

รายงานการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์
รหัสโครงการ P13-50120

ชื่อโครงการ (ไทย) การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปรา ที่แยกได้จากผู้ป่วย สัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ สัตว์ในธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมในเขตจังหวัดน่าน และ การศึกษาการทดลองการติดเชื้อโรคเลปโตสไปโรสิสที่แยกได้จากผู้ป่วยใน วัว และสุกร

(อังกฤษ) The study of genotype of Leptospira in patient, companion animals, carrier animals, wild animals and environment in Nan province and experimental infection of human isolate leptospirosis in cattles and pigs

ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ปานเทพ รัตนการ
หน่วยงานที่สังกัด คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

หัวหน้ากลุ่มวิจัยร่วมท่านที่ 1 รศ. กัลยาณี ดวงฉวี
หน่วยงานที่สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

หัวหน้ากลุ่มวิจัยร่วมท่านที่ 2 รศ. ดร. อนุวีร์ ประภัสระกุล
หน่วยงานที่สังกัด คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่มาของทุนวิจัย สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สำหรับทุนวิจัยในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณนายสัตวแพทย์ เจ้าหน้าที่สาธารณสุข รวมถึงชาวบ้านในพื้นที่จังหวัดน่าน สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และการประสานงานตลอดระยะเวลาของการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความช่วยเหลือในครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณอาจารย์ นิสิต และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับข้อแนะนำ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง ขอขอบพระคุณอาจารย์วรรณพร วุฒิเอกอนันต์ และเจ้าหน้าที่แห่งหน่วยวิจัยโรคเขตร้อนมหิดล-อ็อกฟอร์ด คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับองค์ความรู้ในการเพาะแยกเชื้อ และการตรวจเชื้อเลปโตสไปรา

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าความรู้ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในแง่ของข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิส เพื่อนำไปสู่การควบคุม และป้องกันโรคนี้ได้ในอนาคต

ทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ขอแสดงความขอบคุณสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุขที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย และทีมวิจัยขอแสดงความขอบคุณผู้ให้ความช่วยเหลือในส่วนของการลงพื้นที่เพื่อติดตามผู้ป่วยโรคนี้ และเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วย สัตว์ และสิ่งแวดล้อมในเขตจังหวัดน่าน โดยมีรายชื่อดังต่อไปนี้

คุณเคิ่ง คำรังสี เจ้าหน้าที่ระบาดวิทยา สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดน่าน ผู้ให้ข้อมูลผู้ป่วยในพื้นที่

นายแพทย์ดีเรก สุตแดน ผู้อำนวยการโรงพยาบาลท่าวังผาและคุณณภรณ์ ฝ่ายนันทะ หัวหน้าห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลท่าวังผา นายจรัญ ดวงธิและทีมห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลท่าวังผา ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ของอำเภอท่าวังผา

นายวินัย พุฒปี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล (รพ.สต.) บ้านสบซุ่น ตำบลป่าคา อำเภอท่าวังผา และเจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. บ้านสบซุ่น ทีมอาสาสมัครสาธารณสุขประจำหมู่บ้าน (อสม.) และชาวบ้านหมู่บ้านสบซุ่น ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ศึกษา ณ บ้านสบซุ่น ตำบลป่าคา อำเภอท่าวังผา

นายสุวิทย์ ไชยวิโน นักวิชาการสาธารณสุขชำนาญการ สาธารณสุขอำเภอ (สสอ.) เชียงกลาง ผู้ประสานงานกลาง อ. เชียงกลาง นายวรกรณ์ เชื้ออนชนะ ผู้อำนวยการ รพ.สต. เชียงคาน ทีมเจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. เชียงคาน และทีม อสม. ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ อ. เชียงกลาง

นายพิเชียร บุตแกร สสอ. เมืองน่าน ผู้ประสานงานกลาง อ. เมืองน่าน นายพีระวัฒน์ บุญเทพ เจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. ผาสิงห์ ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. ผาสิงห์ นางพรพิมล ร้านชิตวงศ์ และ นางดวงสมร วงศ์ฉายา เจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. ถืมตอง และทีม ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. ถืมตอง
นายวิเชียร อินตะ เจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. ไชยสถาน ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. ไชยสถาน

นายสงกรานต์ เสนนันตา สสอ. ภูเพียง ผู้ประสานงานกลาง อ. ภูเพียง นางศุภลักษณ์ เสนนันตา และนายสวาท มานัน เจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. นาบึง ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. นาบึง อ. ภูเพียง

นายบรรจง จันทรอินทร์ สสอ. เวียงสา ผู้ประสานงานกลาง อ. เวียงสา นายสมคิด พิมพบุตร เจ้าหน้าที่ประจำ รพ.สต. บ้านนาเคียน ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. จอมจันทร์เหนือ อ. เวียงสา

นางสาวบุญยวีร์ กาวีณู พยาบาลวิชาชีพ โรงพยาบาลนาหมื่น ผู้ประสานงานกลาง อ. นาหมื่น และเป็นผู้ให้ข้อมูล และช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. บ่อแก้ว นางสาวนฤมล ฐปะละ เจ้าหน้าที่งานทันตสาธารณสุขชำนาญงาน รพ.สต. ปิงหลวง ผู้ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการลงพื้นที่ ต. ปิงหลวง

และขอขอบคุณผู้ป่วยโรคนี้ทุกคนที่ให้ความรู้แก่โครงการ

นอกจากนี้ทีมวิจัยขอขอบคุณผู้ให้ความช่วยเหลือการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ โดยมีรายนามดังต่อไปนี้
นางวรรณพร วุฒิเอกอนันต์ นักวิจัยอาวุโส และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัย Mahidol-Oxford Research Unit (MORU) ผู้ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเรื่องการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา

ดร. จันจิรา ไทยผดุงพานิช นักวิจัยอาวุโส หน่วยวิจัย Mahidol-Oxford Research Unit (MORU) ผู้ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเรื่องเทคนิคการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MLST

สัตวแพทย์หญิง ดร. ดวงใจ สุวรรณเจริญ หัวหน้าศูนย์เลปโตสไปโรซิส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เลปโตสไปโรซิส ผู้ให้ความช่วยเหลือในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี MAT

รองศาสตราจารย์ ดร. รศนา วงศ์รัตนชีวิน อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และนายจรัส แก้วแรมเรือน นักวิจัย ศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผู้ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในหนูแฮมสเตอร์

บทคัดย่อ

โรคฉี่หนู หรือ “leptospirosis” เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่สำคัญ ซึ่งพบการระบาดของโรคได้ในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การระบาดที่เกิดขึ้นในแต่ละประเทศและแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่พบและ แหล่งรังโรค (reservoir host) ประจำท้องถิ่นนั้นๆ ดังนั้นข้อมูลความเชื่อมโยง ของเชื้อที่พบในแหล่งรังโรคในพื้นที่ที่พบการระบาดของโรค จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญและจำเป็นในการนำไปใช้ประกอบกับข้อมูลการศึกษาของเชื้อที่ได้จากคน สัตว์และสิ่งแวดล้อมในพื้นที่เดียวกันเพื่อทำความเข้าใจวงจรการติดต่อของโรคและเข้าใจปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างเชื้อกับคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม ให้ดียิ่งขึ้น ตามแนวทางการแก้ปัญหาแบบสุขภาพหนึ่งเดียว (One Health approach)

ด้วยเหตุนี้กลุ่มวิจัยจึงเสนอแนวทางการวิจัยที่มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปรา ที่แยกได้จากผู้ป่วย ปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ในธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมในเขตจังหวัดน่าน ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบโรคฉี่หนูเป็นประจำ โดยเป็นการค้นหาตัวเชื้อเลปโตสไปรา ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ รวมถึงสัตว์เลี้ยงของผู้ป่วย ปศุสัตว์ สัตว์ป่า และสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในพื้นที่เดียวกันกับผู้ป่วย และทำการสำรวจหาตัวเชื้อ ในสัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ สัตว์ในธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม ในพื้นที่เป้าหมายอย่างต่อเนื่องเป็นประจำตลอดระยะเวลาการศึกษา 2 ปี โดยตัวอย่างตรวจจะถูกทำการวินิจฉัยโดยวิธีการเพาะแยกเชื้อและPCR ตัวอย่างซีรัมจะถูกตรวจด้วยวิธี MAT และ immunoblotting เพื่อตรวจหา serovar เชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จะนำมาทำการศึกษา genome fingerprint ของเชื้อด้วยวิธี MLST และ PFGE ผลการศึกษาพบว่า ในพื้นที่จังหวัดน่านซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา โดยพบสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่สามารถระบุชนิดได้หลักๆ ได้แก่ *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. kmetyi* ซึ่งทั้งหมดเป็น pathogenic *Leptospira* จากข้อมูลของต้นไม้ไฟโลเจเนติกพบความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากคนและหนู แต่พบว่าจากข้อมูลของ MLST พบว่าเชื้อที่แยกได้จากคน, สัตว์ และสิ่งแวดล้อม มีต้นกำเนิดหรือที่มา (Clone) ที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของ PFGE ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาถึงลักษณะของการติดเชื้อและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราในสุกรและวัว โดยทำการ inoculate สัตว์ด้วยเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศไทย เพื่อศึกษาธรรมชาติของการติดเชื้อ พยาธิวิทยาจากการติดเชื้อ และความสามารถของสุกรและวัวในการปล่อยเชื้อเลปโตสไปรา รวมถึงรูปแบบทางซีรัมวิทยาของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสุกรและวัวที่ติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วย เพื่อที่จะช่วยให้ทราบถึงความสามารถในการเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อเลปโตสไปรา ที่ก่อโรคในคน ระยะเวลาและปริมาณในการปล่อยเชื้อ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันหลังการติดเชื้อ ผลการทดสอบในสุกรพบสัตว์ทดลองมีการตอบสนองทางซีรัมวิทยาหลังได้รับเชื้อ แต่ไม่พบตัวเชื้อในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ รวมถึงไม่พบตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในอวัยวะของสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาของโครงการจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสภายในประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อเลปโตสไปรา, จังหวัดน่าน, ประเทศไทย, สุขภาพหนึ่งเดียว

บทคัดย่อ (โครงการย่อยที่ 1.2)

จังหวัดน่านเป็นจังหวัดหนึ่งของประเทศไทยที่พบอุบัติการณ์ของการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสในคน และพบความมีความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากหนูและคน แต่ยังคงขาดข้อมูลในส่วนของสัตว์ชนิดอื่น เช่น โค สุนัข วัว วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้คือ เพื่อตรวจหาเชื้อและเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา MAT วิธีทางอนุชีวโมเลกุล *rrs* nested PCR และการเพาะแยกเชื้อ ระบุชนิดของเชื้อด้วยวิธี near-full length 16S *rRNA* sequencing หาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ต้นไม้ไฟโลเจเนติก และศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลด้วยวิธี MLST และ PFGE ในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของสัตว์เลี้ยงจำนวนทั้งสิ้น 525 ตัวอย่าง ในจังหวัดน่าน ระหว่างปี 2556 ถึง 2558

ผลทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี MAT พบความชุกของโรคในพื้นที่ 8.06% (95% confident interval (CI) 4.38-11.74) ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดในพื้นที่คือ Shermani รองลงมาคือ Sejroe และ Tarassovi ตามลำดับ

ผลทางอนุชีวโมเลกุล *rrs* nested PCR พบความชุกของโรคร้อยละ 7.42 (95% confident interval (CI) 5.18-9.66) ผลจาก DNA sequencing จาก *rrs* amplicon และต้นไม้ไฟโลเจเนติก พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในสัตว์ในพื้นที่ประกอบด้วย *L. interrogans*, *L. weilii* และ Unidentified *Leptospira* species สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์ได้จากปัสสาวะของสุนัข 4 ตัว ระบุชนิดของสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี near-full length 16S *rRNA* sequencing พบว่าเป็น *L. interrogans* (n=2) และ *L. weilii* (n=2)

การศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลของสายพันธุ์เลปโตสไปราที่แยกได้จากสุนัขด้วยวิธี MLST พบว่าได้ Sequence type (STs) ใหม่ คือ ST26 ST33 สำหรับ *L. interrogans* และ ST94 สำหรับ *L. weilii* พบว่า ST26 และ ST33 เป็น singleton โดยไม่มีจุดกำเนิดหรือบรรพบุรุษร่วมกับเชื้อเลปโตสไปราที่มีการรายงานในฐานข้อมูล ในขณะที่ ST94 เป็น putative founder ของ ST193 และ ST183 ที่พบในคนประเทศจีนและลาว การศึกษาครั้งนี้ให้ข้อมูลที่มีความสำคัญทางด้านระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์เลี้ยงในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการควบคุม และป้องกันโรคนี้ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ระบาดวิทยา, เชื้อเลปโตสไปรา, สัตว์เลี้ยง, จังหวัดน่าน, ประเทศไทย

Abstract

Nan province is an index area of leptospirosis study model in Thailand where provided the evidence linkage between human and rodents but lack of a data in domestic animals such as cattle, pigs and dogs. This study aimed to detect and isolate the pathogenic *Leptospira* spp. from domestic animals by serological assay, Microscopic Agglutination Test (MAT), molecular assay, *rrs* nested polymerase chain reaction (PCR), and culture. Identification *Leptospira* species by near-full length 16S *rRNA* sequencing, determination *Leptospira* genetic relationship and clonality by constructed phylogenetic tree and MLST and PFGE from a total of 525 sample of bloods and urine from animal in Nan province during 2013 to 2015.

Overall, the seroprevalence to leptospiral detection by MAT was 8.09% (95% confident interval (CI) 4.38-11.74). The major leptospiral serogroup was Shermani and the minor serogroup were Sejroe and Tarassovi, respectively.

By *rrs* nested PCR, 7.42% (95% confident interval (CI) 5.18-9.66) of samples were positive to pathogenic *Leptospira* spp.. DNA sequencing and phylogenetic analysis found the positive samples were clustered in a branch of *L. interrogans*, *L. weilii* and unidentified *Leptospira* spp.. We could successfully isolate four leptospires from dogs and identification *Leptospira* species by near-full length 16S *rRNA* sequencing revealed *L. interrogans* (n=2) and *L. weilii* (n=2).

In molecular epidemiological study by MLST, we found novel sequence type (STs) of *Leptospira*; ST26 and ST33 for *L. interrogans* and ST94 for *L. weilii*. ST26 and ST33 was a singleton without clonality to *Leptospira* species in database. ST94, however, was a putative founder of ST193 and ST183 isolated from human leptospirosis in China and Laos.

Our study provides an important epidemiological information of animal leptospirosis in an endemic area that may be continually useful for disease control and prevention strategies.

สารบัญเรื่อง

หัวข้อ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	4
สารบัญตาราง	8
สารบัญภาพ	10
สารบัญกราฟ	11
บทนำ	12
การศึกษาของโครงการย่อยที่ 1.1	14
การศึกษาของโครงการย่อยที่ 1.2	24
การศึกษาของโครงการย่อยที่ 1.3	37
สรุปผลภาพรวมโครงการย่อยที่ 1	52
การศึกษาของโครงการย่อยที่ 2	60
บรรณานุกรม	66
ภาคผนวก	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลตรวจพิสูจน์ลักษณะและสายพันธุ์เชื้อจากคน	18
2	ผลตรวจ immunoblotting ของเชื้อที่แยกได้ผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม	19
3	ผลการทดสอบลักษณะและสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกจากคนและสิ่งแวดล้อม	20
4	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ระหว่างเดือนมีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558	26
5	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วย MAT (cut-off titer $\geq$ 1:80)	28
6	จำนวนร้อยละและจำนวนสัตว์ที่ให้ผลต่อ <i>rrs</i> nested PCR	29
7	ผล species ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp. และเปอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดย near full-length 16S rRNA sequencing	31
8	ผล species ของเชื้อ <i>Leptospira</i> spp. และ Sequence type (ST) โดย Multi Locus Sequence Typing (MLST)	31
9	จำนวนตัวอย่างสัตว์ สิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ของเขตจังหวัดน่านแบ่งตามช่วงเวลาที่เกิดขึ้น	37
10	จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละอำเภอของเขตจังหวัดน่าน	38
11	จำนวนตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยของเขตจังหวัดน่าน	38
12	จำนวนตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาแบ่งตามช่วงเวลาที่เกิดขึ้น	39
13	จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้จากการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนูในแต่ละอำเภอของเขตจังหวัดน่าน	40
14	จำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม	40
15	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจทางห้องปฏิบัติด้วยวิธี PCR และ culture	41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	จำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม	42
17	จำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการติดตามผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมและพื้นที่ที่ติดตามผู้ป่วย	43
18	ผลชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจได้จากตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยด้วยวิธี <i>16s rRNA</i> nested PCR และเปอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดยลำดับเบสของยีน <i>16s rRNA</i>	44
19	ผลชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจได้จากตัวอย่างหนูด้วยวิธี <i>16s rRNA</i> near-full length PCR และเปอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดยลำดับเบสของยีน <i>16s rRNA</i>	44
20	ผลการตรวจพิสูจน์ตัวเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม	45
21	ผลการตรวจพิสูจน์ตัวเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม	45
22	ผล species และ sequence type (ST) โดยวิธี Multi Locus Sequence Typing (MLST) ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากตัวอย่างปัสสาวะหนู	47
23	ผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 ในซีรัมสุกร	63

สารบัญภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	ผลตรวจคัดกรองผู้ป่วยด้วยชุดตรวจโรคฉี่หนูต้นแบบ (LEPkit) เทียบกับชุดตรวจอื่นๆ	16
2	แสดงตำแหน่งสำคัญบน immunoblot	19
3	ลักษณะปั้งชี้ ตรงตำแหน่ง 41,32,21 kDa	19
4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อเลปโตสไปราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด <i>Leptospira</i> Vanaporn Wuthiekanun (LVW) agar (A) และลักษณะ <i>Leptospira</i> -like microorganism ภายใตกล้องจุลทรรศน์ชนิดมีดกำลังขยาย 40X (B)	27
5	Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน <i>rrs</i> (443 bp)	30
6	Clonal complex ของเชื้อ <i>Leptospira interrogans</i> โดย Sequence Type (ST) ที่แยกได้จากสุนัข	32
7	Clonal complex ของเชื้อ <i>Leptospira weilii</i> โดย Sequence Type (ST) ที่แยกได้จากสุนัข	33
8	จำนวนผลบวกต่อเชื้อ <i>Leptospira</i> spp. แยกตามพื้นที่คือ อำเภอเมืองน่าน อำเภอเชียงกลาง และอำเภอนาน้อย	34
9	Phylogenetic treeของ <i>rrs</i> gene (443 bp) โดยวิธี Neighbor joiningของเชื้อจากผู้ป่วย หนูและสิ่งแวดล้อม	46
10	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราในฐานข้อมูล MLST ด้วย eBURST พร้อมระบุตำแหน่งของ Sequence Type (ST) ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากหนู 4 ตัว	48
11	Neighbour-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 443 bp ของยีน <i>rrs</i>	53
12	Neighbour-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 443 bp ของยีน <i>rrs</i> ในกลุ่มของ <i>L. interrogans</i> .	54
13	Neighbour-joining phylogenetic tree ของ near-full length 16S rRNA.	55
14	eBURST analysis ของ <i>L. interrogans</i> ที่แยกได้จากคน, สุนัข และหนู	56
15	Neighbour-joining tree ของ housekeeping gene ทั้ง 7 นำมาต่อกัน (concatenated)	57
16	รูปแบบของ PFGE ของเชื้อเลปโตสไปราตัวแทนที่แยกได้จากคน, สัตว์ และสิ่งแวดล้อม	58
17	แผนที่จังหวัดน่านและอุบัติการณ์สะสมในแต่ละอำเภอของโรคเลปโตสไปโรสิสในคน ระหว่างปี 2013 ถึง 2015 รวมถึงความชุกของโรคเลปโตสไปโรสิสในสัตว์ในช่วงเวลาเดียวกัน	59

