. Van Winkle. 1997. Morphologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Characterization of a Distinctive Renal Lesion in Dogs Putatively Associated with *Borrelia burgdorferi* Infection: 49 Cases (1987-1992). **Vet Pathol** 34: 85-96.

Delbem, Á.C.B., J.C.d. Freitas, A.P.F.R.L. Bracarense, E.E. Müller and R.C.d. Oliveira. 2002. Leptospirosis in slaughtered sows: Serological and Histopathological Investigation. **Braz J Microbiol** 33: 174-177.

Dolhnikoff, M., T. Mauad, E.P. Bethlem and C.R.R. Carvalho. 2007. Pathology and Pathophysiology of Pulmonary Manifestations in Leptospirosis. **Braz J Infect Dis** 11 (1): 142-148.

Drolet, R., S. D'Allaire, R. Larochelle, R. Magar, M. Ribotta and R. Higgins. 2002. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. **Vet Rec** 150 (5): 139-143.

Drury, R.A.B. and E.A. Wallington. 1967. **Carleton's Histological Technique.** 4 ed. Neill and Co. Ltd., Edinburgh.

Edwards, G.A. and B.M. Domm. 1960. Human Leptospirosis. **Medicine (Baltimore)** 39: 117-156.

Faber, N.A., M. Crawford, R.B. LeFebvre, N. C.Buyukmihci, J.E. Madigan and N.H. Willits. 2000. Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. **J Clin Microbiol** 38: 2731-2733.

Faine, S. 1956a. Virulence in Leptospira I. Reactions of guinea pigs to experimental infection with *Leptospira icterrohaemorrhagiae*. **Br J Exp Pathol** 38: 1-7.

Faine, S. 1956b. Virulence in Leptospira II: The growth in vivo of virulent *Leptospira icterohaemorrhagiae*. **Br J Exp Pathol** 38: 8-14.

Faine, S. 1982. **Guidelines for The Control of Leptospirosis.** World Health Organization Geneva.

Feigin, R.D. and D.C. Anderson. 1998. **Leptospirosis. In Textbook of Pediatric Infectious Disease.** 4 ed. WB Saunders Company, Philadephia, USA.

Fonsecaa, C.D.A., M.M.G. Teixeirab, E.C. Romeroc, F.M. Tengand, M.V.d. Silvae and M.A. Shikanai-Yasuda. 2006. Leptospira DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. **J Infect** 52: 15-22.

Goldstein, S.E. and N.W. Charon. 1988. Motility of the Spirochaete Leptospira. **Cell Motil Cytoskeleton** 9: 101-110.

Gresham, A., S. Done, C. Livesey, S. MacDonald, D. Chan, R. Sayers, C. Clark and P. Kemp. 2006. Survey of pigs' kidneys with lesions consistent with PMWS and PDNS and Ochratoxicosis Part 2: Pathological and Histological findings. **Vet Rec** 159 (23): 761-768.

Greenlee, J.J., C.A. Bolin , D.P. Alt , N.F. Cheville and C.B. Andrease. 2004. Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. **Am J Vet Res** 65 (8): 1100-1107.

Gregoire, N., R. Higgins and Y. Robinson. 1987. Isolation of leptospires from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. **Am J Vet Res** 48 (3): 370-71.

Herr, S., A.E. Riley, J.A. Neser, D. Roux and J.F. De Lange. 1982. *Leptospira interrogans* serovar pomona associated with abortion in cattle: isolation methods and laboratory animal histopathology. **Onderstepoort J Vet Res** 49: 57-62.

Johnson, R.C. and V.G. Harris. 1967. Antileptospiral Activity of Serum: II Leptospiral Virulence Factor. **J Bacteriol** 93 (2): 513-519.

Kee, S.-H., I.-S. Kim, M.-S. Choi and W.-H. Chang. 1994. Detection of Leptospiral DNA by PCR. **J Clin Microbiol** 32: 1035-1039.

Keenan, K.P., A.D. Alexander and C.A. Montgomery. 1978. Pathogenesis of experimental *Leptospira interrogans*, Serovar bataviae, infection in dog: Microbiological, Clinical Hematologic, and Biochemical studies. **Am J Vet Res** 39 (3): 449-454.

Lai, K.N., I. Aarons, A.J. Woodroffe and A.R. Clarkson. 1987. Renal lesions in leptospirosis. **Am J Vet Res** 48: 370-371.

Laurain, A.R. 1955. Lesions of Skeletal Muscle in leptospirosis : Review of Reports and an Experimental Study American. **J Pathol** 31: 501-519.

Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev** 14: 296-326.

Lupidi, R., M. cinco, D. Balanzin, E. Delprete and P.E. Varaldo. 1991. Selorogical Follow-up of Pateints Involved in a Localized Outbreak of Leptospirosis. **J Clin Microbiol** 29: 805-809.