สารบัญกราฟ

กราฟที่

หน้า

1 ผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 ในซีรัมสุกร

63

บทนำ

“Leptospirosis” หรือ “โรคฉี่หนู” เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (Zoonotic disease) ที่เป็นปัญหาสำคัญทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย โดยมีรายงานการติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมากถึงกว่า 150 สายพันธุ์ (Ko A et al, 2009) โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียที่ มีรูปร่างเป็นเกลียวจำพวก (genus) *Leptospira* สายพันธุ์ที่ก่อโรคซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีกกว่า 250 serovars (Levett PN, 2001; Ko Al et al, 2009; Adler B et al, 2010) โดยธรรมชาติเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในท่อหลอดไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งสัตว์ที่เป็นรังโรค (reservoir host) สำคัญได้แก่หนู นอกจากนี้ยังมีสัตว์อื่นๆอีก ได้แก่ โค, กระบือ, ม้า, แกะ, แพะ, สุกร, สุนัข เป็นต้น เชื้อนี้ยังพบได้ใน สิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น น้ำและดิน การติดเชื้อในคนและสัตว์เกิดจากการสัมผัสปัสสาวะของสัตว์ที่มีการติดเชื้อโดยตรงหรือสัมผัสน้ำ และดินที่ปนเปื้อนเชื้อ

การระบาดของโรคฉี่หนูพบได้ในหลายประเทศทั่วโลก ซึ่งมีความแตกต่างกันของ serovar ของเชื้อที่ระบาดในแต่ละประเทศ และแม้ในประเทศเดียวกันแต่ต่างพื้นที่ ก็ยังพบการระบาดของเชื้อที่มี serovar ต่างกัน ซึ่งการที่พบเชื้อต่าง serovar นั้นอาจขึ้นอยู่กับ reservoir host ของแต่ละพื้นที่หรือประเทศนั้นๆ (Gautam R et al, 2010; Sykes JE et al, 2010; Kositanont U et al, 2007; Adesiyun AA et al, 2006; Evangelista KV, 2010; Victoriano AF et al, 2009) นอกจากนี้ serovar ที่แตกต่างกันยังมีผลในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ เชื้อ *Leptospira* ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับแต่ละ serovar (Sykes JE et al, 2010) สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาโรคฉี่หนูทั้ง ในคนและสัตว์ โดยมีรายงานการศึกษาในปศุสัตว์และสัตว์ประจำถิ่นอีกหลายชนิด แต่ยังไม่มียางานใดที่บ่งชี้ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคในคนและในสัตว์ ยิ่งไปกว่านั้น ข้อมูลทางระบาดวิทยาในสัตว์ถือว่ามีจำนวนจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลทาง serovar ของเชื้อ ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการควบคุมการระบาดของโรคฉี่หนูคือการมีฐานข้อมูล serovar ของเชื้อในสัตว์รังโรค ซึ่ง ฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของเชื้อกับข้อมูลที่ได้จากคนและสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกิดความเข้าใจวงจรการติดต่อ โรคและเข้าใจปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างเชื้อกับคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะนำไปสู่การแก้ปัญหาแบบองค์รวม (One Health approach) โดยผสมผสานศาสตร์แต่ละสาขาเข้าด้วยกัน

ด้วยเหตุนี้กลุ่มวิจัยจึงเห็นความสำคัญของการศึกษาวงจรความสัมพันธ์ทาง genotype และ phenotype (serovar) ของเชื้อ *Leptospira* ที่แยกได้จากผู้ป่วย สัตว์เลี้ยงได้แก่ สุนัข แมว และปศุสัตว์ ซึ่งมีความใกล้ชิดกับผู้ป่วย และสัตว์ตามธรรมชาติที่พบใน ท้องถิ่นนั้นๆ โดยเฉพาะหนู รวมถึงสิ่งแวดล้อมที่สัตว์นั้นอาศัยอยู่ โดยมีขอบเขตการศึกษารอบคลุมทั้งในและนอกพื้นที่ที่มีข้อมูลการ ระบาด ผลจากการศึกษาจะได้ข้อมูล genotype และ phenotype (serovar) ของสัตว์ในแต่ละท้องถิ่นซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็น ประโยชน์ สามารถนำมาเชื่อมโยงกับข้อมูลการเกิดโรคในคนซึ่งนำไปสู่การหามาตรการป้องกันและควบคุมโรคที่เหมาะสมทั้งในส่วน ของการพัฒนาวัคซีนในคนและสัตว์ การควบคุมประชากรสัตว์ที่เป็นรังโรคสำคัญ รวมถึงการวางแผนนโยบายในการแก้ไขปัญหาระยะ ยาวให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อีกทั้งยังมีข้อมูลการศึกษาที่พบว่า หนูอาจเป็นแหล่งรังโรค (reservoir) ที่สำคัญต่อการระบาดของ โรคเลปโตสไปโรซิสในหลายพื้นที่ของประเทศไทย นอกจากนี้จากข้อมูลก่อนหน้าที่ศึกษาถึง serovars ของเชื้อ *Leptospira* ที่พบในหนูของประเทศไทย พบว่ายังไม่สามารถเชื่อมโยงการแพร่ติดเชื้อในสัตว์และคนไขได้ดีเท่าที่ควร กล่าวคือในคนมักพบการติดเชื้อ *L. autumnalis* *L. icterohaemorrhagiae* *L. hebdomadis*, *L. bataviae* และ *L. akyami* แต่ในหนูพบการติดเชื้อ *L. javanica* *L. autumnalis* *L. hebdomadis* *L. canicola* *L. sejroe* *L. pyrogenes* และ *L. akyami* แสดงว่าในประเทศไทยยังมีสัตว์ชนิดอื่นๆที่สามารถเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญได้อีกเช่น สัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกรและสัตว์ป่าต่างๆ ในธรรมชาติ เป็นต้น ที่อาจสามารถแพร่เชื้อเลปโตสไปโรซิสชนิด serovar ที่ก่อโรคในคนได้ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษา ถึง ธรรมชาติของการติดเชื้อ (natural infection) โดยการให้เชื้อ (inoculate) เลปโตสไปโรซิสแก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง และสุกร ยัง มีอยู่อย่างจำกัด ทำให้ยังขาดข้อมูลที่จะนำไปใช้ในสนับสนุนการดำเนินการควบคุมและป้องกันโรคในที่สุดอาทิ ลักษณะของ

การติดเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน ระยะเวลาและปริมาณในการปล่อยเชื้อ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน หลังการติดเชื้อ และภาวะการเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) หรือแอบแฝง (latent infection) เป็นต้น ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ยังมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาธรรมชาติของการติดเชื้อ (natural infection) เลปโตสไปราในสัตว์เคี้ยวเอื้อง และ สุกร โดยการให้สัตว์ทดลองติดเชื้อ (experimental infection) เลปโตสไปราสายพันธุ์ที่แยกเชื้อได้จากผู้ป่วย ซึ่งข้อมูลที่ได้ จากการศึกษาจากทั้ง 2 โครงการย่อยนี้จะทำให้เข้าใจกลไกการระบาดและการเกิดโรค เลปโตสไปโรซิส ที่เชื่อมโยงระหว่าง สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรคในธรรมชาติกับการเกิดโรคในคน ได้ชัดเจนยิ่งขึ้นซึ่งทำให้สามารถใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไป ประกอบในการวางแผนควบคุมและป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสภายในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

โครงการย่อยที่ 1.1

โครงการบูรณาการความรู้ทางระบาดวิทยาและนวัตกรรมรองรับโรคเลปโตสไปโรซิส
โดยทีมวิจัยของ อ. กัลยาณี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

1. กลุ่มประชากรที่ศึกษา

ประชากรไทยที่มีแหล่งพักอาศัย ในพื้นที่อำเภอต่างๆ (15 อำเภอ) ของจังหวัดน่าน ซึ่งเป็นพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการเลี้ยงปศุสัตว์ โดยกลุ่มประชากรที่จะศึกษาเหล่านี้จะได้รับหนังสือเชิญเพื่อเข้าร่วมในการศึกษา และยินยอมเพื่อเข้าร่วมในการศึกษาจะถูกเชิญเข้าร่วมการศึกษา ตามเกณฑ์มาตรฐานจริยธรรมการวิจัยในคนจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคนคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัส ethical approval no.ID-04-56-44)

โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ

- 1.1 ผู้ป่วยในหรือผู้ป่วยนอก ที่มาตรวจรับการรักษาด้วยอาการไข้เฉียบพลัน ในโรงพยาบาลชุมชนและโรงพยาบาลต่างๆ ของจังหวัดน่าน
- 1.2 กลุ่มอ้างอิง เกณฑ์การคัดเลือกของประชากรที่เข้าร่วมการศึกษาจะต้องไม่มีไข้ และมีผลตรวจลบต่อการตรวจด้วยวิธี LEKit ณ วันตรวจคัดกรอง ประกอบด้วยคนปกติทั่วไปที่มาตรวจสุขภาพ ในโรงพยาบาลของจังหวัดน่าน

เพื่อให้ประชากรที่เข้าร่วมมีความเข้าใจ และลดการสูญหายของประชากรที่เข้าร่วมการศึกษา ขณะดำเนินการศึกษาตลอดระยะเวลา 3 ปี (พ.ศ.2556-2558) ทีมผู้วิจัยจะประชุมขอความร่วมมือ อาสาสมัครสาธารณสุขและเจ้าหน้าที่ สาธารณสุข ในการทำความเข้าใจเกี่ยวกับวิธีการวิจัยแก่ประชากรที่เข้าร่วม

2. ตัวอย่างเลือด ของกลุ่มประชากรที่ศึกษา

- 2.1 การเก็บตัวอย่างเลือดโดยแพทย์และพยาบาลที่ได้รับมอบหมาย เพื่อตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบชนิดรวดเร็ว (LEKit)
- 2.2 ถ้าตัวอย่างให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ ตัวอย่างนั้นจะนำมาตรวจโดยวิธีเพาะแยกเชื้อและส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ตามมาตรฐานการรักษาโรค รวมทั้งทำการสัมภาษณ์รายบุคคล เพื่อเก็บข้อมูลด้านปัจจัยเสี่ยง
- 2.3. ขั้นตอนการเก็บข้อมูล

2.3.1 การเก็บข้อมูลด้านปัจจัยเสี่ยง (ตัวแปรต้น)

ทีมผู้วิจัยจะทำการสัมภาษณ์รายบุคคลในกลุ่มประชากรที่ศึกษา โดยจะทำการสัมภาษณ์ที่บ้านของประชากรที่ศึกษา และติดตามสัมภาษณ์ภายใน 1-2 สัปดาห์ หลังทราบผลตรวจจาก LEKit ในวันแรกที่มาโรงพยาบาล โดยข้อมูลการสัมภาษณ์ในแต่ละครั้งประกอบด้วย ข้อมูลปัจจัยเสี่ยงหลักประกอบด้วย ประวัติการทำงานที่เกี่ยวข้องกับปศุสัตว์ จำนวนปีที่ทำงาน ลักษณะงานที่ทำ การใช้ถุงมือ รองเท้าบูทเมื่อทำงานกับปศุสัตว์ ลักษณะฟาร์มปศุสัตว์ จำนวนปศุสัตว์ในฟาร์ม ข้อมูลทั่วไป และข้อมูลปัจจัยกวนประกอบด้วย ที่อยู่ อายุ เพศ การเลี้ยงสัตว์ ประวัติการเจ็บป่วยที่สำคัญ ลักษณะการบริโภคอาหารและน้ำดื่ม ลักษณะสุขาภิบาลในบริเวณที่อยู่อาศัย การทำความสะอาดภายในบ้าน รอบบ้าน และการป้อนรอยของหนู

2.3.2 การเก็บข้อมูลด้านผลลัพธ์ (ตัวแปรตาม)

ประชากรที่ศึกษาจะได้รับการสอบถามประวัติการมีไข้ที่บ้าน สอบถามถึงวันเริ่มป่วย และผู้ที่อยู่ใกล้ชิดในครอบครัว หรือผู้ที่มีประวัติเคยป่วยโรคนี้หนุมาก่อน ทีมผู้วิจัยจะตรวจสอบข้อมูลเวชระเบียนจากโรงพยาบาล

ชุมชนในพื้นที่ เพื่อตรวจสอบว่ามีประชากรที่ศึกษาเข้ามารับการรักษาเนื่องจากไข้ไม่ทราบสาเหตุ หรือเป็นผู้ป่วยสงสัยโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไม่ ถ้าตรวจพบว่ามี ผู้ป่วยที่อยู่ในกลุ่มประชากรศึกษาจะได้รับการติดต่อให้มาที่โรงพยาบาลอีกครั้ง เพื่อทำเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 5 มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดนั้นจะนำมาตรวจหาการติดเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี LEKkit ถ้าตัวอย่างให้ผลบวกต่อการติดเชื้อ ประชากรที่ศึกษานั้น จะได้รับการสัมภาษณ์สอบสวนหา ประวัติการเจ็บป่วยและพื้นที่เสี่ยงที่สงสัยสัมผัสโรค เพื่อแจ้งผลบ่งบอกทิศทางการสำรวจที่เกี่ยวข้องของผู้ป่วย ส่งต่อกับทีมวิจัยร่วมใน โครงการย่อยที่ 1.2 และ 1.3 (คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ และมหาวิทยาลัยมหิดล) ต่อไป

3. ขั้นตอนการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ และการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 ชุดตรวจโรคฉี่หนูต้นแบบ (LEKkit- prototype) สำหรับจำแนกโรคของผู้ป่วยระยะแรกป่วย

เป็นนวัตกรรมที่ผลิตใช้ในประเทศ สำหรับตรวจภูมิคุ้มกันโรคฉี่หนูในระยะเฉียบพลัน (anti- Leptospira-LPS IgM antibody) เป็นชุดตรวจชนิดรวดเร็วแบบ Immunochromatographic test หรือ LPS-based rapid test ใช้ตรวจกับตัวอย่างซีรัมของกลุ่มประชากรที่ศึกษา อ่านผลได้ภายใน 20 นาที

3.2 การตรวจวินิจฉัยโรควิธีมาตรฐาน Microscopic Agglutination Test (MAT)

3.2.1 นำตัวอย่างตรวจครั้งแรกของผู้ป่วย และตัวอย่างซีรัมคู่ในระยะติดตามยืนยันการติดเชื้อโรคฉี่หนู โดยส่งตรวจ MAT ที่สถาบันสุขภาพสัตว์ ทดสอบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐานจำนวน 24 ชนิด (serovars) ได้แก่ Serovars Autumnalis, Bratislava, Bataviae, Djasman, Grippothyphosa, Hebdomadis, Icterohemorrhage, Javanica, Ranarum, Sejroe และ Shermani

3.2.2 การทดสอบ ใส่ซีรัมทำปฏิกิริยากับเชืวดังกล่าว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและตรวจอ่านผลด้วยกล้องพื้นมืด (dark field microscope)

3.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ โดยวิธี SDS-PAGE / Immunoblotting

การทดสอบคุณลักษณะของเชื้อเลปโตสไปรา โดยการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE และเตรียมเป็นแอนติเจนบนแผ่นตรวจ (Immunoblot) เพื่อตรวจกับตัวอย่างแอนติซีรัมของสัตว์ทดลอง หรือทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยหรือคนปกติ

3.3.1 ทดสอบกับแอนติซีรัมมาตรฐาน ที่ผลิตได้ในสัตว์ทดลองที่สร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์ (serovar specific antiserum) ที่สนใจศึกษา

3.3.2 แอนติซีรัมที่จำเพาะบ่งชี้ชนิดสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic specific antibodies) ตรงตำแหน่งโปรตีนของเชื้อก่อโรคชนิด LipL21, LipL32 และ LipL41 (provided by David Hakke)

3.3.3 ทดสอบกับซีรัมของคน

3.4 การตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธี PCR เพื่อเปรียบเทียบลักษณะโมเลกุลของเชื้อที่พบในคน สัตว์กับเชื้อที่พบจากสิ่งแวดล้อม

3.4.1 สกัด DNA จากเชื้อที่แยกได้จากคน สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม (ดินและน้ำ)

3.4.2 โดยใช้ primer จำเพาะต่อยีน *16s rRNA* และ *lipL32* ของเชื้อเลปโตสไปราตรวจติดตาม

ผลการทดลอง

1. กลุ่มประชากรที่ศึกษา และกลุ่มอ้างอิง (ปกติทั่วไป)

กลุ่มผู้ป่วยสงสัยทางคลินิก ทั้งสิ้นจำนวน 63 ราย

ผลสำรวจคัดกรองผู้ป่วยที่สงสัยเบื้องต้นระหว่าง เดือนมิถุนายน 2556 ถึงสิงหาคม 2558 สามารถคัดกรองผู้ป่วยทางคลินิกได้จำนวน 63 ราย ส่วนใหญ่อาชีพ เกษตรกรรม ทำนาทำไร่ ปลูกพืช เลี้ยงสัตว์หรือคลุกคลีกับสัตว์ จับปลาหรือสัตว์น้ำ มีกิจกรรมหรือประวัติสอบสวนโรคที่เสี่ยงสัมผัสต่อสิ่งแวดล้อมตามแหล่งดินและแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และเจาะเลือดตรวจเพื่อบ่งชี้โรกระยะเฉียบพลัน ได้ผลดังนี้

1.1 ผลตรวจด้วยชุดตรวจโรคฉี่หนูต้นแบบ (LEPkit) และชุดตรวจอื่นๆ ที่มีใช้ตรวจในโรงพยาบาล ด้วยตัวอย่างตรวจซีรัม (clotted blood) หรือพลาสมา ของผู้ป่วยจำนวน 63 ราย สามารถตรวจพบบ่งบอกโรคเป็นผู้ป่วยได้จำนวน 44 ราย คิดเป็น 69.8 % เมื่อเทียบกับผลตรวจโดยใช้กับชุดตรวจอื่นปรากฏให้ผลบวกที่มีความไวต่ำกว่าจะบ่งชี้โรคได้น้อยกว่า (ชุดตรวจ SD) โดยได้ผลบวก 9.6 % ดังภาพแสดงแนบที่ 1

รูปภาพที่ 1 ผลตรวจคัดกรองผู้ป่วยด้วยชุดตรวจโรคฉี่หนูต้นแบบ (LEPkit) เทียบกับชุดตรวจอื่นๆ



1.2 ผลการตรวจวินิจฉัยโรคทาง Microscopic Agglutination Test (MAT) โดยใช้ตัวอย่างตรวจซีรัมครั้งแรกของผู้ป่วย 35 ราย และตัวอย่างซีรัมคู่ติดตามเพื่อยืนยันการติดเชื้อโรคฉี่หนูได้ จำนวน 13 ราย โดยส่งตรวจสถาบันสุขภาพสัตว์ สรุปตรวจพบมีแอนติบอดีต่อเชื้อ 11 ชนิด จากจำนวนทั้งสิ้น 24 ชนิด (serovars) ได้แก่ Serovars Autumnalis, Bratislava, Bataviae, Djasman, Grippothyphosa, Hebdomadis, Icterohemorrhage, Javanica, Ranarum, Sejroe และ Shermani

เชื่อก่อนโรคที่น่าจะเป็นสาเหตุพบจากผู้ป่วยที่สร้างแอนติบอดีเกิดขึ้นต่อเชื้อมีดังกล่าว เรียงลำดับพบได้ ดังนี้

1. Shermani
2. Bratislava
- และ 3. Ranarum คิดเป็นสัดส่วน 72.7 % 66.7 % และ 24.2 %

การแปลผล: การบ่งชี้ว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน (acute infection) ตัดสินโดยใช้ค่าตรวจวัดมาตรฐาน MAT สำหรับตัวอย่างครั้งแรกหรือครั้งเดียว เมื่อมีระดับ Titer ≥ 400 และสำหรับตัวอย่างตรวจคู่ ใช้ค่าตรวจที่เพิ่มสูงขึ้นจากเดิม (seroconversion) หรืออย่างน้อย 4 เท่า (4 fold rising titer)

ดังนั้น จึงสามารถพิสูจน์ตรวจพบเป็นผู้ป่วยติดเชื้อโรคนี้และเกิดขึ้นเฉียบพลันอยู่เพียง 4 รายจากจำนวนตรวจ 35 ราย (8/35) หรือคิดเป็น ร้อยละ 22.9

1.3 การสำรวจข้อมูลของผู้ป่วย

โดยอาศัยการสอบสวนโรคทางระบาดวิทยาจากผู้ป่วยทุกราย หลังตรวจได้ผลบวกชุดตรวจโรคนี้ หนูต้นแบบ (LEPkit) แล้ว ทีมงาน วิชาการด้านสาธารณสุข ซึ่งสัมภาษณ์เก็บข้อมูลพื้นฐานตามแบบสอบถามโรค เกี่ยวกับอายุ เพศ อาชีพ ประวัติเสี่ยงและกิจกรรมที่สัมผัสก่อนป่วย ที่บ่งชี้ความเสี่ยงต่อโรคนี้และบ่งบอกทิศทางการลงสำรวจค้นหาเชื้อในพื้นที่เสี่ยง ตามข้อมูลที่ได้จากผู้ป่วยหรือผู้เคยป่วยโรคนี้ หนู ทั้งภายในช่วงเวลาเดียวกันหรือต่างช่วงเวลากัน ตลอดจนกลุ่มผู้ป่วยที่อยู่ต่างพื้นที่หรืออยู่ใกล้เคียงกัน แต่ต่างเวลาการสำรวจติดตามสาเหตุ

2. ผลการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากผู้ป่วยและการพิสูจน์สายพันธุ์

2.1 เชื้อเลปโตสไปราก่อโรคที่ได้จากผู้ป่วย

การสำรวจติดตามผู้ป่วย ช่วงระหว่าง ปี 2556 -2558 โดยการเพาะแยกเชื้อ สามารถแยกได้ เชื้อเลปโตสไปราก่อโรคจากคนไข้เพียงหนึ่งราย (Pu004) ในปี 2556 จากหญิงไทย อายุ 41 ปีไม่ทราบอาชีพ ซึ่งอยู่ในอำเภอปัว (***Pua District = Latitude. 19.1833°, Longitude. 100.9167°***)

ที่น่าสนใจพิสูจน์พบเป็นเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยการวิเคราะห์ตรวจวิธี Multilocus Sequence Typing (MLST) พบเป็น Sequence Type (ST) เรียก ST 211 โดยใช้ Multiple locus variant สำหรับสารพันธุกรรมจาก 7 housekeeping gene ซึ่งมีอำนาจแยกแยะความหลากหลายของสายพันธุ์ ได้แก่ *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA* *glmU* และ *fadD* โดยการประมวลผลลำดับพันธุกรรมและจัดแผนภาพ (dendrogram) และถอดรหัสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ในการระบุให้หมายเลข loci ของแต่ละยีน และชนิดของ sequence type ซึ่งอ้างอิงจากเว็บไซต์ <http://leptospira.mlst.net> (Thaipadungpanit et al., 2007)

2.2 ผลตรวจพิสูจน์ลักษณะและสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกจากคนและสิ่งแวดล้อมโดยใช้วิธี Immnublotting และ PCR

เชื้อที่แยกจากผู้ป่วยได้ในโครงการฯ เมื่อปี พศ. 2556 (คศ. 2013) พบเพียงหนึ่งราย (Pu004) ซึ่งอยู่ในพื้นที่อำเภอปัว จังหวัดน่าน ได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยระยะ ก่อนหน้าประมาณ 3 ปี ในปี พศ. 2553 ปี (คศ. 2010) ซึ่งได้จากผู้ป่วย ในพื้นที่ อำเภอปัว เช่นเดียวกัน โดยการเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อ 2 แบบ ทั้งทาง ด้าน antigenicity ด้วยวิธี Immnublotting และตรวจทางด้าน

สารพันธุกรรมด้วยวิธี Multilocus Sequence Typing (MLST) ร่วมกับวิธี 16s RNA gene typing ได้ผลสรุป ดังนี้

2.2.1 ผลตรวจพิสูจน์ลักษณะและสายพันธุ์เชื้อจากคน พบเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค แต่ต่างสายพันธุ์ในระดับ species ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลตรวจพิสูจน์ลักษณะและสายพันธุ์เชื้อจากคน

ตารางที่ 1	Serovar	สรุปเชื้อที่แยกได้จากคนและสิ่งแวดล้อมภายในจังหวัดน่าน						
		Phylogenetics	Strain (Name)	Sources*	Province	District	year- collection	isolates
01	Undesignated	<i>L.interrogans</i>	53-N05	human	Nan	Puo	2010	yes
02a	Undesignated	<i>L.weillii</i>	53-N01a	human	Nan	Puo	2010	yes
02b	Undesignated	<i>L.weillii</i>	53-N01b	human	Nan	Puo	2010	yes
03	Undesignated	ST 211	56-PU004	human	Nan	Puo	2013	yes
04	Undesignated	<i>L.kmetyi</i>	Ev 09	soil	Nan	Tha Wang Pha	2013	yes
05	Undesignated	<i>L.kmetyi</i>	Ev 16	soil	Nan	Tha Wang Pha	2013	yes
06	Undesignated	<i>L.kmetyi</i>	Ev 39	soil	Nan	Tha Wang Pha	2014	yes
07	Undesignated	<i>L.wolffii</i>	Ev 01	soil	Nan	Tha Wang Pha	2013	yes
08	Undesignated	<i>L.wolffii</i>	Ev 35	soil	Nan	Tha Wang Pha	2014	yes
09	Undesignated	<i>L.wolffii</i>	Ev 36	soil	Nan	Tha Wang Pha	2014	yes
10	Undesignated	<i>L.interrogans</i>	Ev 27	water	Nan	Tha Wang Pha	2014	yes
11	Undesignated	<i>L.kmetyi</i>	Ev 10	water	Nan	Tha Wang Pha	2013	yes
12	Undesignated	<i>L.weillii</i>	Ev 28	water	Nan	Tha Wang Pha	2014	yes
13	Undesignated	<i>L.wolffii</i>	Ev 14	water	Nan	Tha Wang Pha	2013	yes

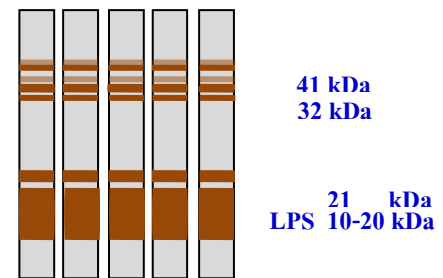
การแปลผลตรวจ PCR ที่จำแนกบ่งบอกสายพันธุ์ก่อโรคได้ จากผลตรวจพบ +lipL32/+16s-rRNA และบ่งบอกเชื้อชนิดไม่ก่อโรคจากผล +16s-rRNA ส่วนเชื้อที่ให้ผลตรวจที่แตกต่างไม่ตรงกับเชื้อ 2 กลุ่มข้างต้น จัดเป็นกลุ่มกลาง (Intermediate)

ดังนั้น ผลตรวจของเชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมดินและน้ำจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ผลวิเคราะห์ร่วมกับเชื้อจากคนในช่วงปีเดียวกัน (พ.ศ 2556) พบมีลักษณะบ่งชี้บนแผ่นตรวจ (Immunoblot pattern) ตรงกันตรงตำแหน่งร่วมของเชื้อเลปโตสไปราทุกชนิด (common reactive bands) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาด 35/36 KDa และแถบ Lipopolysaccharides (LPS) พบได้หลายแถบที่มีขนาดเล็ก (10-20 KDa) ส่วนลักษณะบ่งชี้ของเชื้อก่อโรค (Pathogenic specific bands) จะปรากฏตรงตำแหน่งโปรตีนของ LipL21, LipL32 และ LipL41 ตัวอย่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อม 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2 และ 3) สามารถบ่งชี้เป็นเชื้อก่อโรค คล้ายกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 3 ราย (Pu004,N001 & N005)) สำหรับเชื้อที่มีลักษณะไม่ตรงตามที่กล่าวข้างต้นและมีลักษณะแตกต่างออกไปควรวิเคราะห์เพิ่มเติมในเชิงลึก หรือวิธีอื่นๆ ต่อไป

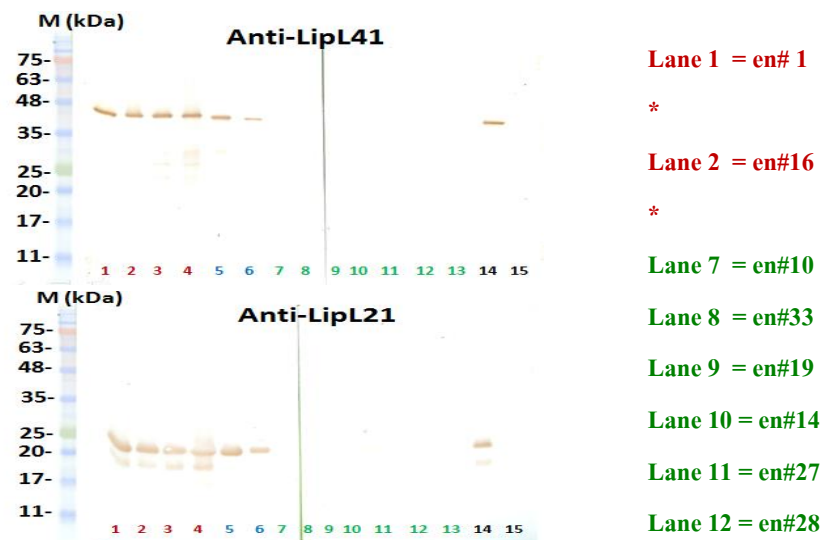
ตารางที่ 2 ผลตรวจ immunoblotting ของเชื้อที่แยกได้ผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม

ตัวอย่างเชื้อ	LPS	35-36	LipL21	LipL32	LipL41	Molecular typing
Pu-004 (N001-N005)	/	double band	/	/	/	Unknown
# 1, # 9, #16, #39	/	double band	/	/	/	pathogenic
#17, #35	/	double band	/	?	/	intermediate
#10, #14, #19, #27 #28, #33, #36	/	single band	-	-	-	Non-pathogenic

รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งสำคัญบน immunoblot



รูปที่ 3 ลักษณะบ่งชี้ ตรงตำแหน่ง 41,32,21 kDa ระหว่างเชื้อจากสิ่งแวดล้อม (Lane 1-13) เทียบกับเชื้อก่อโรค (Lane 14, Sejroe) และเชื้อชนิดที่ไม่ก่อโรค (Lane 15, Patoc)



2.2.2 การพิสูจน์สายพันธุ์เชื้อจากคน สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม

เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโครงการนี้ เมื่อปี พ.ศ 2556 เปรียบเทียบกับ เชื้อที่แยกได้จาก สัตว์และ สิ่งแวดล้อม (โครงการย่อย 1.3) ส่วนใหญ่พบอยู่ในพื้นที่ บ้านสบซุ่น ตำบลป่าคา อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน ได้นำมาตรวจวิเคราะห์ร่วมกันกับเชื้อที่ได้จากผู้ป่วยในช่วงปีเดียวกัน (พ.ศ 2556) แต่ต่างพื้นที่ (อำเภอปัว) และในต่างช่วงเวลา (พ.ศ 2553) แต่อยู่ในพื้นที่เดียวกัน

แสดงผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบลักษณะและสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกจากคนและสิ่งแวดล้อม

Code	Isolation Year	Blast via	GenBank		Leptospira Species	Source
			accession no.	16s-RNA gene ^a & Taxonomy		
env-9	2013		EF536997.1	Grippytyphosa isolate UT130	<i>L. kirschneri</i>	ดิน / ท่าวังผา
env-9	2013		EF536996.1	isolate H1	<i>L. kirschneri</i>	ดิน / ท่าวังผา
env10	2013		EF536998.1	isolate H2	<i>L. kirschneri</i>	น้ำ / ท่าวังผา
env16	2013		EF536997.1	Grippytyphosa isolate UT130	<i>L. kirschneri</i>	ดิน / ท่าวังผา
env27	2013		EF536983.1	Autumnalis isolate L0594	<i>L. interrogans</i>	น้ำ / ท่าวังผา
env27	2013		EF536990.1	Pyrogenes isolate L0374	<i>L. interrogans</i>	น้ำ / ท่าวังผา
env39	2013		EF536997.1	Grippytyphosa isolate UT130	<i>L. kirschneri</i>	ดิน / ท่าวังผา
N005	2010	NR_074481.1 ^b		Lai str. 56601 strain 56601	<i>L. interrogans</i>	คน / ปัว
N005	2010		CP001221.1 ^c	Lai str. IPAV chromosome 1	<i>L. interrogans</i>	คน / ปัว
N005	2010		EF537003.1	Nanla	<i>L. interrogans</i>	คน / ปัว
Pu004	2013	ST211 ^d		new strain		คน / ปัว

a complete nucleotide sequence of a16S ribosomal RNA
gene

b The National Center for Biotechnology Information
(NCBI)

c avirulent strain

d Multilocus sequence typing (MLST)

ข้อมูลการตรวจวิเคราะห์เชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ กัน ในธรรมชาติ (ตารางที่ 1 ข้างต้น) ได้แก่ ตัวอย่าง env 9 ,env 10 ,env 16, env 27 และ env 39 เป็นเชื้อที่มาจากแหล่งน้ำและดิน อยู่ภายในพื้นที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และมีส่วนเกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่ลงพื้นที่ทำกิจกรรมก่อนการป่วย หลังการติดตามลงสำรวจและเก็บตัวอย่างที่สงสัย (โดยทีมงานโครงการที่ 1.3) เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อทางห้องปฏิบัติการ (โครงการที่ 1.1 และ 1.3 ร่วมกันศึกษา) สามารถตรวจแยกเชื้อและทำการทดสอบสายพันธุ์ โดยใช้ primers 16S rRNA เพื่อจำแนกเชื้อ leptospira sp. ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่น ส่วนการจำแนกเชื้อได้เป็นชนิดก่อโรค/ pathogenic *Leptospira* sp. และไม่ก่อโรค/ non- pathogenic *Leptospira* sp. โดยใช้วิธี PCR ในการแยกแยะจาก primer 3 คู่ ประกอบด้วย primer คู่ที่ 1: 16s rRNA primers (31-341 nt) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ genus *Leptospira* ส่วน primer คู่ที่ 2: 16s rRNA primers (171-258 nt) ที่จำเพาะต่อ pathogenic และ intermediate *Leptospira* และ primer คู่ที่ 3: LipL32 primers ที่มีความจำเพาะต่อ pathogenic *Leptospira*

ส่วนการเปรียบเทียบสายพันธุ์จากความคล้ายคลึงในลำดับนิวคลีโอไทด์เทียบกับที่มีการรายงานไว้แล้ว ในฐานข้อมูล GenBank database (Accession number) โดยเฉพาะจาก complete nucleotide sequence ของ 16S ribosomal RNA gene พบเชื้อก่อโรคหลากหลายชนิดจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่

Leptospira kirschneri isolate H2 พบสำหรับเชื้อ env 9
L. kirschneri serovar Grippotyphosa isolate UT130 พบทั้งเชื้อ env 16 และ env 39
L. kirschneri isolate H1 พบสำหรับเชื้อ env 9
L. interrogans serovar Autumnalis isolate L0594 พบสำหรับเชื้อ env 27
L. interrogans serovar Pyrogenes isolate L0374 พบสำหรับเชื้อ env 27

3. ความสัมพันธ์ของเชื้อก่อโรคในคนและการก่อโรคในสัตว์เลี้ยง กำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการโดยโครงการย่อย ที่ 1.2

4. การตรวจวิเคราะห์และพิสูจน์หาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์โดยเทคนิคและวิธีการอื่นๆ ได้แก่วิธี nested PCR และ Immunoblotting ยังรอดำเนินการต่อไป

ข้อวิจารณ์

1. การติดตามปัญหาโรคฉี่หนู โดยผสมผสานการใช้นวัตกรรมชุดตรวจโรคและแนวทางการสำรวจโรคทางระบาดวิทยา เพื่อบ่งชี้โรคของผู้ป่วยระยะเฉียบพลันและติดตามค้นหาพื้นที่เสี่ยงและปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการป่วยในช่วงการดำเนินโครงการ ระหว่าง เดือนพฤษภาคม 2556 ถึงเดือน สิงหาคม 2558 เพื่อติดตามต้นเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดการป่วย หรือมีโอกาสติดต่อบริเวณก่อโรคก่อนป่วย ทั้งนี้จากการใช้ผลิตภัณฑ์ชุดตรวจต้นแบบ (LPS-based rapid test kit) เพื่อจำแนกโรคของผู้ป่วยซึ่งมีอาการไข้เฉียบพลันและประวัติเสี่ยงสัมผัสเชื้อ ซึ่งการวินิจฉัยโรคได้ในระยะแรกกับผู้ป่วยโรคฉี่หนูหรือเลปโตสไปโรซิส ในโรงพยาบาลชุมชน มีความสำคัญ ร่วมกับการซักประวัติตรวจร่างกายและตรวจอาการต่างๆ

หากเครื่องมือชุดทดสอบสามารถตรวจใช้ได้ผล มีความสะดวกรวดเร็วและไม่ยุ่งยาก จะก่อให้เกิดประโยชน์ ในการดูแลรักษาโรคเลปโตสไปโรสิสที่รวดเร็ว ทันเวลาและลดความเสี่ยงของการเกิดความรุนแรงในผู้ป่วยที่ได้รับการดูแลรักษาที่ล่าช้า