Marshall, R.B., B.E. Wilton and A.J. Robinson. 1981. Identification of Leptospira serovars by Restriction-Endonuclease Analysis. **J Med Microbiol** 14: 163-166.

Martinez, J., J. Segales, G. Aduriz, R. Atxaerandio, P. Jaro, J. Ortega, B. Peris and J.M. Corpa. 2006. Pathological and aetiological studies of multifocal interstitial nephritis in wasted pigs at slaughter. **Res Vet Sci** 81: 92-98.

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

Maxie, M.G. 1997. The Urinary System, pp. 447-538. *In* Jubb K.V.F., P.C. Kennedy and N. Palmer, eds. **Pathology of Domestic animals.** Harcourt Brace Jovanovich, Toronto.

Merien, F., P. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton and I.S. Girons. 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* sp. in Clinical Samples. **J Clin Microbiol** 30: 2219-2224.

Michel, D.M. and C.J. Kelly. 1998. Acute Interstitial Nephritis. **J Am Soc Nephrol** : 506-515.

Miller, D.A., M.A. Wilson and C.A. Kirkbride. 1989. Evaluation of multivalent Leptospira fluorescent antibody conjugates for general diagnosis. **J Vet Diagn Invest** 1: 146-149.

Miller, D.A., M.A. Wilson and G.W. Beran. 1991. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. **Am J Vet Res** 52 (11): 1761-1765.

Morrison, W.I. and N.G. Wright. 1976. Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to Leptospira canicola. **J Pathol** 120: 83-89.

Myers, D.M. 1985. Leptospirosis. **Manual of laboratory methods for diagnosis.** WHO. Technical Note. No. 30. 9-10.

Nally, J.E., C. Chavit, W. Xiao-Yang, M.C. Fishbein, M.M. Pereira, J.J.P. Silva, D.R. Blanco and M.A. Lovett. 2004. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. **Am J Pathol** 163 (4): 1115-1127.

Niwetpathomwat, A., K. Niwatayakul and G. Doungchawee. 2005. Surveillance of leptospirosis after flooding at Loei Province, Thailand by year 2002. **Southeast Asian J Trop Med Public Health** 36: 202-205.

Oliva, R., J.F. Infante, M. Gonzalez, V. Perez, S. Sifontes, O. Marrero, Y. Valdes, M. Farinas, L. Estevez and I. Gonzalez. 1994. Pathologic-clinical characterization of leptospirosis in a golden Syrian hamster model. **Arch Med Res** 25: 165-170.

Prescott, J.F., R.B. Miller and V.M. Niclolson. 1987. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slaughter. **Can J Vet Res** 51: 229-231.

Prescott, J.E., B. McEwen, J. Taylor, J.P. Woods, A. Abram-Ogg and B. Wilcock. 2002. Resurgence of Leptospirosis in dogs in Ontario: Recent findings. **Can Vet J** 43 (12): 955-961.

Quinn, P.J., M.E. Carter, B.K. Markey and G.R. Carter . 1994. The Spirochaetes, pp. 292-299. **Clin Vet Microbiol.** Wolfe, London.

Romero, E.C., A.E.C. Billerbeck, V.S. Lando, E.D. Camargo, C.C. Souza and P.H. Yasoda. 1998. Detection of Leptospira DNA in Patients with Aseptic Meningitis by PCR. **J Clin Microbiol** 36: 1453-1455.

Rossetti, C.A., B.N. Vanasco, N. Pini and J.C. Carfagnini. 2004. Comparison of three diagnostic techniques for the detection of leptospires in te kidneys of Wild House Mice (Mus musculus). **Preq Vet Braz** 24 (1): 6-10.

Ruhl-Fehlert, C.I., S. Brem, W. Feller, H. Kopp, P. Meyer and M. Rinke. 2000. Clinical, microbiological and pathological observations in laboratory beagle dogs infected with leptospires of the serogroup Sejroe. **Exp Toxicol Pathol** 52: 201-207.

Saadi, M.L. and G. Post. 1976. Rodent Leptospirosis in Colorado. **J Wildl Dis** 12: 315-317.

Scanziani, E., G. Sironi and G.Mandelli. 1989. Immunoperoxidase studies on Leptospiral Nephritis of Swine. **Vet Pathol** 26: 442-444.

Shin, S.J., Y.F. Chang, R.H. Janobsom, E. Shaw, T.L. Lauderdale, M.J. Appel and D.H. Lein. 1993. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other Spirochaetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. **Vet Microbiol** 36 (1-2): 161-174.