2 นอกจากการตรวจพบผู้ป่วยโรคนี้ที่ระบุชี้ชัดได้รวดเร็วทันการณ์แล้ว ยังทำให้การติดตามควบคุมโรคที่มีสิ่งแวดล้อมและปัจจัยเสี่ยงในธรรมชาติต่างๆภายในชุมชน ซึ่งเป็นพื้นที่ระบาดหรือเกิดโรคประจำถิ่น (endemic area) มีโอกาสดำเนินการได้ทันทั่วทั้งที่มีประสิทธิผลมากขึ้น ลดความเสี่ยงต่อปัญหาการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและธรรมชาติตามพื้นดินและแหล่งน้ำธรรมชาติต่างๆ นำไปสู่การสืบค้นหาสาเหตุก่อโรคที่สงสัย จากสัตว์เลี้ยงหรือสัตว์รังโรค ตามพื้นดินหรือแหล่งน้ำที่สงสัยปนเปื้อนและผู้ป่วยอาจรับเชื้อติดต่อก็ได้

ดังนั้นโครงการได้บูรณาการร่วมกับโครงการย่อย ที่ 2- 3 ซึ่งทางกลุ่มงานระบาดและสัตว์แพทย์ดำเนินสำรวจเก็บตัวอย่างและเฝ้าระวังพื้นที่เสี่ยง (Environmental Surveillance) จนสามารถแยกพบเชื้อได้ตามแหล่งต่างๆ มีทั้งคน สัตว์และสิ่งแวดล้อมจากดินและน้ำ ของพื้นที่สำรวจ ในโครงการฯ

3. ในภาพรวมมีการพบพื้นที่เสี่ยงแวดล้อมอยู่ตามธรรมชาติ และแนวโน้มการพบเชื้อเลปโตสไปราชนิดสายพันธุ์ก่อโรค (pathogenic leptospire s) และไม่ก่อโรค (non pathogenic leptospires) รวมทั้งสายพันธุ์กึ่งก่อโรค (intermediate) ปนเปื้อนอยู่ในธรรมชาติที่แวดล้อมของผู้คนในชุมชน โดยเฉพาะเชื้อก่อโรค pathogenic *Leptospira interrogans* และ *Leptospira kirschneri* ซึ่งกระจายอยู่ตามแหล่งน้ำหรือดินทั่วไป ใกล้ชิดกับคนในชุมชน คนปกติที่อยู่ในพื้นที่เสี่ยงของจังหวัดน่าน อาจมีโอกาสเสี่ยงต่อโรคได้เช่นกัน เป็นความเสี่ยงที่ต้องดำเนินการ สร้างมาตรฐาน แจกเตือน และให้ความรู้กับประชาชนในการป้องกันตนเอง

ข้อจำกัดของการลงพื้นที่สำรวจ ได้แก่

1. ด้านการสำรวจภายใน ระยะเวลาและสถานที่ เพื่อเก็บตัวอย่างตรวจ จาก คน สัตว์และสิ่งแวดล้อมไม่อาจเกิดขึ้นได้ภายในวันเดียวกัน เนื่องจากต้องการเวลา สำหรับการตรวจและสอบสวนโรค ให้แน่ชัด ระดับหนึ่งก่อนลงสำรวจสัมผัสพื้นที่เสี่ยง ส่วนใหญ่ ผู้ป่วยและเหตุก่อโรคไม่ได้เกิดต่อเนื่องทุกวัน จึงเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถกำหนดให้แน่นอนได้
2. นอกจากนี้วิถีชีวิตจริงของผู้ป่วยก่อนป่วยและหลังป่วย จะมีการสัมผัสและ เกี่ยวข้องกับปัจจัยเสี่ยงหลากหลายและเป็นวงกว้าง ดังนั้นพื้นที่เกิดเหตุ เวลาและตำแหน่งที่จะระบุบ่งบอกการสัมผัสเชื้อของผู้ป่วยจึงไม่สามารถกำหนดได้อย่างเจาะจง เพียงแต่ โอกาสสัมผัสที่มีบ่อยครั้งและเป็นเวลานานๆ จะใช้ เป็นตัววัดความเสี่ยง ร่วมกับการพบเชื้อก่อโรค
3. การสำรวจเฝ้าระวังโรคทางระบาดวิทยา ตามแนวทางของโครงการนี้ ได้พิสูจน์แล้วว่าเชื้อก่อโรคนี้ หนูมีอยู่จริงในธรรมชาติ และติดตามสำรวจได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-2 สัปดาห์หรือภายในเดือนเดียวกันกับเหตุเกิด จัดว่าเป็นการสำรวจตรวจค้นทางระบาดวิทยาที่มีประสิทธิภาพได้ผลและรวดเร็ว กว่าที่เคยปรากฏมาก่อน

ผลประโยชน์ที่สำคัญ ได้แก่ นอกเหนือจากความสามารถในการลดความเสี่ยงของโรคในผู้ป่วย จากการบ่งชี้โรคได้รวดเร็วและรับการรักษาที่เร็ว เป็นผลดีต่อชีวิตและอนาคต ตลอดจนเศรษฐกิจและครอบครัว ยังนำไปสู่การพัฒนา กลไกการเฝ้าระวังและควบคุมป้องกันโรค ของประเทศที่มีทิศทางชัดเจนขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. อุบัติการณ์ของการติดเชื้อเลปโตสไปราของคนที่เสี่ยงที่สำรวจพบใน จังหวัดน่าน
2. ชนิดและสายพันธุ์ (strain , species serogroups หรือ serovars) ที่พบทั้งคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ที่มีความสัมพันธ์เชิงระบาดวิทยา
3. นำผลการศึกษาที่ได้ไปใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาโครงการฯ ได้มีการขยายนำไปใช้ในการสืบค้นผู้ป่วยในพื้นที่อื่นและค้นพบเชื้อโรคนี้จากสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติที่แตกต่างออกไปจากโครงการ ได้แก่

3.1 การตรวจพบเชื้อที่แยกได้จากแหล่งน้ำในธรรมชาติอยู่ในพื้นที่เกษตรปลูกข้าว ในอำเภอนองกุง จังหวัดอุดรธานี โดยได้จากการติดตามบ่งชี้ทิศจากผู้ป่วยได้ทำนองเดียวกัน หลังจากทดลองตรวจด้วยชุดตรวจต้นแบบ (LEPkit) และได้ผลแสดง น่าจะป่วยด้วยโรคนี้ และ ทำการสอบสวนประวัติก่อนป่วยประมาณ 2 เดือนก่อนหน้า พบสัมผัสสิ่งแวดล้อม โดยการลงพื้นที่จับปลาจับสัตว์ตามแหล่งดินและน้ำธรรมชาติ จึงให้ติดตามสำรวจพื้นที่สงสัยดังกล่าว จนสามารถแยกเชื้อได้ 1 ตัวอย่าง ซึ่งอยู่ระหว่างการตรวจพิสูจน์สายพันธุ์ต่อไป

3.2 การต่อยอดใช้ประโยชน์ที่ได้ผลที่แตกต่างอีกแห่ง อยู่ในจังหวัดขอนแก่น

ปรากฏพบเชื้อก่อโรค (*L. interrogans*) ได้จากตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ (metacercaria) ตลอดจนแยกเชื้อได้ทั้งชนิดก่อโรค (pathogenic strain) และสงสัยก่อโรค (intermediate strain) จากตัวอย่าง ดิน น้ำ และปลา ที่ทำการสำรวจหลังจาก มีผู้อาศัยในพื้นที่ ตรวจผลบวกชุดตรวจต้นแบบ (LEPkit) แม้จะไม่แสดงอาการป่วยแต่อาจเป็นผู้ที่ป่วยไม่ชัดเจนและหายจากโรคได้เอง แต่เสี่ยงสัมผัสสิ่งแวดล้อมทั้งหมดที่สืบค้นพบดังกล่าว

การติดตามปัญหาโรคนี้ ตามกระบวนการกระบวนการศึกษาและใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ต้นแบบในแนวทางเดียวกับโครงการร่วมครั้งนี้ นอกจากสามารถช่วยวินิจฉัยโรคที่ได้ผลรวดเร็วตั้งแต่แรกป่วยและ แพทย์รักษาผู้ป่วยได้ทันทั่วทั้งที่ไม่เกิดโรครุนแรงตามมา ยังนำไปสู่การเฝ้าระวังป้องกันและลดความเสี่ยงของประชาชนในพื้นที่ ซึ่งได้ผลเป็นที่ประจักษ์ในพื้นที่จังหวัดน่าน และยังคงพบความรู้ใหม่เกี่ยวกับการเกิดโรคร่วม (co infection) ระหว่างโรคนี้และโรคพยาธิใบไม้ตับในคนไทย

การประยุกต์ใช้ประโยชน์ของการวิจัยและนวัตกรรมในครั้งนี้ จะได้มีการขยายผลต่อยอดออกไป นวัตกรรมมากขึ้นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ที่มีปัญหาโรคที่เปลี่ยนแปลงจากเดิม มีผู้เสียชีวิตมากขึ้นจากปัญหาขาดชุดตรวจที่ใช้ได้ผล แผนงานต่อไปจะมีการร่วมจัดทำโครงการ เพื่อการควบคุมป้องกันปัญหาโรคนี้ให้ครอบคลุมมากขึ้นต่อไป โดยกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข จะมีส่วนร่วมและผลักดันให้เป็นรูปธรรมในอนาคตต่อไป

โครงการย่อยที่ 1.2

ความสัมพันธ์ระหว่างการจำแนกทางซีรัมวิทยาและพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากสัตว์พาหะใน
เขตจังหวัดน่าน

โดยทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พื้นที่ศึกษา

คณะผู้วิจัยได้กำหนดพื้นที่เป้าหมายในเขตจังหวัดน่าน โดยคัดเลือกพื้นที่ที่มีผู้ป่วยที่ซึ่งแพทย์วินิจฉัยว่าเป็นโรคฉี่หนู หรือมีประวัติเสี่ยงต่อการสัมผัสโรค หรือเป็นไข้ไม่ทราบสาเหตุ โดยมีไข้สูงมากกว่า 38 องศาเซลเซียส ภายหลังตรวจพบและยืนยันพบผู้ป่วยจากการทดสอบคัดกรองขั้นต้น จะมีขั้นตอนการเก็บข้อมูลทางระบาดวิทยาเพื่อวิเคราะห์สถานการณ์และกำหนดขอบเขตรายละเอียดของพื้นที่เป้าหมายสำรวจ จากนั้นจะมีการเก็บตัวอย่างน้ำ และ ดิน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สงสัย ในพื้นที่ที่ระบุเป็นเป้าหมายจะออกสำรวจสิ่งแวดล้อม หรือบริเวณคอกเลี้ยงสัตว์ หรือโรงฆ่าสัตว์ (โดยทีมสัตวแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดสัตว์ หรือชิ้นเนื้อ หรือตัวอย่างปัสสาวะ) เพื่อดำเนินการสุ่มตัวอย่างสัตว์ร้อยละ 10 ของจำนวนสัตว์ทั้งหมดที่ผู้ป่วยมีประวัติสัมผัส พร้อมเก็บข้อมูลมีการสอบถามสภาพการเลี้ยงสัตว์ เพื่อหาความเสี่ยงของการติดเชื้อระหว่างสัตว์และคน นอกเหนือจากการเก็บตัวอย่างสัตว์ตามบริเวณเป้าหมายระบุให้แล้ว ทางทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จะทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพิ่มเติม ใน อำเภอเวียงสา และ อำเภอปัว เป็นจำนวนไม่ต่ำกว่า 2 ครั้ง/ปี เป็นเวลา 2 ปี รวมไม่ต่ำกว่า 4 ครั้งโดยจะเก็บตัวอย่างจากสัตว์เลี้ยง ปศุสัตว์ รวมไปถึงสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ

ทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จะทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมตลอดปีเป็นระยะเวลา 2 ปีในพื้นที่ศึกษาบริเวณบ้านสบซุ่น หมู่ 7 ตำบลป่าคา อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน ซึ่งเป็นพื้นที่เดียวกันกับที่มีกลุ่มผู้ป่วยเมื่อเดือนมิถุนายน พศ. 2556 ซึ่งมีการชี้เป้าพื้นที่โดยสำนักระบาดวิทยา ทั้งนี้การกำหนดชี้เป้าพื้นที่มาจากกลุ่มผู้ที่ได้ผลบวกคัดกรองโรคด้วยชุดตรวจพิเศษแบบรวดเร็ว (LEPkit) ร่วมกับผลวิเคราะห์ทางระบาดวิทยาเบื้องต้นจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล

การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างจากสัตว์เป็น โดยผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการใช้สัตว์เพื่อการศึกษา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างและวิธีการเก็บตัวอย่าง (โดยอบรมเรื่องการเก็บตัวอย่างและขั้นตอนการส่งอย่างถูกต้องให้กับคนในพื้นที่ที่ร่วมโครงการ) เก็บตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อขนส่งที่ผสม 1% bovine serum albumin และ 5-fluorouracil 100-200 µg/ml (Faine, 1999) ในภาชนะที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 5 °C

ทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมีการดำเนินการปฏิบัติจริงเริ่มตั้งแต่ มีนาคม 2556 ถึงปัจจุบัน โดยเก็บทั้งสิ้น 6 ครั้ง ตัวอย่างที่เก็บได้แก่

- ตัวอย่างโค ปัสสาวะไม่ต่ำกว่า 10 มล. และเลือดไม่ต่ำกว่า 5 มล.
- ตัวอย่างสุกรแท้งระยะท้าย เก็บชิ้นเนื้อจาก รก เลือดหรือน้ำปัสสาวะแม่สุกรจำนวนไม่ต่ำกว่า 5 มล.
- ตัวอย่างสุนัขและแมว โดยเก็บเลือดและน้ำปัสสาวะ โดยเลือกจากสัตว์ที่เคยมีประวัติของอาการไข้สูง และยังไม่ได้ทำวัคซีน
- ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ

การวินิจฉัยเชื้อ

การเพาะแยกเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ semi - solid EMJH ที่ผสม 3% ซีรัม กระต่าย, 5-fluorouracil และ 1% agarose (Heisey et al., 1988; Faine, 1999) และ EMJH broth ทำการตรวจสอบเชื้อ ทุก 7 วันจนครบ 1 เดือน จากนั้นตรวจเชื้อทุกเดือนจนครบ 6 เดือน ด้วย dark field microscopy และ เพาะเชื้อบริสุทธิ์ใน EMJH broth เก็บเชื้อบริสุทธิ์ใน passage ที่ 2-5 เอาไว้ในตู้เย็น - 80 ° C เพื่อเตรียมใช้สำหรับวิธีทางอนุชีวโมเลกุล ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งส่งตรวจในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LVW agar ทำตามคำแนะนำของ วูธิเอกอนันต์และคณะ (Wuthiekanun et al., 2013; Wuthiekanun et al., 2014)

การคัดกรองตัวอย่างด้วยวิธี 16S rRNA PCR และ rrs nested PCR

สกัด DNA จากสิ่งตรวจด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ยืนยันความบริสุทธิ์ของ DNA template ด้วย spectrophotometer ใช้ primers ที่ 16S rRNA ในการตรวจสอบขั้นต้น จากนั้นใช้ rrs nested PCR ที่จำเพาะกับเชื้อ intermediate และ pathogenic *Leptospira* sp. ตามปฏิบัติวิธีของ Boonsilp และคณะ (Boonsilp et al., 2011)

การสำรวจสถานภาพการติดเชื้อด้วย Microscopic agglutination test

ใช้เชื้อ *Leptospira* spp. ทั้ง 26 serovars เป็นแอนติเจนเพื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเลปโตสไปโรซิส ในซีรัม ของสัตว์ที่ต้องการทดสอบ จะเกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (Agglutination) เมื่อดู ด้วยกล้อง dark field ผลบวกจะเกิดการเกาะ กลุ่มกันของเชื้อ *Leptospira* การตรวจใช้ซีรัมต่อเชื้อมาตรฐานเป็น positive control และใช้ Phosphate buffer solution (PBS) บริสุทธิ์เป็น negative control ผลไตเตอร์ จะตัดสินที่หลุมสุดท้ายที่ให้ผล 80 % agglutination

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ด้วยวิธี Multi Locus Sequence Typing (MLST)

ทำการแยก DNA จากเชื้อเลปโตสไปราก่อโรคที่บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด DNA จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA ของยีนทั้ง 7 housekeeping ยีน ที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีอำนาจแยกแยะในการระบุความหลากหลายของสายพันธุ์ ได้แก่ *glmU*, *pntA*, *sucA*, *tpiA*, *pfkB*, *mreA* และ *caiB* (Boonsilp et al., 2013) ด้วยวิธี PCR สกัดผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และนำไปลำดับสาย พันธุกรรม DNA (DNA sequencing) จากนั้นประมวลผลลำดับสายพันธุกรรมและจัดแผนภาพ (dendrogram) ด้วย โปรแกรม Vector NTI, BioEdit และ Mega4 นำข้อมูลจากการลำดับสายพันธุกรรมไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุ หมายเลข loci ของแต่ละยีน และระบุชนิดของ sequence type ผ่านเว็บไซต์ที่ <http://leptospira.mlst.net> (Thaipadungpanit et al., 2007)

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ด้วยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis

ทำการละลายเชื้อบริสุทธิ์และปรับความเข้มข้นสุดท้ายให้เท่ากับ 9×10^8 cells/ml. บรรจุภายใน 2% low-melting-point agarose blocks เก็บใน Tris-EDTA ที่อุณหภูมิ 4°C แบคทีเรียภายในเจลจะถูกย่อยด้วย lysis buffer ที่มีเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ proteinase K, lysozyme และ lysostaphin DNA ต้นแบบจะถูกเตรียมไว้ที่ 20 U เพื่อการตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะใน 100 μ l *NotI* ใช้ *Salmonella* serotype Branderup strain H9812 ที่ถูกตัดด้วย *XbaI* เป็นกลุ่มควบคุมมาตรฐาน การทดสอบ ภายหลังจากการเตรียม DNA เพื่อพร้อมแสดงลายพิมพ์ลายนิ้วมือแล้ว นำเจลบรรจุ DNA เข้าสู่เครื่อง contour-clamped homogeneous electric field (CHEF) (CHEF-DR11, Bio-rad, Hercules, California). เพื่อแยกส่วน

DNA ภายหลังจากกระบวนการแยก DNA แล้ว เจลที่มีลายนิ้วมือ DNA จะถูกแสดงด้วย 1 µg/ml ethidium bromide (Machry et al., 2010)

รายงานผลการทดลอง

ที่วิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการเก็บตัวอย่างทั้ง 6 ครั้ง ระหว่างเดือน มีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558 คณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างจาก อำเภอเมือง อำเภอท่าวังผา และอำเภอเชียงกลาง จังหวัดน่าน ได้ตัวอย่างเป็น ตัวอย่างปัสสาวะ และ/หรือตัวอย่างเลือด จาก โค กระบือ สุกร สุนัข แมว หนู แกะ ผู้ป่วย และตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสิ้น 525 ตัวอย่าง ดังแสดงตาม ตารางที่ 4

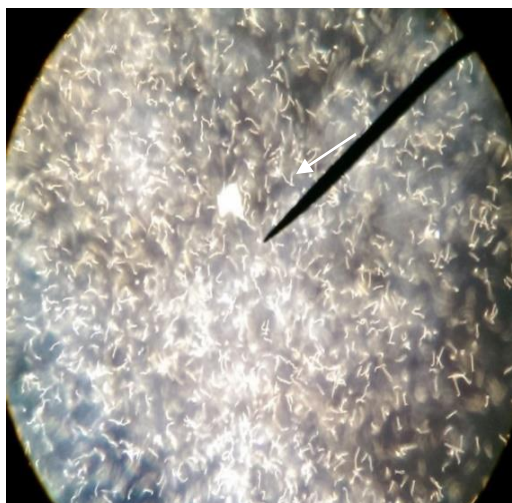
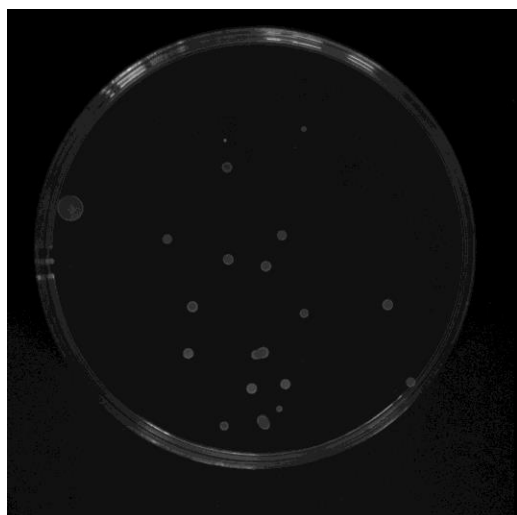
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ระหว่างเดือนมีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558

Duration	Animal	Muang Nan		Tha Wang Pha/ Chiang Klang			Total
		Urine/kidney	Blood	Urine	Blood	Water	
March 2013 - September 2015	Cattle	27	69	97	0	0	193
	Buffaloes	3	1	4	0	0	8
	Pigs	4	0	138	0	0	142
	Dogs	14	31	44	59	0	148
	Cats	1	5	0	0	0	6
	Rodent	6	0	0	0	0	6
	Goats	1	0	0	0	0	1
	Humans	0	0	7	0	0	7
	Water	0	0	0	0	14	14
	Total	56	106	290	59	14	525

ผลการทดลอง

ทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนมีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558 ตัวอย่างปัสสาวะและน้ำจากสิ่งแวดล้อม ได้ถูกนำมาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ liquid EMJH และ semi-solid EMJH พบลักษณะ *Leptospira*-like microorganism ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดมีดจำนวน 11 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากปัสสาวะโค 1 ตัวอย่าง, ปัสสาวะสุกร 6 ตัวอย่าง และปัสสาวะสุนัข 4 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราได้จากปัสสาวะสุนัขจำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.76 ของตัวอย่างทั้งหมด. เชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากสุนัขแสดงในภาพที่ 4



รูปภาพที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อเลปโตสไปราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด *Leptospira* Vanaporn Wuthiekanun (LVW) agar (A) และลักษณะ *Leptospira*-like microorganism ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดมีดกำลังขยาย 40X (B)

ผลทางซีรั่มวิทยาจากการตรวจด้วยวิธี Microscopic agglutination test (MAT) จากตัวอย่างจากโค, กระบือ, สุนัข และแมว จำนวน 210 ตัวอย่าง โดยมี cut-off titer ที่ $\geq 1 : 80$ พบว่า มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 8.06 โดยเป็นตัวอย่างจากโค จำนวน 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10.62 (17/150) จากตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บในโค ในขณะที่ตัวอย่างเลือดจากสัตว์ชนิดอื่นให้ผลลบต่อ MAT

ซีโรกรุ๊ปที่พบมากที่สุดในพื้นที่ คือ Shermani พบร้อยละ 4.76 (10/210) รองลงมาคือ Sejroe พบร้อยละ 0.94 (2/210) และ Tarassovi พบร้อยละ 0.47 (1/210) พบ Multiple serogroups ในตัวอย่างจำนวน 4 ตัวอย่างที่ค่า MAT titer $\geq 1 : 80$ เท่ากัน ประกอบไปด้วยซีโรกรุ๊ป Icterohaemorrhagiae/Sarmin /Sejroe หรือ Shermani/Tarasovi เป็นต้น ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ MAT

ตารางที่ 5 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วย MAT (cut-off titer $\geq 1:80$)

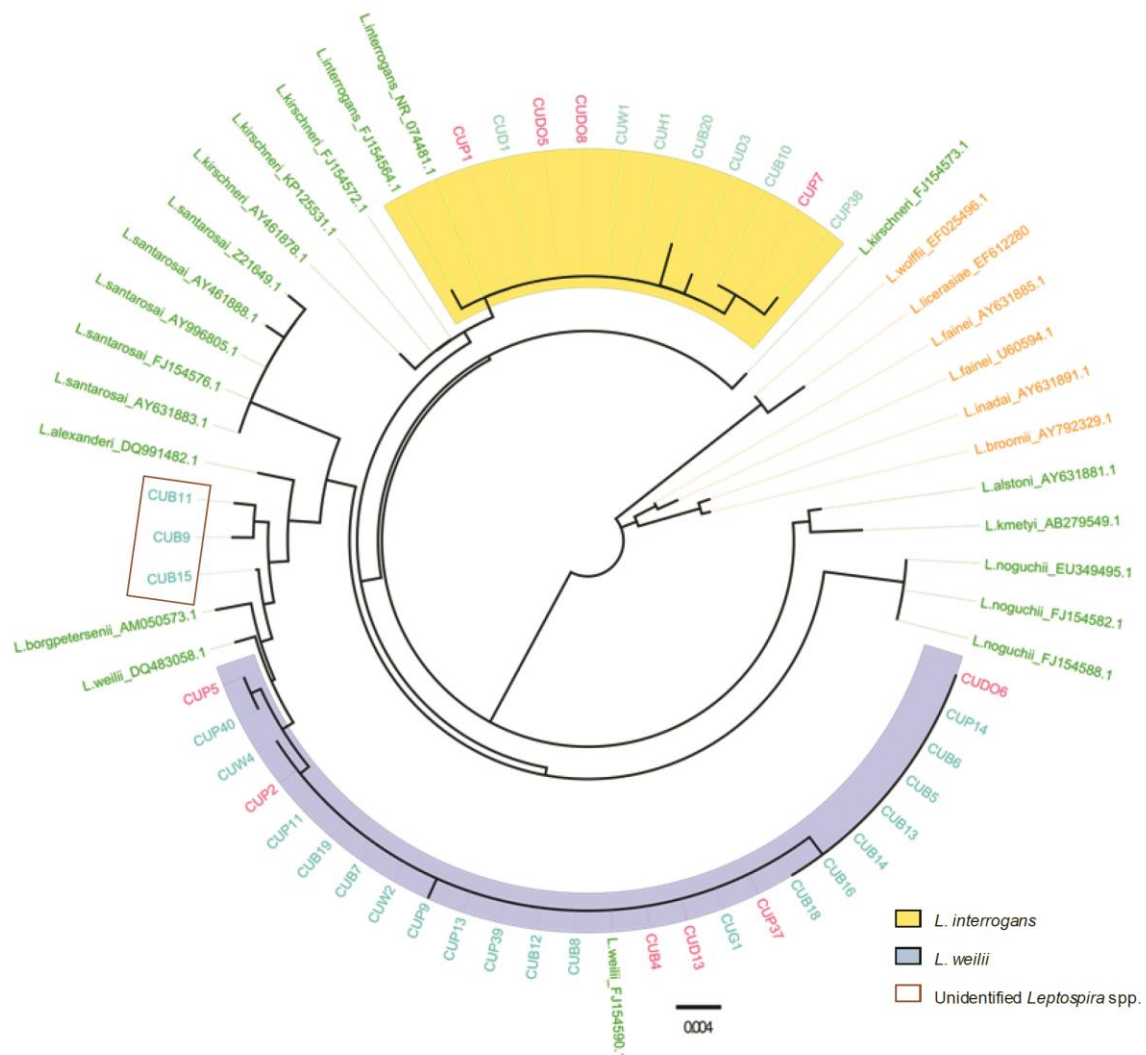
Serogroup	No. of animals seropositive titer			Frequency
	(n=210)			
	1:80	1:160	1:320	
Single				
Sejroe	2			0.94% (2/210)
Shermani	6	3	1	4.76% (10/210)
Tarasovi	1			0.47% (1/210)
Multiple				
Djasiman/Grippotyphosa [†]	1	1		0.47% (1/210)
Icterohaemorrhagiae/				
Sarmin/Sejroe	1			0.47% (1/210)
Shermani/Tarasovi	1			0.47% (1/210)
Shermani/Icterohaemorrhagiae	1			0.47% (1/210)
Total				8.09% (17/210)

ผลการตรวจทางอณูชีวโมเลกุลด้วยวิธี *rrs* nested PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 39 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากโค, สุกร, สุนัข, แพะ, คน และน้ำ จำนวน 16, 12, 6, 1, 1, และ 3 คิดเป็นร้อยละ 12.2, 8.4, 10.3, 100, 14.2 และ 21.4 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนร้อยละและจำนวนสัตว์ที่ให้ผลต่อ *rrs* nested PCR

Type	No.of tested sample	Total of positive <i>rrs</i> nested PCR (n=39)
Cattle	131	12.2% (16/131)
Pigs	142	8.4% (12/142)
Dogs	58	10.3% (6/58)
Humans	7	14.2% (1/7)
Water	14	21.4% (3/14)
Goats	1	100% (1/1)
Cats	1	0
Rodent	6	0
Total	360	10.8% (39/360)

ตัวอย่างปัสสาวะและน้ำที่ให้ผลบวกต่อ *rrs* nested PCR จะถูกส่งไปทำ DNA sequencing เพื่อระบุชนิดของเชื้อ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank database พบว่า มีตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มของ *L. interrogans* ประกอบไปด้วยตัวอย่างจากคน, สัตว์ (โค, สุกร, สุนัข) และสิ่งแวดล้อม (น้ำ) มีตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง อยู่ในกลุ่ม *L. weillii* ประกอบไปด้วยตัวอย่างจาก สัตว์ (โค, สุกร, สุนัข) และสิ่งแวดล้อม (น้ำ) และมีตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่างจากโค ที่ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้แต่มีความใกล้เคียงกับ *L. alexanderi* (CUB9, CUB11) และ *L. borgpetersenii* (CUB15)



รูปภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *rrs* (443 bp). อักษรสีเขียวแสดง pathogenic *Leptospira* จาก GenBank database, อักษรสีส้มแสดง Intermediate *Leptospira* จาก GenBank database, อักษรสีฟ้าแสดง culture-negative,PCR positive samples และอักษรสีชมพูแสดง culture-positive,PCR positive samples

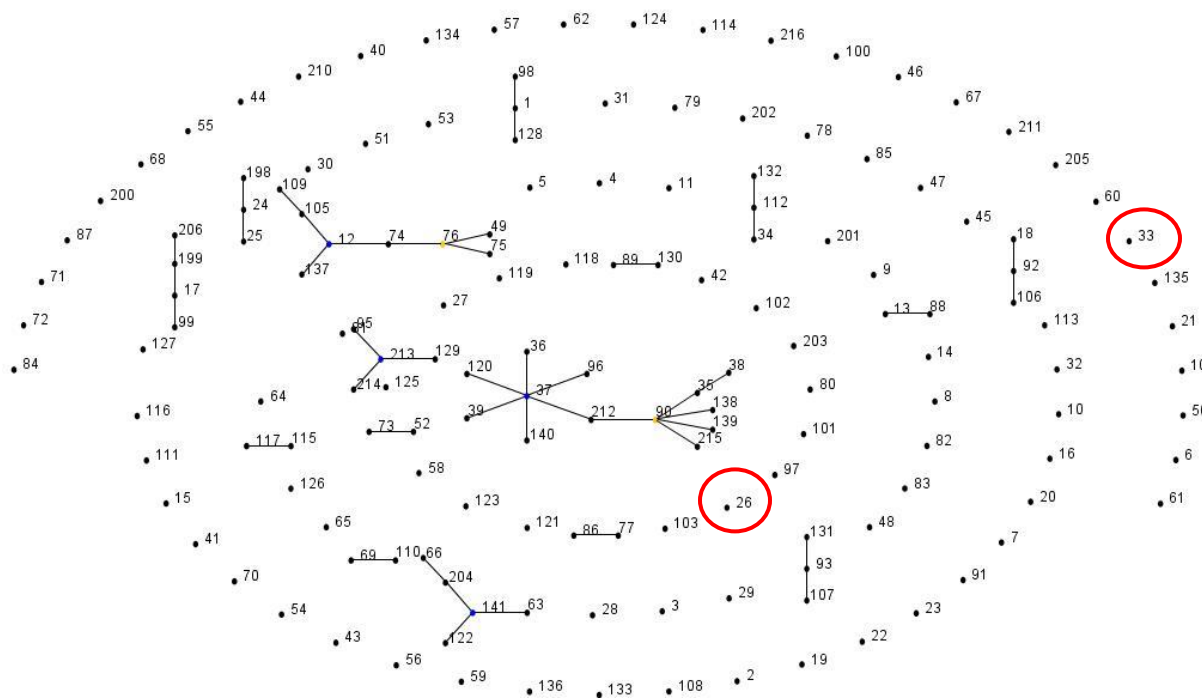
เพื่อเป็นการยืนยันชนิดของเชื้อ *Leptospira* spp. ตัวอย่างบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้จากปัสสาวะสุนัข จำนวน 4 ตัวอย่างได้ถูกนำมาทำ near full-length 16S rRNA sequencing และ Multi Locus Sequence Typing (MLST) พบว่าตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *Leptospira* spp. ที่แยกได้ มีความคล้ายคลึงกับ *L. interrogans* และ *L. weilli* (99% Maximum Identity) จากการทำ near full-length 16S rRNA sequencing และ ให้ sequence type (ST) ชนิดใหม่ จากการ ทำ MLST คือ ST26 และ ST33 จาก *L. interrogans* และ ST94 จาก *L. weilli* ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 แสดงผล species ของเชื้อ *Leptospira* spp. และเปอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดย near full-length 16S rRNA sequencing

Sample strain	Host	Species	Max identity
D05	Dog	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
D06	Dog	<i>Leptospira weilli</i>	99%
D08	Dog	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
D13	Dog	<i>Leptospira weilli</i>	99%

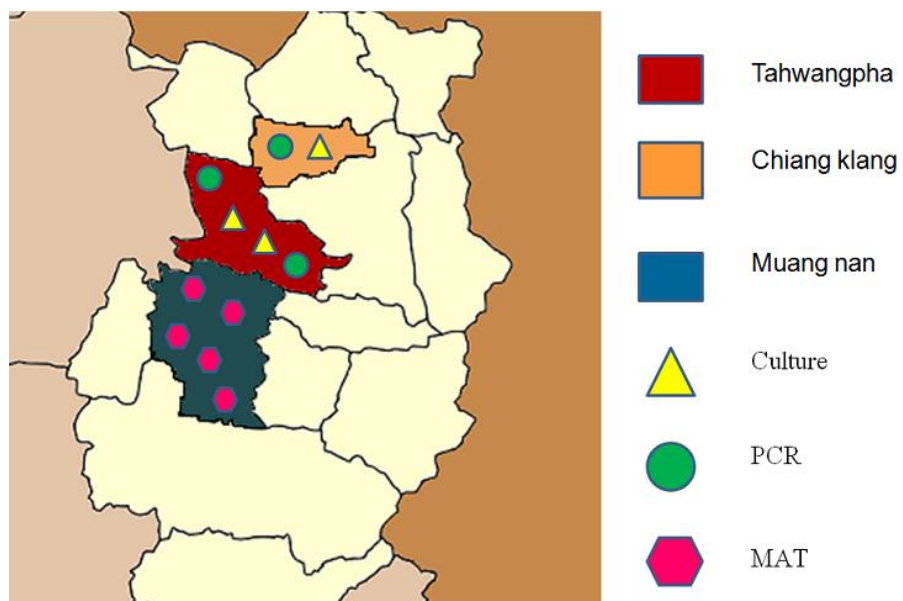
ตารางที่ 8 แสดงผล species ของเชื้อ *Leptospira* spp. และ Sequence type (ST) โดย Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Sample strain	Host	Species	ST
D05	Dog	<i>Leptospira interrogans</i>	26
D06	Dog	<i>Leptospira weilli</i>	94
D08	Dog	<i>Leptospira interrogans</i>	33
D13	Dog	<i>Leptospira weilli</i>	94



รูปภาพที่ 6 แสดง Clonal complex ของเชื้อ *Leptospira interrogans* โดย Sequence Type (ST) ที่แยกได้จากสุนัข คือ ST26 และ ST33 มีลักษณะเป็น singleton และไม่สัมพันธ์กับ ST ที่เคยพบ

F-CO-CPM-11 Rev0
PAGE 33 OF 77



รูปภาพที่ 8 แสดงจำนวนผลบวกต่อเชื้อ *Leptospira* spp. แยกตามพื้นที่คือ อำเภอเมืองน่าน อำเภอเชียงกลาง และอำเภอท่าช้าง

โครงการย่อยที่ 1.2

ในการวิจัย ระหว่างเดือนมีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558 คณะผู้วิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะ/ตัวอย่างเลือด จากสัตว์เลี้ยงรอบบ้านผู้ป่วย ตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วย และตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมรอบบ้านผู้ป่วย ซึ่งเป็นตัวอย่างที่คาดว่าผู้ป่วยน่าจะมีโอกาสประวัติสัมผัส ตัวอย่างปัสสาวะและน้ำถูกนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อจำนวน 11 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *Leptospira* spp. ที่บริสุทธิ์ได้จากตัวอย่างสุนัขจำนวน 4 ตัวอย่าง ในพื้นที่ตำบลปากา อำเภอท่าวังผา ในขณะที่ตัวอย่างที่เหลือไม่สามารถแยกเชื้อได้ เนื่องจากตัวอย่างมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียชนิดอื่นสูงจากอุจจาระของสัตว์แม้ว่าจะมีการใส่ยาปฏิชีวนะและการกรอง

ตัวอย่างปัสสาวะและน้ำส่วนหนึ่งถูกนำมาตรวจด้วยวิธี PCR โดยใช้ *rrs* nested PCR primer ซึ่งมีความจำเพาะต่อ intermediate และ pathogenic *Leptospira* spp. พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งสิ้น 39 ตัวอย่าง โดยพื้นที่ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วย PCR มากที่สุดคือ อำเภอท่าวังผา. Duplicate nested PCR amplicons ที่ได้ถูกส่งไปทำ DNA sequencing และสร้างต้นไม้ไฟโลเจเนติกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 443 bp พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rrs* สามารถระบุเชื้อ *Leptospira* spp. ในพื้นที่หลักๆ ได้เป็น *L. interrogans* และ *L. weilli*. จากตัวอย่างปัสสาวะคนป่วย สัตว์เลี้ยง และน้ำ