Silva, F.G.D., J.C.d. Freitas, E.K. Anzai, V.Y. Hashimoto, N. Giraldi, A.C.B. Delbem, A.F.R.L. Bracarense, A.C.F.d. Reis and S.A. Vasconcellos. 2005. Leptospires Detection in kidney, Liver and Uterus of cows slaughtered in Parana State, Brazil. **Braz J Microbiol** 36: 38-42.

Skilbeck, N.W., W.M. Forsyth and M. Dohnt. 1988. Bovine leptospirosis: Microbiology and histological findings in cattle at slaughter. **Aust Vet J.** 65 (3): 73-75.

Slee, K.J., S. McOrist and N.W. Skilbeck. 1983. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. **Aust Vet J**. 60: 204-206.

Simon , M.C., C. Ortega, J.L. Alonso, O. Girones and J.L. Muzquiz. 1999. Rick factor associated with the seroprevalence of Leptospirosis among students at the veterinary school of Zaragosa University. **Vet Rec.** 144(11):287-91.

Smith, C.R., M.R. McGowan, C.S. McClintock, B.G. Corney, P.J. Ketterer, L. Smythe and W. Ward. 1997. Experimental *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection of pregnant cattle. **Aust Vet J** (75): 822-826.

Solbrig, M.V., J.H. Sher and R.W. Kula. 1987. Rhabdomyolysis in leptospirosis (Weil's disease). **J Infect Dis** 156: 692-693.

Steinen, A.C.M., J.L. Schuurman, C. Gravekamp, H. Korver and W.J. Terpstra. 1992. Muskrats as carriers of pathogenic leptospires in The Netherlands. **Antonie van Leeuwenhoek** 61: 43-50.

Terpstra, W.J., G.S. Ligthart and G.J. Schoone. 1985. ELISA for the detection of Specific IgM and IgG in human Leptospirosis. **J Gen Microbiol** 131: 377-385.

Terpstra, W.J., R.A. Hartskeerl, H.L. Smits and H.K. Korver. 1998. Laboratory diagnosis, pp. 21-85. *In* **international course in medical research** . WHO/FAO Collaborating Center for reference and research on leptospirosis.

Terpstra, W.J. 2003. **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.** WHO Library, Malta.

Thiermann, A.B. 1983. Bovine leptospirosis: Bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter. **Am J Vet Res** 44 (12): 2244-2245.

Timoney, J.F., J.H. Gillespia, F.W. Scott and J.E. Barlougn. 1988. The genus Leptospira, pp. 48-57. **Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animal.** Comstock, Ithaca.

Tripathy, D.N. and L.E. Hanson. 1974. Immunoperoxidase Staning of Leptospires. **Appl Microbiol** 27: 268-269.

Uzal, F.A., B. Dobrenov, L. Smythe, M. Norris, M. Dohnt, M. Symonds, D. O'Boyle, F. Schouten and W.R. Kelly. 2002. A study "white spotted kidney" in cattle. **Vet Microbiol** 86: 369-375.

Van-Eys, G.J.J.M., C. Gravekamp, M.J. Gerritsen, W. Quint, M.T.E. Cornelissen, J.T. Schegget and W.J. Terpstra. 1989. Detection of Leptospires in urine by Polymerase Chain Reaction. **J Clin Microbiol** 27: 2258-2262.

Van den Ingh, T.S. and E.G. Hartman. 1986. Pathology of acute Leptospira interrogans serotype icterohaemorrhagiae infection in the Syrian hamster. **Vet Microbiol** 12: 367-376.

Venugopal, K. and S. Ratnam. 1990. Lesions and immune responses produced in hamsters and guinea pigs inoculated with some strains of leptospira. **Indian J Exp Biol** 28: 1075-1077.

Watt, G. 1997. Leptospirosis: Current Opinion in Infectious Diseases. **Rapid Science Publisher.** 10: 149-152.

White, F.H., K.R. Sulzer and R.W. Engel. 1982. Isolations of Leptospira interrogans serovars hardjo, balcanica and pomona from cattle at slaughter. **Am J Vet Res** 43 (7): 1172-1173.