ตัวอย่างเลือดทั้งหมดที่นำมาตรวจวินิจฉัยทางซีรัมวิทยาเพื่อสำรวจสถานภาพการติดเชื้อด้วยวิธี Microscopic agglutination test ตัดสินผลสุดท้ายที่ให้ได้ 50 % agglutination พบว่าการกระจายตัวของ *Leptospira* serovars ในพื้นที่เป็น *Leptospira* serovars Shermani มากที่สุด ถัดมาคือ *Leptospira* serovars Sejroe โดยทั้ง 2 serovars พบมากที่สุดที่โค ในขณะที่ผลจากตัวอย่างสุนัขที่สามารถเพาะแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากปัสสาวะไม่สอดคล้องกับผลจาก MAT เป็นไปได้ว่าการติดเชื้อในระยะเรื้อรัง เชื้อ *Leptospira* spp. มักไปอาศัยอยู่ที่ท่อไต และไม่กระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในกระแสเลือดเป็นผลให้การตรวจด้วย MAT เป็นลบ (Otaka et al., 2012) นอกจากนั้นแล้ว การตรวจทางซีรัมวิทยาพบว่าการ cross reaction ระหว่าง species ได้ (Chirathaworn et al., 2014) และการตรวจพบ titer ที่สูงขึ้นไม่ได้บ่งชี้ว่าสัตว์ป่วยในขณะนั้น ในขณะที่ผลการตรวจด้วยวิธี PCR และ DNA sequencing สอดคล้องกับผลจากการเพาะเชื้อ และมีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อมากเพียงพอที่จะตรวจการเป็น carrier ในสัตว์ได้ แต่การเพาะเชื้อจากตัวอย่างยังคงเป็นวิธีการตรวจที่แม่นยำที่สุดแต่ใช้เวลานานกว่าเชื้อจะเจริญเติบโต

ตัวอย่างปัสสาวะจากสุนัขที่บริสุทธิ์แล้วได้ถูกนำไปจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี near full-length 16S rRNA sequencing และ Multi Locus Sequence Typing (MLST) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากในสุนัขเป็น *L. interrogans* และ *L. weilli* ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากยีน partial *rrs* (443 bp) ในขณะที่ MLST พบว่าเชื้อที่แยกได้จากสุนัข คือ *L. interrogans* และ *L. weilli* เช่นเดียวกัน และให้ sequence type (ST) ใหม่ ที่ไม่เคยพบในประเทศใด โดย STs ที่ได้ คือ ST26 และ ST33 สำหรับ *L. interrogans* และ ST94 สำหรับ *L. weilli* โดย *L. weilli* ที่แยกได้จากสุนัขมีความใกล้เคียงกับ *L. weilli* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศลาวและประเทศจีน

จากผลของ MLST และ phylogenetic tree ของยีน *rrs* พบว่า ถึงแม้ตัวอย่างที่ได้จะอยู่ในกลุ่ม *L. interrogans* เหมือนกัน (DO5 และ DO8) แต่ ST จาก MLST กลับแตกต่างกัน (ST26 และ ST33) แสดงถึงที่มาของเชื้อที่แตกต่างกัน ในขณะที่ ตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่ม *L. weilli* (DO6 และ DO13) ให้ ST ที่เหมือนกัน (ST94) บ่งชี้ว่าเชื้อในสุนัขทั้งสองมีที่มาจากแหล่งเดียวกัน ซึ่งในแง่ของความน่าเชื่อถือของแหล่งที่มาว่าเชื้อ *Leptospira* spp. มีแหล่งที่มาเดียวกันหรือไม่นั้น การ

ตรวจด้วย MLST ย่อมมีความน่าเชื่อถือมากกว่า *rrs* ทั้งในส่วนของความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้วิเคราะห์และจำนวนยีน (Thaipadungpanit et al., 2007)

โดยสรุปแล้วจากการสำรวจพบว่า พื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค เป็นพื้นที่ในอำเภอท่าวังผา โดยเฉพาะตำบลป่าคา โดยพบการมีอยู่ของเชื้อทั้งในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยเชื้อที่พบ คือ *L. interrogans*

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ในระหว่างเดือนมีนาคม 2556 ถึง สิงหาคม 2558 ทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้เก็บลงพื้นที่เก็บตัวอย่างปัสสาวะ/เลือด จากสัตว์เลี้ยงรอบบ้านผู้ป่วย ตัวอย่างปัสสาวะจากผู้ป่วย และตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมรอบบ้านผู้ป่วย ได้ตัวอย่างทั้งสิ้น 525 ตัวอย่าง ตัวอย่างปัสสาวะ/น้ำ ส่วนหนึ่งจะถูกนำมาเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH broth และ semi-solid อีกส่วนหนึ่งจะถูกนำมาสกัด DNA เพื่อทำ PCR ในขณะที่ตัวอย่างเลือดจะถูกนำไปทำ MAT เพื่อหาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเชื้อ *Leptospira* spp. พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะเชื้อ 11 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากสุนัขได้ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.76 ของตัวอย่างทั้งหมด

จากการตรวจด้วย *rrs* nested PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก 39 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.42 เชื้อ *Leptospira* spp. ที่พบในพื้นที่จากการทำ DNA sequencing ทั้งจากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ และ ตัวอย่างปัสสาวะ/น้ำ และจากการจัด phylogenetic tree พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *L. interrogans* และ *L. weillii* (99% maximum identity) โดยพื้นที่ที่พบเชื้อ *Leptospira* spp. มากที่สุดคือ อำเภอท่าวังผา

ผลทางซีรัมวิทยาด้วยวิธี MAT พบว่ามีการกระจายตัวของ *Leptospira* serovars ในพื้นที่อำเภอเมืองน่านเป็น *Leptospira* serovars Shermani มากที่สุด ถัดมาคือ *Leptospira* serovars Sejroe โดยทั้ง 2 serovars พบมากที่สุดที่โค แม้ว่า MAT จะเป็น Gold standard ในการตรวจวินิจฉัยและหาการระบาดของเชื้อ แต่ขั้นตอนการตรวจไม่สามารถทำได้เองในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนั้นการตรวจ MAT ยังจำกัดการตรวจ serovar เฉพาะ *L. interrogans* เท่านั้น จึงเป็นไปได้ว่าถ้าสัตว์ในพื้นที่ติดเชื้อเลปโตสไปราด้วยสายพันธุ์อื่นผลของ MAT อาจรายงานเป็นลบ

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี near full- length 16S rRNA sequencing และ Multi Locus Sequence Typing (MLST) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากในสุนัขเป็น *L. interrogans* และ *L. weillii* ซึ่งสอดคล้องกับการทำ DNA sequencing จากตัวอย่างส่งตรวจด้วยยีน *rrs* และจาก MLST พบว่าเชื้อที่แยกได้จากสุนัข คือ *L. interrogans* และ *L. weillii* ซึ่งให้ sequence type (ST) ใหม่ ที่ไม่เคยพบในประเทศใด โดย ST ที่ได้ คือ ST26 และ ST33 สำหรับ *L. interrogans* และ ST94 สำหรับ *L. weillii* โดย *L. weillii* ที่แยกได้จากสุนัขมีความใกล้เคียงกับ *L. weillii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศลาวและประเทศจีน.

ปัญหาหลักที่พบในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การสืบค้นประวัติของผู้ป่วยที่เป็น index case เนื่องจากผู้ป่วยบางรายไม่มีชื่อในบัญชีราษฎร และพบการระบุบ้านเลขที่ หรือหมู่บ้านที่ไม่ตรงตามความเป็นจริง นัดหมายกับชาวบ้านยาก เนื่องจากการเก็บตัวอย่างและการสอบถามดำเนินการในช่วงกลางวัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ชาวบ้านไปทำงาน ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยอาจให้สาธารณสุขประจำอำเภอหรือตำบลช่วยประสานการให้ข้อมูล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ให้ข้อมูลที่มีความสำคัญทางด้านระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์เลี้ยงในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการควบคุม และป้องกันโรคนี้ได้ในอนาคต

โครงการย่อยที่ 1.3

การศึกษาความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากสัตว์ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในเขต
จังหวัดน่าน

โดยทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล มีแนวทางการลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่าง 2 แนวทางคือ

- 1) การสำรวจและเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ศึกษา ณ บ้านสบซุน หมู่ 7 ต. ป่าคา อ. ท่าวังผา โดยลงพื้นที่ต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี
- 2) การติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนู ทีมวิจัยทำการประสานทีมระบาดวิทยานานเพื่อขอข้อมูลผู้ป่วยโรคฉี่หนู จากนั้นจึงลงพื้นที่ติดตามผู้ป่วยเพื่อเก็บตัวอย่างจากบริเวณบ้านและที่ทำงานของผู้ป่วยที่เป็นจุดเสี่ยงของการติดเชื้อโรคฉี่หนู

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างหนู เก็บเลือด น้ำปัสสาวะ และ ไต (กรณีผ่าซาก)

ตัวอย่างสัตว์ในธรรมชาติอื่นๆ เช่น กระรอก, กระแต, พังพอน เก็บเลือดและน้ำปัสสาวะ

ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมได้แก่ น้ำและดิน

ตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วย

รายงานผลการทดลอง

ทีมวิจัยลงพื้นที่ของเขตจังหวัดน่านเพื่อเก็บตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมที่มีความเชื่อมโยงกับผู้ป่วยโรคฉี่หนูตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 ตลอดโครงการรวมทั้งสิ้น 6 ครั้ง ซึ่งจำนวนตัวอย่างสัตว์ สิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยที่เก็บได้แบ่งตามช่วงเวลาที่ลงพื้นที่แสดงตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนตัวอย่างสัตว์ สิ่งแวดล้อมและผู้ป่วยที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ของเขตจังหวัดน่านแบ่งตามช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง

ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง ปี พ.ศ. (จำนวนครั้งที่ลงพื้นที่เก็บ ตย.)	จำนวนตัวอย่าง			รวม
	สัตว์	สิ่งแวดล้อม	ผู้ป่วย	
2556 (1)	36	20	0	56
2557 (3)	119	103	0	222
2558 (2)	0	128	7	135
รวม	155	251	7	413

ทีมวิจัยลงพื้นที่เก็บตัวอย่างครอบคลุม 6 อำเภอของจังหวัดน่าน ได้แก่ อำเภอท่าวังผา อำเภอเชียงกลาง อำเภอเมืองน่าน อำเภอภูเพียง อำเภอเวียงสาและอำเภอนาหมื่น โดยตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละพื้นที่แสดงตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละอำเภอของเขตจังหวัดน่าน

อำเภอ	จำนวนตัวอย่าง			รวม
	สัตว์	สิ่งแวดล้อม	ผู้ป่วย	
ท่าวังผา	155	153	0	308
เชียงกลาง	0	35	0	35
เมืองน่าน	0	31	4	35
ภูเพียง	0	7	1	8
เวียงสา	0	5	0	5
นาหมื่น	0	20	2	22
รวม	155	251	7	413

ตัวอย่างที่เก็บได้สามารถจำแนกตามการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยของเขตจังหวัดน่านได้ตามตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยของเขตจังหวัดน่าน

พื้นที่	จำนวนตัวอย่าง			รวม
	สัตว์	สิ่งแวดล้อม	ผู้ป่วย	
พื้นที่ศึกษา	155	122	0	277
ติดตามผู้ป่วย	0	129	7	136
รวม	155	251	7	413

การสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ศึกษา ทีมวิจัยเลือกบ้านสบซุ่น หมู่ 7 ต. ป่าคา อ. ท่าวังผา เป็นพื้นที่ศึกษา เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีรายงานพบผู้ป่วยโรคฉี่หนูเป็นประจำ ประกอบกับช่วงของการเริ่มต้นโครงการวิจัยประมาณเดือนกรกฎาคม 2556 สำนักระบาดวิทยานำนายงานพบผู้ป่วยสงสัยโรคฉี่หนูในพื้นที่นี้จำนวน 3 ราย การลงสำรวจพื้นที่ศึกษาได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 ปี โดยทีมวิจัยเก็บตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่เป็นจุดเสี่ยงที่ชาวบ้านมีโอกาสสัมผัสจากกิจกรรมที่ทำทั้งบริเวณที่บ้านและที่ทำงานของชาวบ้าน โดยรายละเอียดของตัวอย่างที่เก็บได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาแสดงตามตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาแบ่งตามช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง

ช่วงเวลาเก็บตัวอย่าง ปี พ.ศ.	จำนวนตัวอย่าง			รวม
	หนู	สัตว์ตามธรรมชาติ	สิ่งแวดล้อม	
2556	36	0	20	56
2557	99	20	96	215
2558	0	0	6	6
รวม	135	20	122	277

สำหรับการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนูใน 6 อำเภอของเขตจังหวัดน่าน ทีมวิจัยสามารถเก็บตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เป็นจุดเสี่ยงของการติดเชื้อโรคฉี่หนูที่ผู้ป่วยแต่ละรายมีโอกาสสัมผัสก่อนมีอาการป่วย ซึ่งเป็นตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เก็บได้จากจุดเสี่ยงบริเวณบ้านเรือนที่อยู่อาศัยและบริเวณเรือกสวนไร่นาที่ผู้ป่วยไปทำงานก่อนป่วย นอกจากนี้ในการลงพื้นที่ของทีมวิจัยครั้งสุดท้ายในช่วงเดือนกันยายน 2558 เพื่อติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนู ทีมวิจัยมีโอกาสดำเนินการเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเพื่อนำมาตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในห้องปฏิบัติการด้วย รายละเอียดของตัวอย่างที่เก็บได้จากการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนูในแต่ละอำเภอแสดงตามตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนตัวอย่างที่เก็บได้จากการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนูในแต่ละอำเภอของเขตจังหวัดน่าน

อำเภอ	จำนวนผู้ป่วยที่ติดตาม	จำนวนตัวอย่าง	
		สิ่งแวดล้อม	ผู้ป่วย
ท่าวังผา	6	31	0
เขียงกลาง	4 (เสียชีวิต 2 ราย)	35	0
เมืองน่าน	4	31	4
ภูเพียง	2 (เสียชีวิต 1 ราย)	7	1
เวียงสา	1 (เสียชีวิต 1 ราย)	5	0
นาหมื่น	2	20	2
รวม	19	129	7

สำหรับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เก็บได้จากทั้งพื้นที่ศึกษาและจากการติดตามผู้ป่วยสามารถจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมได้ตามตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงจำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม

พื้นที่	จำนวนตัวอย่าง				รวม
	ดิน	น้ำธรรมชาติ	น้ำกิน	น้ำใช้	
พื้นที่ศึกษา	43	41	17	21	122
ติดตามผู้ป่วย	31	55	18	25	129
รวม	74	96	35	46	251

ผลการทดลอง

ตัวอย่างสัตว์ สิ่งแวดล้อม และผู้ป่วยที่เก็บได้จากโครงการจะนำมาตรวจทางห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างเลือด ปัสสาวะหรือชิ้นเนื้อไตที่เก็บได้จากหนูและสัตว์ตามธรรมชาติ ตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย ตัวอย่างดินและน้ำจาก สิ่งแวดล้อมถูกนำมาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ liquid และ semi-solid EMJH นอกจากนั้นตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ หรือชิ้นเนื้อไตที่เก็บได้จากหนูและสัตว์ตามธรรมชาติ และตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย บางส่วนได้ถูกนำมาสกัด DNA เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองด้วยวิธี *16s rRNA* conventional/ nested PCR ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี PCR และ culture แสดงตามตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี PCR และ culture

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	
	PCR	Culture
หนู	16/135 (12%)	4/135 (3%)
สัตว์ตามธรรมชาติ	0/20 (0%)	0/20 (0%)
สิ่งแวดล้อม	-	168/251 (67%)
ผู้ป่วย	3/7 (43%)	0/7 (0%)

สำหรับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อสามารถจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมได้ตามตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงจำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาและการติดตามผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม

พื้นที่	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อ				รวม
	ดิน	น้ำธรรมชาติ	น้ำกิน	น้ำใช้	
พื้นที่ศึกษา	38/43 (88%)	23/41 (56%)	12/17 (71%)	12/21 (57%)	85/122 (70%)
ติดตามผู้ป่วย	26/31 (84%)	35/55 (64%)	8/18 (44%)	14/25 (56%)	83/129 (64%)
รวม	64/74 (86%)	58/96 (60%)	20/35 (57%)	26/46 (57%)	168/251 (67%)

สำหรับตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการติดตามผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อสามารถจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมและพื้นที่ที่ติดตามผู้ป่วยได้ตามตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงจำนวนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้จากการติดตามผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมและพื้นที่ที่ติดตามผู้ป่วย

พื้นที่	จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อ				รวม
	ดิน	น้ำธรรมชาติ	น้ำกิน	น้ำใช้	
ท่าวังผา	3/4 (75%)	11/14 (79%)	3/5 (60%)	3/8 (37.5%)	20/31 (65%)
เชียงใหม่	9/10 (90%)	11/14 (79%)	1/4 (25%)	4/7 (57%)	25/35 (71%)
เมืองน่าน	8/9 (89%)	5/12 (42%)	2/6 (33%)	3/4 (75%)	18/31 (58%)
ภูเพียง	1/2 (50%)	1/3 (33%)	0/0 (0%)	2/2 (100%)	4/7 (57%)
เวียงสา	0/0 (0%)	0/3 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/5 (20%)
นาหมื่น	5/6 (83%)	7/9 (78%)	1/2 (50%)	2/3 (67%)	15/20 (75%)
รวม	26/31 (84%)	35/55 (64%)	8/18 (44%)	14/25 (56%)	83/129 (64%)

ตัวอย่างหนูและปัสสาวะผู้ป่วยที่ให้ผลบวกจากการตรวจคัดกรองด้วยวิธี 16s rRNA PCR จะถูกระบุชนิดของเชื้อในตัวอย่างโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16s rRNA (443 bp) ซึ่งเบื้องต้นพบว่าเชื้อที่พบในตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยที่ให้ผลบวก 3 รายมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *L. interrogans* ทั้งหมด ตามผลที่แสดงในตารางที่ 18 ส่วนตัวอย่างหนูที่ให้ผลบวกจากการ

ตรวจคัดกรองด้วยวิธี 16s rRNA conventional PCR (ขนาดของ PCR product = 331 bp) ต้องทำการตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี 16s rRNA nested PCR (ขนาดของ PCR product = 443 bp) เพื่อให้ได้ลำดับเบสของยีน 16s rRNA ที่สามารถใช้ระบุชนิดของเชื้อในตัวอย่างได้

ตารางที่ 18 แสดงผลชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจได้จากตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยด้วยวิธี 16s rRNA nested PCR และ เปรอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดยลำดับเบสของยีน 16s rRNA

Human sample	Species	Max. Identity
Pt2	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
Pt3	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
Pt6	<i>Leptospira interrogans</i>	99%