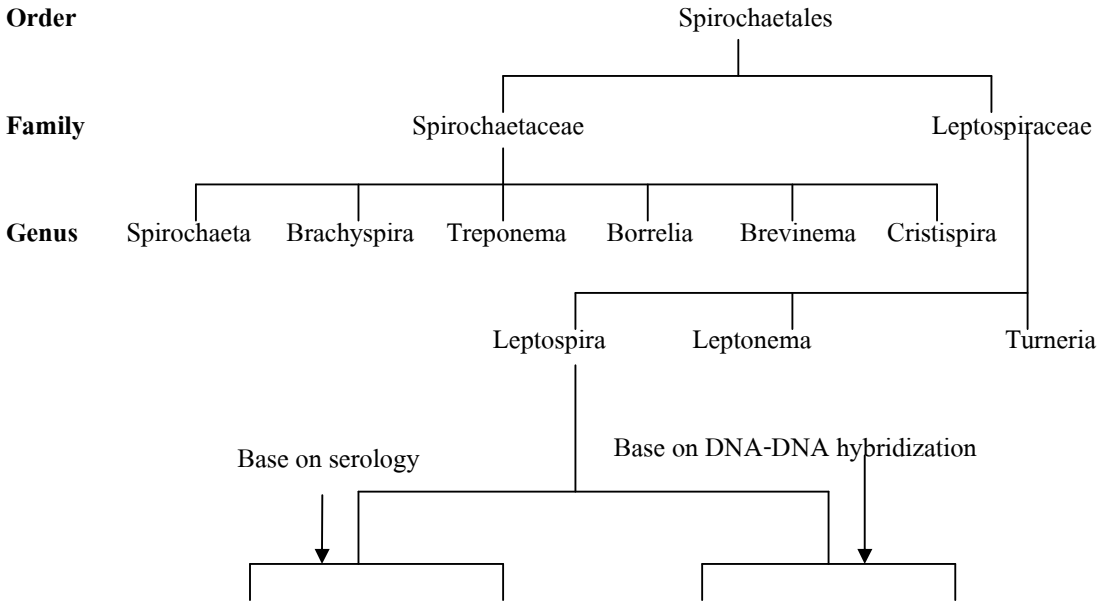
Yang, C.W., M.S. Wu and M.J. Pan. 2001. Leptospirosis renal disease. **Nephrol Dial Transplant** 16 (5): 73-77.

Yang, H.-L., X.-C. Jiang, X.-Y. Zhang, W.-J. LI, B.-Y. HU, G.-P. Zhao and X.-K. Guo. 2006. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation. **BMC Infect Dis** 6: 1-9.

Yener Z. and H. Keles. 2001. Immunoperoxidase and Histopathological Examinations of Leptospiral Nephritis in cattle. **J Vet Med** 48: 441-447.

ภาคผนวก

การจัดจำแนกเชื้อ Leptospires



ที่มา: Bharti *et al*. (2003)

ภาพผนวกที่ 1 แสดงการจำแนกเชื้อ Leptospires

ตารางผนวกที่ 1 แสดงการจำแนก Serovar ของแต่ละ Species ของเชื้อ Leptospires

Species	Serogroup	Serovar
1. L. interrogans	Australis	aystralis, Bangkok, Bratislava, Fugis, Hawaian, Jalna, Lora, Muenchen, Wewak
	Autumnalis	austumnalis, Bankinang, Bulgarica, Carlos, Mooris, rachmati,weerasinghe
	Bataviae	bataviae, losbanos, paidjan, 21-74, 26-73
	Canicola	benjamini, bindjei, broomi, canicola, dukou, jonsis, kuwait, Portlandvere, Qunjian, Schueffneri, Sumneri
	Djasiman	djasiman, Gurungi, Sentot
	Grippotyphosa	gippotyphosa, liangguang, muelleri, valbuzzi, dadas
	Hebdomadis	hebdomadis, Kremastos
	Hurstbridge	hurstbridge
	Icterohaemor-rhagiae	birkini, budapest, copenhageni, gem, honghe, icterohaemorrhagiae, lai, mankarso, monymusk, mwogolo, naam, nanxi, smithi, 82224
	Louisiana	louisiana, lanka
	Mini	szwajizak
	Panama	mangus
	Pomona	pomona
	Pyrogenes	abramis, biggis, camlo, guaratuba, manilae, robinsoni, zanoni, Pyrogenes
	Ranarum	evansi
	Sarmin	waskurin
	Sejroe	geyaweera, haemolytica, hardjo, jin, medanensis, recreo, ricardi, romanica, wolfii, unipertama

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Species	Serogroup	Serovar
1. L. interrogans (ต่อ)	New	AGC
2. L. weilii	Celledoni	celledoni, hainan, mengdeng
	Hebdomadis	longman
	Javanica	mengrun, mengma, coxi
	Manhao	qingshui
	Mini	hekou
	Pyrogenes	menglian
	Sarmin	sarmin
	Sejroe	unipertama
	Tarassovi	langati, mogdeni, vughia
3 L. inadai	Canicola	malaya
	Icterohaemor-rhagiae	icterohaemorrhagiae
	javanica	27-75
	Lyme	lyme
	Manhoa	lichuan, lincang
	Panama	mangus
	Shermani	aguaruna
	Tarassovi	kaup
	New	biflexa
4 L. santarosai	Autumnalis	alice
	Ballum	peru
	Bataviae	balboa, bataviae, brasiliensis, kobbe, rioja
	Cynopteri	naparuca, tingomaria
	Grippotyphosa	bananal, canalzonae
	Hebdomadis	abrahamson, boroncana, figeiro, goiano, kremastos, maru, sanmartini, 87-029496
	Javanica	fluminense, may, vargonicas
	Mini	beye, georgia, ruparupae, szwajizak, tabaquite
	Pomona	dania, tropica

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Species	Serogroup	Serovar
4. L. santarosai (ต่อ)	Pyrogenes	alexi, bagua, cenepa, princestown, pyrogenes, varela
	Sarmin	machiguenga, rio, weaveri
	Sejroe	caribe, gorgas, guaricura, trinidad, X 47
	Shermani	babudieri, luis, shermani
	Tarassovi	aguatica, atchafalaya, atlantae, bakeri, bravo, chagres, darien, gatuni, navet, rama, sulzerae
	New	bananal, peru, wawain
5 L. meyeri	Javanica	sofia
	Mini	perameles
	Sejroe	ranarum, hardjo
	Semaranga	semaranga
6 L. noguchii	Australis	bajan, barbudensis</B, nicaragua, peruviana, rushan
	Autumnalis	fortbragg
	Bataviae	argentiniensis, claytoni
	Djasiman	huallaga
	Louisiana	louisiana, orleans
	Mini	beye
	Panama	cristobali, panama
	Pomona	pomona, proechimys
	Pyrogenes	myocastoris
	Shermani	carimagua
	Tarassovi	bac 1376
	New	83-015437, 84-011370
7 L. borgpetersenii	Australis	pina
	Autumnalis	srebarna
	Ballum	arborea, ballum, guangdong, castellonis, kenya, soccoestomes

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Species	Serogroup	Serovar
7. L. borgpetersenii	Bataviae	moldaviae
	Celledoni	anhoa, whitcombi
	Hebdomadis	jules, nona, worsfoldi
	Javanica	ceylonica, dehong, harbola, javanica, menoni, poi, serex jalna, yaan, zhenkang, 52-73
	Mini	mini
	Pyrogenes	hamptoni, kwale
	Sejroe	balcanica, balcanica, dikkeni, hardjo, istrica, nero,polonica, sejroe
	Tarassovi	gengma, guidae, kanana, kisuba, tarassovi,tunis, yunxian
8. L. kirschneri	Australis	ramisi, bim, bulgarica, butembo, erinaceiauriti, lambwe, mujunkumi
	Bataviae	djatzi, bafani
	Canicola	bjani, galtoni,kamituga, sumneri
	Cynopteri	cynopteri
	Djasiman	agogo, vanderhoedeni,
	Grippotyphosa	grippotyphosa, ratnapura, vanderhoedeni,valbuzzi
	Hebdomadis	kambale, kabura
	Icterohaemor-rhagiae	mwogolo, ndahambukuje, ndambari, bogvere, dakota
	Pomona	kunming, mozdok,tsaratsovo
9 L. fainei	Hurstbridge	Hurstbridge
10 L. alexanderi	Manhao	Manhao 3
Leptospira genomospecies 2	Hebdomadis	manzhuang, nanding
	Javanica	mengla
	Manhao	lushui, manhao 3
	Mini	yunnan

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Species	Serogroup	Serovar
11.Leptospira genomospecies 1	Ranarum	pingchang
	New	sichuan
12.Leptospira genomospecies 3	New	holland
13.Leptospira genomospecies 4	Icterohaemoly - ticus	hualin
14.Leptospira genomospecies 5	Semaranga	saopaulo
15.L. biflexa	Andamana	andamana
	Semaranga	patoc
16.L. wolbachii	Codice	codice
	New	gent
17.L.pavar		

ที่มา: Levett (2001)

<u>การเตรียมสารเคมีและวิธีการย้อมทางฟาราฟินเทคนิค</u>

Adhesive

การเตรียม Mayer's egg albumin

ไข่ขาว	50	มิลลิลิตร
Glycerin	50	มิลลิลิตร
Thymol	2-3	เกร็ด

การผสมไข่ขาวและ Glycerin เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1:1 แล้วคนจนไข่ขาวลอยขึ้น นำไปกรองด้วยกระดาษกรองชนิดหยาบ หรือผ้าขาวบางซ้อนกันหลายๆชั้น ใส่ Thymol 2-3 เกร็ด เพื่อกันเชื้อรา เมื่อเตรียมเสร็จใช้ได้เลยและการเก็บรักษาควรเก็บในตู้เย็น

Fixative

10 % Neutral buffer formalin

37-40% formaldehyde	100	ml.
distilled water	900	ml.
sodium phosphate monobasic ($Na_2H_2PO_4$)	4	gm.
sodium phosphate dibasic, anhydrous(Na_2HPO_4)	6.5	gm.