ตัวอย่างหนูและสิ่งแวดลอมที่ให้ผลบวกต่อการเพาะแยกเชื้อ เชื้อที่ได้บางส่วนจะนำมาสกัด DNA เพื่อนำมาตรวจพิสูจน์ตัวเชื้อด้วยวิธี near-full length 16s rRNA PCR จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนส่งไปทำ DNA sequencing เพื่อระบุชนิดของเชื้อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหนูทั้ง 4 ตัวอย่างมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *L. interrogans* ตามตารางที่ 19 ส่วนเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 168 ตัวอย่าง มีความใกล้เคียงกับเชื้อเลปโตสไปราที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรค กึ่งก่อโรคและไม่ก่อโรค คิดเป็นร้อยละ 10, 39 และ 50 ตามลำดับ และมีเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 2 ตัวอย่างที่เป็นเชื้อสไปโรชีตอื่นที่ไม่ใช่เชื้อเลปโตสไปรา คิดเป็นร้อยละ 1 ผลแสดงตามตารางที่ 20

ตารางที่ 19 แสดงผลชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจได้จากตัวอย่างหนูด้วยวิธี 16s rRNA near-full length PCR และ เปรอร์เซ็นต์การระบุเชื้อโดยลำดับเบสของยีน 16s rRNA

Isolate	Species	Max. Identity
R1/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
R13/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
R14/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	99%
R18/1157	<i>Leptospira interrogans</i>	99%

ตารางที่ 20 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ตัวเชื่อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม

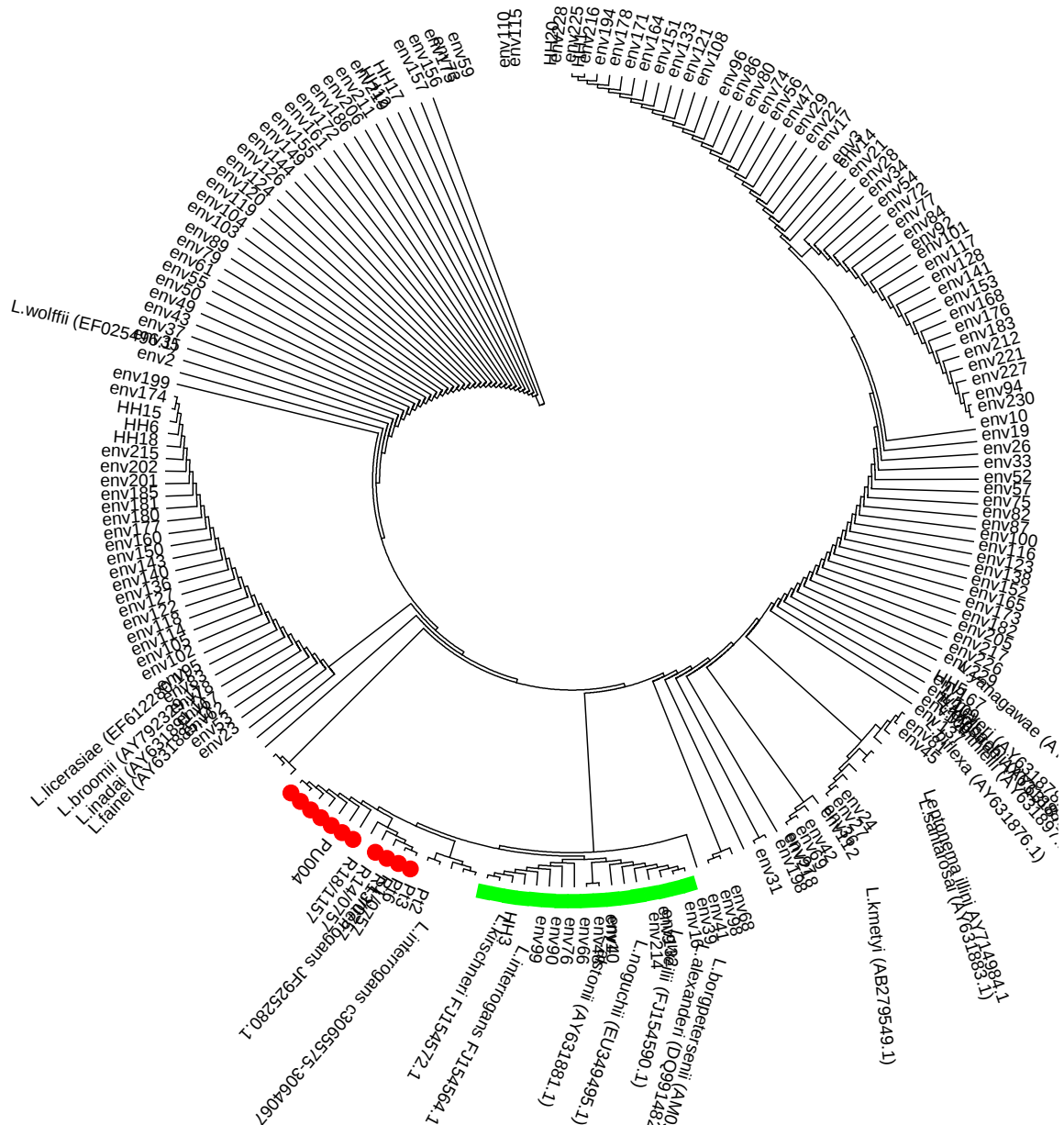
ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง				รวม
	เชื้อเลปโตสไปรา			เชื้อสไปโรชีด	
	ก่อโรค	กึ่งก่อโรค	ไม่ก่อโรค	อื่น	
สิ่งแวดล้อม	17 (10%)	65 (39%)	84 (50%)	2 (1%)	168

เชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่จัดอยู่ในเชื้อกลุ่มก่อโรค กึ่งก่อโรค และไม่ก่อโรคสามารถจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อมได้ตามตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงผลการตรวจพิสูจน์ตัวเชื่อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมโดยจำแนกตามชนิดของสิ่งแวดล้อม

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง				รวม
	เชื้อเลปโตสไปรา			เชื้อสไปโรชีด	
	ก่อโรค	กึ่งก่อโรค	ไม่ก่อโรค	อื่น	
ดิน	14 (22%)	23 (36%)	25 (39%)	2 (3%)	64
น้ำธรรมชาติ	2 (3%)	13 (22%)	43 (74%)	0 (0%)	58
น้ำกิน	0 (0%)	15 (75%)	5 (25%)	0 (0%)	20
น้ำใช้	1 (4%)	14 (54%)	11 (42%)	0 (0%)	26
รวม	17	65	84	2	168

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้จากยีน 16s *rRNA* (443 bp) มาทำการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree แบบ neighbor-joining พบว่าเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างหนู 4 ตัวอย่างและผู้ป่วย 3 ตัวอย่าง อยู่ในกลุ่ม *L. interrogans* ดังแสดงในรูปภาพที่ 9 ส่วนเชื้อจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 168 ตัวอย่างประกอบด้วย 17 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม *L. kmetyi* (15) และ *L. alstonii* (2) ที่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค, 65 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่ม *L. wolffii* (30) และ *L. licerasiae* (35) ที่เป็นสายพันธุ์กึ่งก่อโรค และ 83 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มของ *L. meyeri* (45), *L. yaganawae* (31), *L. vanthielli* (4), *L. biflexa* (4) ที่เป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรค ส่วนอีก 2 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มของ *Leptonema illini*



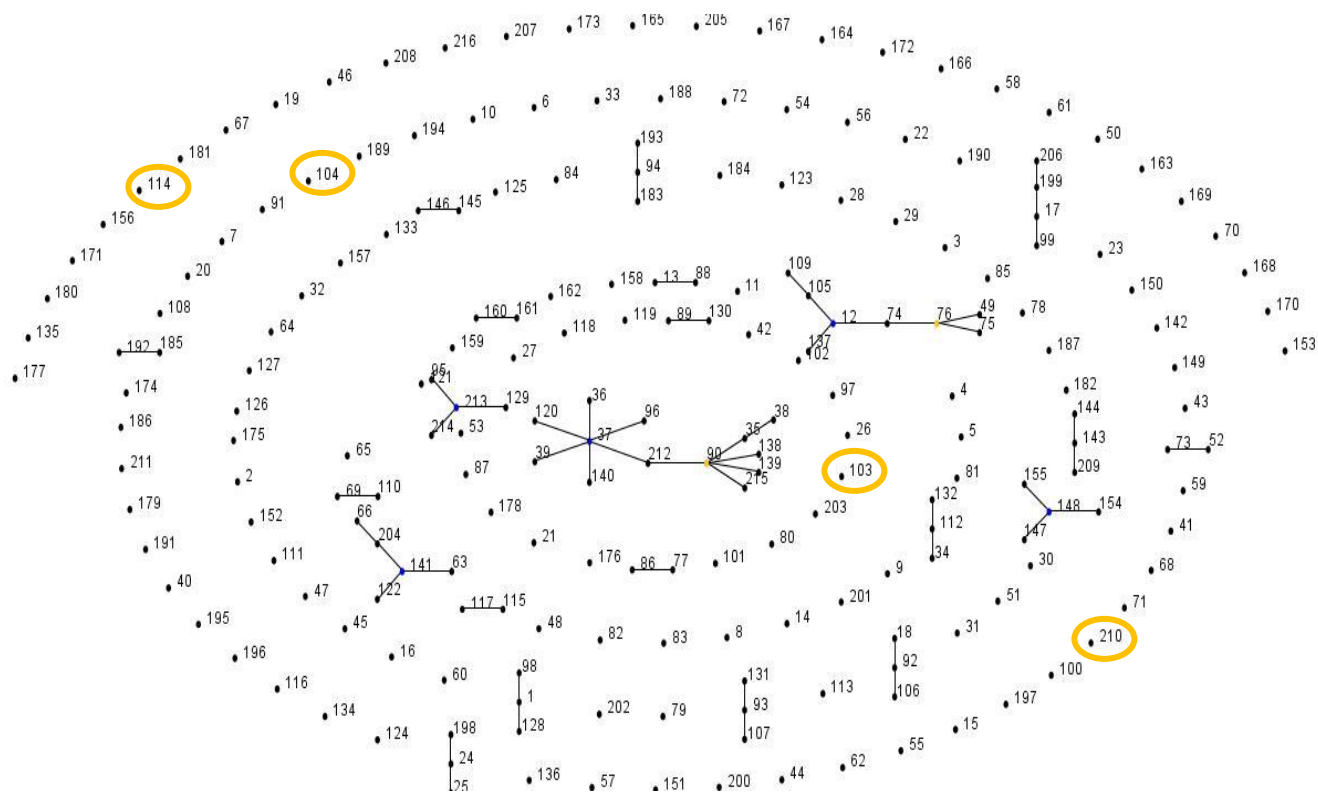
รูปภาพที่ 9 แสดง phylogenetic tree ของ *rrs* gene (443 bp) โดยวิธี Neighbor joining ของเชื้อจากผู้ป่วย, หนู และ สิ่งแวดล้อม สีแดง : เชื้อ *L. interrogans* จากผู้ป่วย 3 ตัวอย่าง (Pt2, Pt3, Pt6), ผู้ป่วยที่ม อ. กัล (PU004) และจากหนู 4 ตัวอย่าง (R1/0757, R13/0757, R14/0757, R18/1157) สีเขียว: เชื้อ *L. kmetyi* จากสิ่งแวดล้อม

เชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างหนูและสิ่งแวดล้อมจะนำมาศึกษาความสัมพันธ์ หรือความเชื่อมโยงของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MLST และ PFGE ซึ่งในส่วนของการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PFGE ทีมวิจัยได้รับความช่วยเหลือในการดำเนินการจากทีมวิจัยของ อ. ณัฐวีร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และในขณะที่จัดทำรายงานฉบับนี้ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี PFGE ในส่วนของตัวอย่างหนูและสิ่งแวดล้อมบางส่วนกำลังอยู่ระหว่างการเตรียมตัวเชื้อสำหรับการตรวจวิเคราะห์

ผลเบื้องต้นจากการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MLST พบว่า เชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างหนูจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้ sequence type (ST) ใหม่ทั้งหมดประกอบด้วย ST 103, 104, 114 และ 210 ตามตารางที่ 22 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราในฐานข้อมูล MLST ด้วย eBURST พบว่า ST ทั้ง 4 มีลักษณะเป็น singleton และไม่สัมพันธ์กับ ST ก่อนหน้า ตามรูปภาพที่ ส่วนเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ด้วย MLST scheme ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ (Boonslip S et al., 2013)

ตารางที่ 22 แสดงผล species และ sequence type (ST) โดยวิธี Multi Locus Sequence Typing (MLST) ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากตัวอย่างปัสสาวะหนู

Isolate	Species	ST
R1/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	103
R13/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	104
R14/0757	<i>Leptospira interrogans</i>	114
R18/1157	<i>Leptospira interrogans</i>	210



รูปภาพที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราพื้นฐานข้อมูล MLST ด้วย eBURST พร้อมระบุตำแหน่งของ Sequence Type (ST) ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากหนู 4 ตัว

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการย่อยที่ 1.3

ทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการลงสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างในเขตจังหวัดน่านตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 โดยเก็บตัวอย่างหนู สัตว์ตามธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมเป็นหลักจากบริเวณพื้นที่ศึกษาและจากการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนู ซึ่งการสำรวจและเก็บตัวอย่างในโครงการนี้อยู่ใน 6 อำเภอของ จ. น่าน ได้แก่ อ. ท่าวังผา, อ. เชียงกลาง, อ. เมืองน่าน, อ. ภูเพียง, อ. เวียงสา และ อ. นานหมื่น

สำหรับการลงสำรวจพื้นที่และเก็บตัวอย่างของทีมวิจัย ณ พื้นที่ศึกษากันสวน ม.7 ต.ป่าคา อ. ท่าวังผา จ. น่าน ในแต่ละฤดูกาลที่ต่างกันต่อเนื่องในระยะเวลา 2 ปี ทีมวิจัยสามารถเก็บตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมที่เชื่อมโยงกับคนและกิจกรรมในแต่ละช่วงฤดูกาลของคนในชุมชนที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคฉี่หนูได้ สำหรับตัวอย่างหนูได้รับความร่วมมือจากชาวบ้านในการช่วยดักหนูจากบริเวณที่พักอาศัยและบริเวณไร่นาที่ชาวบ้านไปทำงาน ร่วมกับการวางกรงดักเองของทีมวิจัย ส่วนสัตว์ในธรรมชาติอื่นๆในท้องที่บ้านสวนพบน้อยมากทำให้ได้จำนวนตัวอย่างน้อยกว่าเป้าหมายที่กำหนดไว้ ช่วงเวลาที่พบสัตว์ในธรรมชาติมากที่สุดจากการลงพื้นที่สำรวจคือช่วงฤดูฝนซึ่งชาวบ้านจะออกหาปลา, กบ, เขียดในร่องนา และลำห้วย ตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ทีมวิจัยเก็บตัวอย่างดินและน้ำในไร่นาของชาวบ้านรวมถึงลำห้วยและบ่อน้ำที่ชาวบ้านลงอาบน้ำ, หาปลาหรือนำนํ้ามาใช้ ซึ่งบริเวณที่เก็บตัวอย่างดินและน้ำเป็นบริเวณเดียวกันกับที่ทีมวิจัยวางกรงดักหนูด้วย ทั้งนี้การเก็บตัวอย่างสัตว์และสิ่งแวดล้อมจะเลือกในบริเวณที่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของชาวบ้านในพื้นที่เพื่อให้เกิดความเชื่อมโยงกันของคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม รวมถึงพื้นที่ที่เป็นจุดเสี่ยงของการติดเชื้อที่เคยมีผู้ป่วยโรคฉี่หนูในชุมชนไปสัมผัส สรุปตัวอย่างที่เก็บได้ในพื้นที่ศึกษาประกอบด้วย ตัวอย่างหนู 135 ตัวอย่าง, สัตว์ตามธรรมชาติ 20 ตัวอย่าง และ สิ่งแวดล้อม 122 ตัวอย่าง

สำหรับการเก็บตัวอย่างจากการติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนู ทีมวิจัยสามารถติดตามผู้ป่วยโรคฉี่หนูได้ทั้งสิ้น 19 รายในระยะเวลา 2 ปีของการดำเนินโครงการ ตัวอย่างที่เก็บส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับการให้ข้อมูลของผู้ป่วย โดยเป็นตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในพื้นที่จุดเสี่ยงที่ผู้ป่วยมีการสัมผัสก่อนป่วย รวมทั้งตัวอย่างสิ่งแวดล้อมในบริเวณบ้านเรือนที่อยู่อาศัยที่ผู้ป่วยมีโอกาสสัมผัสอยู่เป็นประจำ ทั้งนี้ในการลงสำรวจและเก็บตัวอย่างที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยในแต่ละครั้ง ทีมวิจัยสามารถเก็บได้เฉพาะตัวอย่างที่เป็นสิ่งแวดล้อมเท่านั้น ไม่สามารถเก็บตัวอย่างหนูหรือสัตว์ตามธรรมชาติอื่นๆที่อาจพบเห็นในบริเวณบ้านเรือนหรือในบริเวณไร่นาของผู้ป่วยที่เป็นจุดเสี่ยงของการติดเชื้อได้เนื่องจากเวลาในการลงพื้นที่แต่ละรอบมีจำกัดและพื้นที่ที่ทำการติดตามผู้ป่วยมีลักษณะกระจาย อยู่ในหลายท้องที่ถึงแม้จะอยู่ในอำเภอเดียวกันก็ตาม ประกอบกับต้องอาศัยระยะเวลาในการวางกรงดักหนูเองจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างหนูหรือสัตว์ตามธรรมชาติอื่นๆที่สัมพันธ์กับผู้ป่วยแต่ละรายได้ นอกจากนี้ในการลงพื้นที่ติดตามผู้ป่วยรอบสุดท้ายในช่วงเดือนกันยายน 2558 ทีมวิจัยได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยเพิ่มเติมด้วยซึ่งอยู่นอกเหนือจากความรับผิดชอบหลัก เนื่องจากการดำเนินการที่ผ่านมาของโครงการในส่วนของการตรวจหาเชื้อจากผู้ป่วยสามารถแยกเชื้อจากผู้ป่วยได้เพียง 1 ราย ดังนั้นทีมวิจัยจึงขอเก็บตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดตามในรอบสุดท้ายนี้และนำมาตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มโอกาสในการได้ข้อมูลของเชื้อในคนมากขึ้น สรุปตัวอย่างที่เก็บได้จากการติดตามผู้ป่วยประกอบด้วย ตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 129 ตัวอย่าง และ ตัวอย่างผู้ป่วย 7 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในโครงการนำมาเพาะแยกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทีมวิจัยสามารถเพาะแยกเชื้อได้จากตัวอย่างหนู 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 168 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 และ 67 ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างผู้ป่วยที่ทีมวิจัยเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมไม่สามารถเพาะแยกเชื้อได้ ทั้งนี้ตัวอย่างสัตว์และปัสสาวะผู้ป่วยที่ทำการเพาะแยกเชื้อ ทีมวิจัยต้องทำการลงตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อทันทีที่ได้ตัวอย่าง ซึ่งต้องทำในพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างแต่ละแห่ง ไม่สามารถนำกลับมา