สูตรของน้ำยาคงสภาพที่เป็นที่นิยมแพร่หลายในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปได้แก่ สารละลาย 10 % Neutral buffer formalin ระยะเวลาในการคงสภาพ 24 ชั่วโมงหรือถ้านานกว่านั้นก็ได้ แต่อาจเกิดเม็ดสีของฟอร์มาลิน (formalin pigment) เป็นตะกอนสีน้ำตาลตกค้างในเนื้อเยื่อ

การเตรียมสีย้อม Harris's Hematoxylin & Eosin (Luna, 1968)

Harris hematoxylin

hematoxylin crystals	5	gm.
absolute ethyl alcohol	50	ml.
Ammonium alum หรือ potassium	100	gm.
Mercuric oxide (red)	2.5	gm.

น้ำกลั่น	1,000	ml.
Glacial acetic acid	2-4	ml.

ต้มน้ำกลั่นให้เดือดแล้วเติม Ammonium alum คนให้ละลาย ละลายผง haematoxylin ใน absolute alcohol แล้วเติมลงในสารละลายที่เดือดแล้วโดยยกออกจากความร้อน ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน หลังจากนั้น ยกขึ้นตั้งบนเตา ต้มประมาณ 1 นาที ใช้แท่งแก้ว คนตลอดเวลา แล้วยกลง ค่อยๆเติม mercuric oxide (สีแดง) ลงช้าๆ คนให้สารละลายเข้ากัน จะต้องคนจนกระทั่งฝ้าที่ลอยอยู่บนผิวหน้าสารละลายหายไป แล้วยกกลับไปตั้งบนเตาใหม่ จนกระทั่งเดือด กลายเป็นสีม่วงเข้ม ยกลงจากเตา แล้วแช่ลงในภาชนะที่มีน้ำเย็นหล่อจนเย็น พร้อมนำไปใช้ ก่อนใช้เติม Glacial acetic acid 2-4 มิลลิลิตร/100 มิลลิลิตรของสารละลาย ก่อนใช้ต้องกรองสีก่อน และสีควรเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

Eosin solution

1 % stock alcoholic Eosin

Eosin Y (water soluble)	1	gm.
น้ำกลั่น	20	ml.

ละลายเข้าด้วยกัน แล้วจึงเติม 95 %Ethyl alcohol 80 ml.

Working solution

Stock Eosin solution	1	ส่วน
Ethyl alcohol 80%	3	ส่วน

ก่อนใช้งานเติม Glacial acetic acid 0.5 ml.ต่อ 100 ml. ของสีที่เตรียม

Saturated lithium carbonate (Li_2CO_3)

น้ำกลั่น	100	ml.
Lithium carbonate	1	gm.

Lithium carbonate ใส่ลงในน้ำกลั่นจนกระทั่ง lithium carbonate ไม่ละลายในน้ำกลั่นแล้ว

Acid alcohol

แอลกอฮอล์ 95%	500	ml.
Hydrochloric acid เข้มข้น	5	ml.

Ammonium water

น้ำประปา	1000	ml.
28% Ammonium hydroxide	2-3	ml.

วิธีการย้อมสี Harris Hematoxylin & Eosin

1. นำ paraffin section ไป deparaffinized ใน Xylene I และ Xylene II อย่างละ 5 นาทีและ hydration ใน ethyl alcohol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ จนถึงน้ำกลั่น การใช้งานประจำวันสำหรับการย้อมสี เมื่อย้อมประมาณ 180 แผ่นสไลด์ ควรจะเปลี่ยนชุดการย้อมใหม่ (Prophet, 1994)

2. แช่ใน Harris's hematoxylin 5-8 นาที (การตรวจสอบสีดูได้จากก่อนการกรองเพื่อใช้งานจะสังเกตสีจะขึ้นฝ้าเป็นสีเหลือบ แสดงว่าสียังสามารถใช้งานได้)

3. running water จนไม่มีสีน้ำเงิน ปนละลายในน้ำ นาน 1-2 นาที

4. จุ่มใน 1 % acid alcohol โดยจุ่ม 1-2 ครั้งเร็วๆ

5. running water นาน 1 นาที

6. จุ่มใน Ammonia water 1 นาที (กรณีการติดสี Hematoxylin ซีดอาจจะเพิ่มเวลาตรงส่วนนี้เพื่อให้สีเข้มขึ้นได้)

7. running water นาน 1 นาที

8. แช่ใน Eosin solution 2 นาที

9. Dehydration (เริ่มจาก 70% แอลกอฮอล์ โดยการจุ่มแค่หนึ่งหรือสองครั้ง ส่วน 95% แอลกอฮอล์ และ แอบโซลูทแอลกอฮอล์ แช่ 2 นาทีตามวิธีการ) และ clearing ใน Xylene

10. mount ด้วย Permount® (ก่อนการใช้งาน permount®ควรเติม Xylene เพื่อไม่ให้หนืดจนเกินไป) การ mount สไลด์ ควรเช็ดน้ำยารอบๆแผ่นสไลด์ออกและหยด Permount ลงด้านข้างของเนื้อเยื่อ ค่อยๆวางแผ่นกระจกปิดสไลด์ เอียงทำมุม 45 องศา ค่อยๆกดกระจกลงเพื่อเป็นการไล่ฟองอากาศออกไปด้วย จากนั้นทำความสะอาดรอบๆ แผ่นสไลด์ด้วย Xylene และนำไปวางบน Slide wormer เพื่อให้แห้งและไล่ฟองอากาศออกด้วยผลของการย้อมสี

นิวเคลียส ติดสีน้ำเงินม่วง

ไซโตพลาสซึม ติดสีชมพู แดง

การย้อมสี Spirochaete ด้วยวิธี Silver Impregnation

สารเคมี

1. Buffer solution

A) Sodium acetate solution

Sodium acetate	16.4 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

B) Acetic acid

Glacial acetic acid	11.8 มล.
เติมน้ำกลั่นให้สารละลายได้ปริมาณ	1 ลิตร

C) เตรียมสารละลาย Buffer Solution pH 3.6

Sodium acetate solution	1.5 มล.
Acetic acid	18.5 มล.
เติมน้ำกลั่น	480 มล.

2. Developer solution

0.15% Hydroquinone solution

Hydroquinone	0.15 g
Buffer solution	100 ml

5% Gelatin solution

Gelatin	10 g
Buffer solution	200 ml

2% Silver nitrate

Silver nitrate	2 g
Buffer solution	100 ml

วิธีการย้อมสี Warthin-Starry

1) ล้างพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อโดยการจุ่มใน Xylene แล้ว Hydration ด้วย 100%Alcohol, 95%Alcohol, 70%Alcohol และล้างด้วยน้ำประปา ตามลำดับ

2) แช่เนื้อเยื่อลงใน 1%Silver nitate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ระหว่างนั้นให้เตรียม Developer solution

3) แช่เนื้อเยื่อลงใน Developer solution ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทอง

4) ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แล้วแช่ลงใน Buffer solution

5) นำเนื้อเยื่อมา Dehydrate, Clearing และ Mount

ผลของการย้อมสี

Spirochaete ติดสีดำ
เนื้อเยื่อโดยทั่วไปติดสีน้ำตาลเหลือง

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

EMJH เป็นอาหารเฉพาะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อ Leptospires แม้จะมีขั้นตอนและวิธีการเตรียมที่ซับซ้อน ยุ่งยาก แต่การเตรียมแต่ละครั้งเราสามารถเตรียมไว้ใช้ได้ในปริมาณมากๆ และสามารถเก็บไว้ใช้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลานาน สำหรับอาหารที่กล่าวในที่นี้ เป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเองตามวิธีการของห้องปฏิบัติการของห้องปฏิบัติการอ้างอิงประเทศเนเธอร์แลนด์

สารเคมี :

- Na_2HPO_4
- NaCl
- Thiamine B1
- Bovine Serum Albumin Fraction V
- $MgCl_2.6H_2O$
- $CuSO_4.5H_2O$
- $ZnSO_4.7H_2O$
- Vitamin B12 (cyanocobalamine)
- Tween 80
- Na-pyruvate
- KH_2PO_4
- NH_4Cl
- Glycerol
- $CaCl_2.2H_2O$
- $FeSO_4.7H_2O$

การเตรียม Stock Solution

Albumin fatty acid supplement stock solution

Reagents	Grams per 100 ml distilled water	Storage
$CaCl_2.2H_2O+MgCl_2.6H_2O$	1.0(each)	-20°C
$ZnSO_4.7H_2O$	0.4	-20°C
$CuSO_4.7H_2O$	0.3	-4°C
Vitamin B12	0.02	-20°C
Tween 80	10	-20°C

Basal medium stock solution

Reagents	Grams per 100 ml distilled water	Storage
NH_4Cl	25.0	-20°C
Thiamine	0.5	-20°C
Na-pyruvate	10.0	-20°C
Glycerol	10.0	-20°C

หมายเหตุ: สารละลายข้างบนไม่ต้องปรับ pH

1. วิธีเตรียม Albumin fatty acid supplement

- ละลาย Bovine serum albumin fraction V 10 กรัมในน้ำกลั่น 50 มล. โดยใช้ Magnetic stirrer พยายามอย่างให้เกิดฟองอากาศ ในขณะเดียวกันค่อยๆเติม Stock solutions ต่อไปนี้

$CaCl_2.2H_2O+MgCl_2.6H_2O$	1.5	มล.
$ZnSO_4.7H_2O$	1	มล.
$CuSo_4.5H_2O$	0.1	มล.
$FeSO_4.7H_2O$	0.05	มล.
Vitamin B 12	1	มล.
Tween 80	12.5	มล.

- ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 1 N NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มล.
- ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

2. วิธีเตรียม Basal medium

- เตรียมน้ำกลั่น 996 มล.เติมสารดังต่อไปนี้

Na_2HPO_4	1.0	กรัม
KH_2PO_4	0.3	กรัม
NaCl	1.0	กรัม

- หลังจากที่เกลือต่างๆละลาย เติม Stock solutions ต่อไปนี้

NH_4Cl	1.0	มล.
Thiamine	1.0	มล.
Na-pyruvate	1.0	มล.
Glycerol	1.0	มล.

- ปรับ pH เป็น 7.4
- ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

การเตรียมอาหาร EMJH ชนิดเหลว (Liquid medium)

- ผสม Albumin fatty acid supplement (A) 1 ส่วน ใน Basal medium 9 ส่วน เช่นAlbumin fatty acid acid supplement 100 มล. ใน Basal medium 900 มล.
- เขย่าเบาๆให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดเพาะเลี้ยงเชื้อหลอดละ 5 มล.
- เมื่อใส่เชื้อแล้วนำไปเพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร EMJH ชนิดกึ่งเหลว (Semisolid medium)

- เติม agar 2.0 กรัมลงใน basal medium (B) 900 มล.
- ต้มจน Agar ละลาย
- ทำให้ปราศจากเชื้อ โดย Autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที
- อุ่นให้ water bath ที่ 50 องศาเซลเซียส เติม Albumin fatty acid supplement (A) ที่อุ่นไว้ก่อนแล้วที่ 50 องศาเซลเซียสลงไป 100 มล.
- เขย่าเบาๆให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดเพาะเชื้อหลอดละ 5 มล.
- เมื่อใส่เชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การเตรียมอาหาร Selective medium สำหรับเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างที่อาจมีการปนเปื้อน โดยการเติม 5-fluorouracil (5-FU) 100 mg/ml.

การเตรียม Stock solution 5 FU:

- ใส่ 5-FU 1.0 กรัมลงใน น้ำกลั่น 50 มล.
- เติม 2N NaOH ลงไป 1.0-2.0 มล.
- วางลงบน Hot plate ให้ความร้อนเล็กน้อยเพื่อช่วยการละลายของ 5-FU
- ปรับ pH เป็น 7.6 และปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น
- ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน

วิธีเตรียม Selective medium สามารถเตรียมได้ 2 วิธี คือ

- เติม Stock solution 5-FU 0.1 มล. ในอาหาร 10 มล.จะได้ความเข้มสุดท้ายของ 5 FU เท่ากับ 100 ไมโครกรัม / มล. หรือ
- เติม Stock solution 5-FU 20 มล. ที่ยังไม่ได้ผ่านการกรอง ลงใน Albumin fatty acid supplement (A) ก่อนการทำให้ปราศจากเชื้อ

ตารางผนวกที่ 2 ค่าอ้างอิงปกติของเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดของโค

ค่าเลือด	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
Hematocrit (%)	24 – 46	35
Hemoglobim (g/dl)	8 – 15	11.0
RBC ($x10^6$/ml)	5.0 – 10.0	7.0
MCV (fl)	40 – 60	52.0
MCHC (g/dl)	30 – 36	33.0
MCH (pg)	13.7 – 18.2	14.0
เกล็ดเลือด ($x10^3$/ml)	100 - 800	500

ที่มา: เฉลียว (2540)

ตารางผนวกที่ 3 ค่าเม็ดเลือดขาวของโค

ค่าเม็ดเลือดขาว	จำนวนเม็ดเลือดขาว/ml		เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาว	
	พิสัย	ค่าเฉลี่ย	พิสัย	ค่าเฉลี่ย
Leukocyte	4,000 – 12,000	8,000		
Neutrophil (band)	0 – 120	20	0 – 2	0.5
Neutrophil (segmenter)	600 – 4,000	2,000	15 – 45	28
Lymphocyte	2,500 – 7,500	4,500	45 – 75	58
Monocyte	25 – 850	400	2 – 7	4
Eosinophil	0 – 2,400	700	0 – 20	9
Basophil	0 - 200	50	0 - 2	0.5

ที่มา: เฉลียว (2540)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวดาวรุ่ง ศิลาอ่อน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 กุมภาพันธ์ 2523
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาสาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2545
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	อาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2549