ดำเนินการในห้องปฏิบัติการได้ ทำให้ culture มีโอกาสปนเปื้อนเชื้ออื่นๆได้ ส่วนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เป็นดินและน้ำ ทีมวิจัยสามารถนำกลับมาดำเนินการตามขั้นตอนของการลงตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ห้องปฏิบัติการได้ แต่ยังคงพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียอื่นๆรวมอยู่ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ได้เชื้อเลปโตสไปราจากการเพาะแยกเชื้อ ซึ่งในกรณีนี้จะใช้เวลาค่อนข้างนานในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนดังกล่าวเพื่อให้ได้เชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์

นอกจากการเพาะแยกเชื้อแล้ว ตัวอย่างสัตว์และตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยส่วนหนึ่งนำมาตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งเบื้องต้นมีตัวอย่างหนูให้ผลบวก 16 ตัวอย่างจากวิธี 16s rRNA conventional PCR และ ตัวอย่างผู้ป่วยให้ผลบวก 3 ตัวอย่างจากวิธี 16s rRNA nested PCR ทีมวิจัยสามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อในตัวอย่างปัสสาวะผู้ป่วยที่ให้ผลบวกดังกล่าวได้โดยอาศัยการทำ DNA sequencing เพื่อหาลำดับเบสของยีน 16s rRNA (443 bp) จากนั้นเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16s rRNA ที่ได้กับฐานข้อมูลร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic tree พบว่า เชื้อที่พบในตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วย 3 รายจากทั้งหมด 7 รายเป็นเชื้อ *L. interrogans* ทั้งหมด โดยเป็นผู้ป่วยในพื้นที่ อ. เมืองน่าน 2 ราย และ อ. นานา 1 ราย ส่วนการระบุสายพันธุ์ของเชื้อในตัวอย่างหนูที่ให้ผลบวกต่อ 16s rRNA conventional PCR จำเป็นต้องทำ 16s rRNA nested PCR เพิ่มเติมเพื่อให้ได้ลำดับเบสของยีน 16s rRNA ที่สามารถใช้ระบุชนิดของเชื้อในตัวอย่างได้

เชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างหนู 4 ตัวอย่างและสิ่งแวดล้อม 168 ตัวอย่างถูกตรวจพิสูจน์ตัวเชื้อและระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยลำดับเบสของยีน 16s rRNA (near-full length 16s rRNA) ในการทำ phylogenetic tree พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหนูเป็นเชื้อ *L. interrogans* ทั้งหมด เช่นเดียวกับเชื้อจากผู้ป่วย 3 รายและผู้ป่วยของทีม อ. กัลยาณี ซึ่งตัวอย่างหนูที่เก็บได้เป็นหนูที่ได้จากการสำรวจในพื้นที่ศึกษา ต. ปากา อ. ท่าวังผาทั้งหมด ส่วนเชื้อที่เพาะแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค 17 ตัวอย่าง (*L. kmetyi* = 15, *L. alstonii* = 2) สายพันธุ์ก่อโรค 65 ตัวอย่าง (*L. licerisae* = 35, *L. wolffii* = 30) สายพันธุ์ไม่ก่อโรค 84 ตัวอย่าง (*L. meyeri* = 45, *L. yanagawae* = 31, *L. vanthiellii* = 4, *L. biflexa* = 4) และที่เหลืออีก 2 ตัวอย่างพบเป็นเชื้อสไปโรชีตอื่น (*Leptonema illini*) ซึ่งตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่เพาะแยกเชื้อได้มาจากทุกพื้นที่ของ 6 อำเภอที่ทีมวิจัยลงสำรวจและเก็บตัวอย่างแสดงให้เห็นว่ามีเชื้อเลปโตสไปราจำนวนมากอยู่ในสิ่งแวดล้อมของพื้นที่จังหวัดน่าน จากผลการระบุสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมพบว่าไม่มีเชื้อจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในสายพันธุ์ *L. interrogans* หรือ *L. wellii* เหมือนกับเชื้อที่แยกได้ในผู้ป่วย สุนัข และหนูของโครงการ ปัจจัยหนึ่งน่าจะมาจากการเลือกใช้ primer ในการตรวจด้วยวิธี PCR ซึ่งตัวอย่างสิ่งแวดล้อมจะไม่ได้ทำการตรวจคัดกรองด้วยวิธี 16s rRNA nested PCR แต่จะทำการตรวจพิสูจน์ตัวเชื้อที่เพาะแยกได้เพื่อระบุสายพันธุ์ด้วย near-full length 16s rRNA conventional PCR ด้วยเหตุนี้อาจมีความเป็นไปได้ที่เชื้อในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคและกึ่งก่อโรคที่แฝงอยู่ในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมจะไม่ถูกตรวจพบด้วยวิธี near-full length 16s rRNA conventional PCR แต่อาจมีโอกาสดตรวจพบได้จากวิธี 16s rRNA nested PCR ที่มีความไวและความจำเพาะกับเชื้อกลุ่มก่อโรคและกึ่งก่อโรคสูงกว่า ในกรณีนี้ถ้านำสารพันธุกรรมของตัวอย่างสิ่งแวดล้อมมาตรวจเพิ่มเติมด้วยวิธี 16s rRNA nested PCR อาจได้ข้อมูลของเชื้อกลุ่มก่อโรคและกึ่งก่อโรคที่แฝงอยู่ในตัวอย่างนั้นๆเพิ่มเติม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเชื่อมโยงความสัมพันธ์กับเชื้อก่อโรคที่พบในผู้ป่วยและสัตว์ที่ได้จากโครงการ

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ หรือความเชื่อมโยงของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี MLST และ วิธี PFGE เบื้องต้นผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี MLST พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหนูทั้ง 4 ตัวอย่างได้ sequence type (ST) ใหม่ทั้งหมด ได้แก่ ST103, 104, 114 และ 210 ซึ่งไม่สัมพันธ์กับ ST ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลและไม่สัมพันธ์กับ ST ของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยของทีม อ. กัลยาณีและเชื้อที่แยกได้จากสุนัขของทีม อ. ภูวรินทร์ สำหรับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ด้วย MLST scheme ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ (Boonslip S et al., 2013) ส่วนการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี PFGE ในส่วนของตัวอย่างหนูและสิ่งแวดล้อมกำลังอยู่ระหว่างการดำเนินการ

ผลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่างหนูในพื้นที่จังหวัดน่าน และแสดงให้เห็นถึงการพบเชื้อเลปโตสไปราจำนวนมากในสิ่งแวดล้อมของพื้นที่จังหวัดน่าน ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเป็นพื้นที่เสี่ยงของการติดเชื้อโรคนี้ให้ได้ อย่างไรก็ตามควรนำข้อมูลที่ได้อ้างอิงกับข้อมูลของเชื้อที่ได้จากปศุสัตว์, สัตว์เลี้ยง และสิ่งแวดล้อมที่เก็บได้ในพื้นที่เดียวกันต่อไปเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราในภาพรวมของโครงการตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

ทีมวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลดำเนินการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากตัวอย่างสัตว์ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในเขตพื้นที่จังหวัดน่านในระยะเวลาตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 ถึงเดือนกันยายน 2558 ตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดประกอบด้วย ตัวอย่างหนู 135 ตัวอย่าง, สัตว์ตามธรรมชาติ 20 ตัวอย่าง สิ่งแวดล้อม 251 ตัวอย่าง และ ผู้ป่วย 7 ตัวอย่าง การตรวจคัดกรองตัวอย่างด้วยวิธี 16s rRNA conventional PCR/ 16s rRNA nested PCR พบตัวอย่างให้ผลบวกจากหนู 16 ตัวอย่าง (12%) และผู้ป่วย 3 ตัวอย่าง (43%) และสามารถเพาะแยกเชื้อได้จากตัวอย่างหนู 4 ตัวอย่างและตัวอย่างสิ่งแวดล้อม 168 ตัวอย่าง

การระบุสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหนูเป็นเชื้อ *L. interrogans* ทั้งหมด เช่นเดียวกับเชื้อที่ตรวจพบในปัสสาวะผู้ป่วย 3 ราย ส่วนตัวอย่างสิ่งแวดล้อมเบื้องต้นพบเป็นเชื้อสายพันธุ์ก่อโรค 17 ตัวอย่าง (*L. kmetyi* = 15, *L. alstonii* = 2) สายพันธุ์กึ่งก่อโรค 65 ตัวอย่าง (*L. licerasiae* = 35, *L. wolffii* = 30) และสายพันธุ์ไม่ก่อโรค 84 ตัวอย่าง (*L. meyeri* = 45, *L. yanagawae* = 31, *L. vanthielii* = 4, *L. biflexa* = 4) และที่เหลืออีก 2 ตัวอย่างพบเป็นเชื้อสไปโรชีตอื่น (*Leptonema illini*)

การศึกษาความสัมพันธ์ หรือความเชื่อมโยงของสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Multi Locus Sequence Typing (MLST) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหนูทั้ง 4 ตัวอย่างได้ sequence type (ST) ใหม่ทั้งหมด ได้แก่ ST103, 104, 114 และ 210 ซึ่งไม่สัมพันธ์กับ ST ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลและไม่สัมพันธ์กับ ST ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยของทีม อ. กัลลยานีและเชื้อที่แยกได้จากสุนัขของทีม อ.ณูวีร์ สำหรับเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ด้วย MLST scheme ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้ (Boonslip S et al., 2013) อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย สัตว์และสิ่งแวดล้อมอาจสามารถใช้วิธี PFGE มาช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์ได้

ปัญหาที่พบจากการดำเนินโครงการคือการเก็บตัวอย่างผู้ป่วย สัตว์และสิ่งแวดล้อมในพื้นที่เดียวกันยังทำได้ไม่สมบูรณ์ รวมถึงการเก็บตัวอย่างให้สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่มีการรายงานผู้ป่วยยังทำได้น้อย อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของโครงการจะเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้ปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อโรคนี้ให้แก่มุขมชนในพื้นที่จังหวัดน่านได้

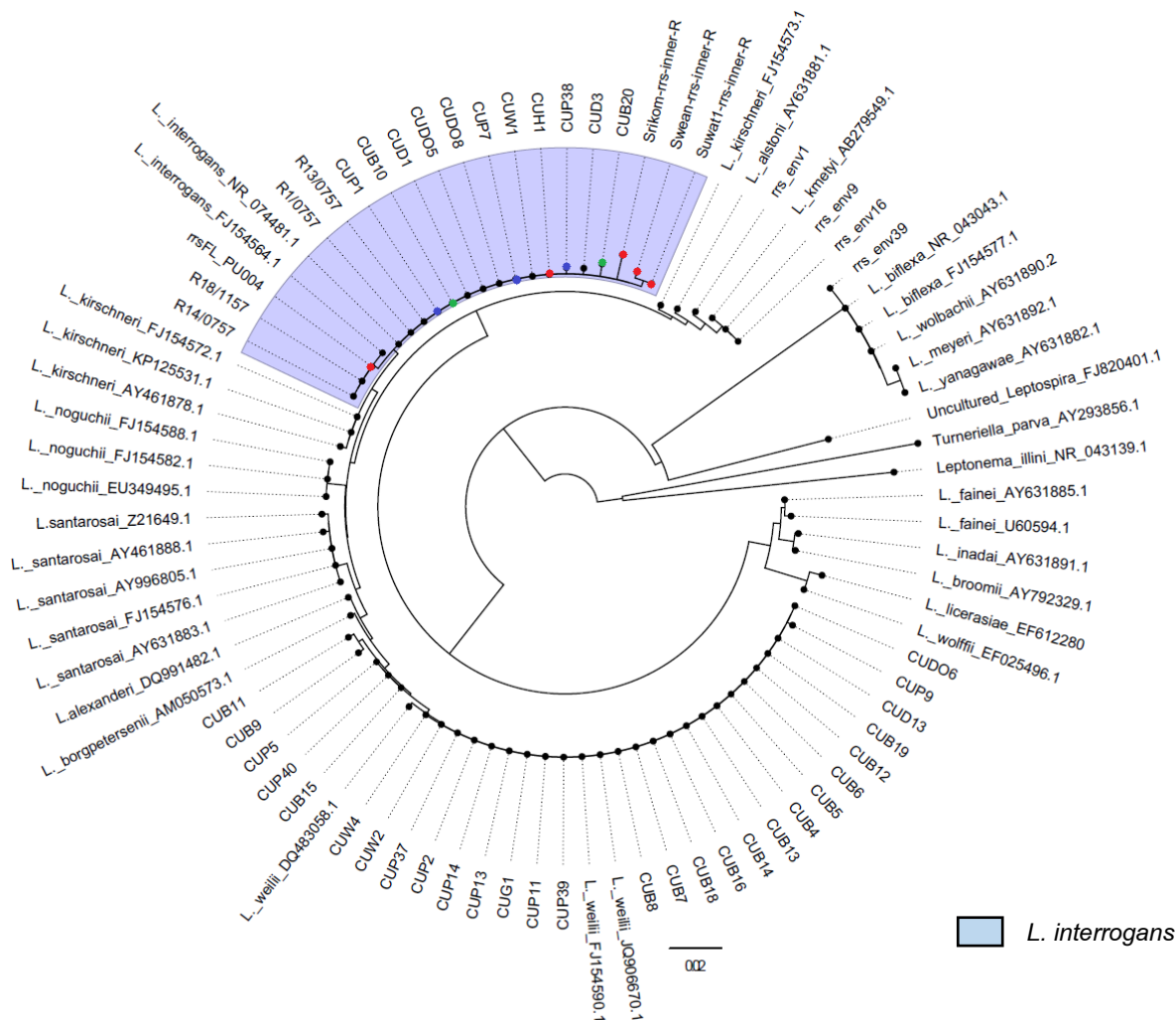
สรุปผลภาพรวมโครงการย่อยที่ 1

รายงานผลการทดลอง

Phylogenetic tree of *rrs*

จากข้อมูลของต้นไม้ไฟโลเจเนติกชนิด Neighbour-joining ของลำดับสารพันธุกรรมจำนวน 443 bp ของยีน *rrs* พบว่า ในพื้นที่จังหวัดน่านมีความหลากหลายของชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา โดยสามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราที่พบในคน, สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ออกเป็น 5 กลุ่มหลักๆ คือ *L. interrogans*, *L. weillii*, *L. kmetyi*, กลุ่มของ unidentified pathogenic *Leptospira* และ กลุ่มของ unidentified non-pathogenic *Leptospira* และในกลุ่มของ *L. interrogans* พบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับของสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราที่พบทั้งคน, สัตว์ (โค, สุกร, สุนัข และหนู) และสิ่งแวดล้อม (น้ำ) ดังแสดงตามภาพที่ 11

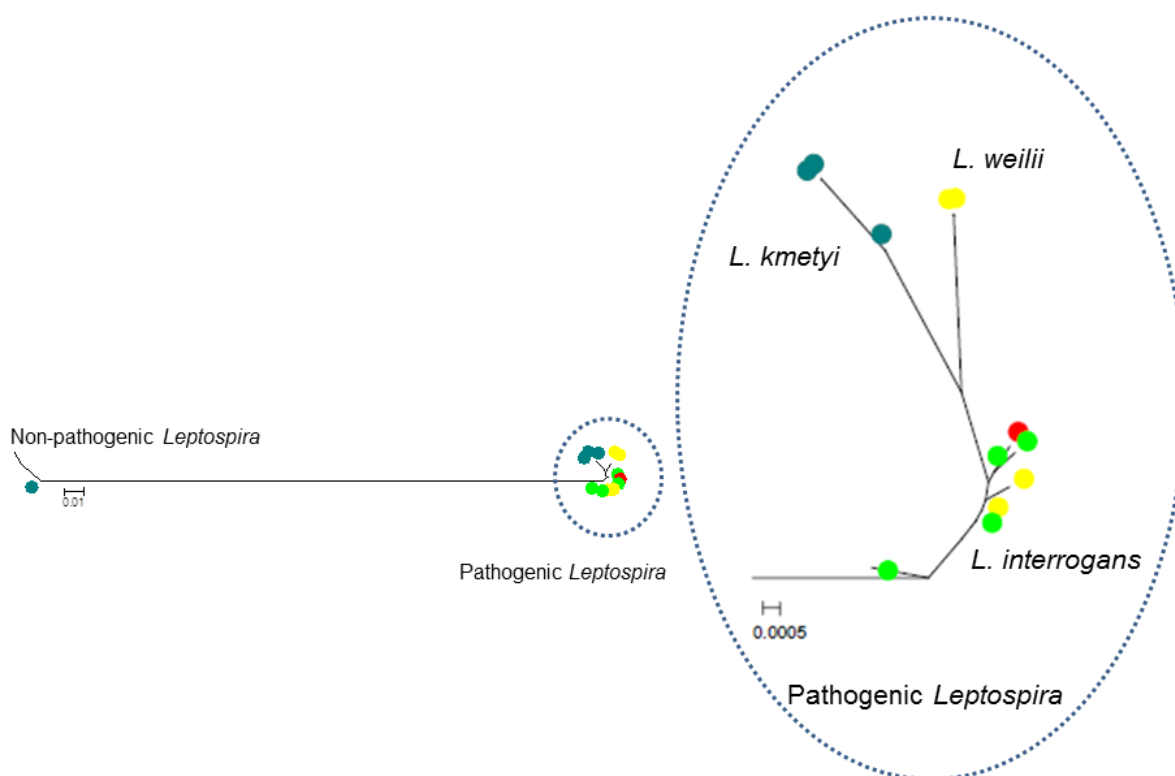
ในกลุ่มของ *L. interrogans* พบความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบทั้งในคน และสัตว์ (โค, สุกร, สุนัข และหนู) ดังรูปภาพที่ 12 ที่น่าสนใจคือ สัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค และ สุกร ที่ชาวบ้านในพื้นที่เสี่ยงเอาไว้เพื่อค้าขาย และอาศัยอยู่ในอาณาบริเวณบ้านที่พักอาศัยของชาวบ้าน สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราได้ในบัสสาวะ ซึ่งสัตว์เหล่านี้ไม่แสดงอาการป่วย สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในโค และ สุกร ได้ร้อยละ 12.2 และ 8.4 บ่งชี้ว่าโค และ สุกรในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสน่าจะเป็น carrier ของโรคที่สำคัญ



รูปภาพที่ 12 Neighbour-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 443 bp ของยีน *rrs* ในกลุ่มของ *L. interrogans*. Red dot แสดงตัวอย่างจากคน, Blue dot แสดงตัวอย่างจาก สุกร, Green dot แสดงตัวอย่างจากโค

Phylogenetic tree of 16S near-full length

เชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์ที่สามารถแยกได้จากคน ($n=1$), สัตว์ ($n=8$; สุนัข ($n=4$), หนู ($n=4$)) และสิ่งแวดล้อม ($n=4$) ได้ถูกนำมาระบุชนิดของเชื้อด้วย near-full length 16S *rRNA* sequencing และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยต้นไม้ไฟโลเจเนติกชนิด Neighbour-joining พบเชื้อ *L. kmetyi* ($n=3$) จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม, *L. weilii* ($n=2$) จากสุนัข, *L. interrogans* ($n=7$) จากคน, สุนัข และหนู และพบ non-pathogenic *Leptospira* ($n=1$) จากสิ่งแวดล้อม จากต้นไม้ไฟโลเจเนติก พบว่าเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากคนมีความใกล้ชิดกับเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากหนู รูปภาพที่ 13

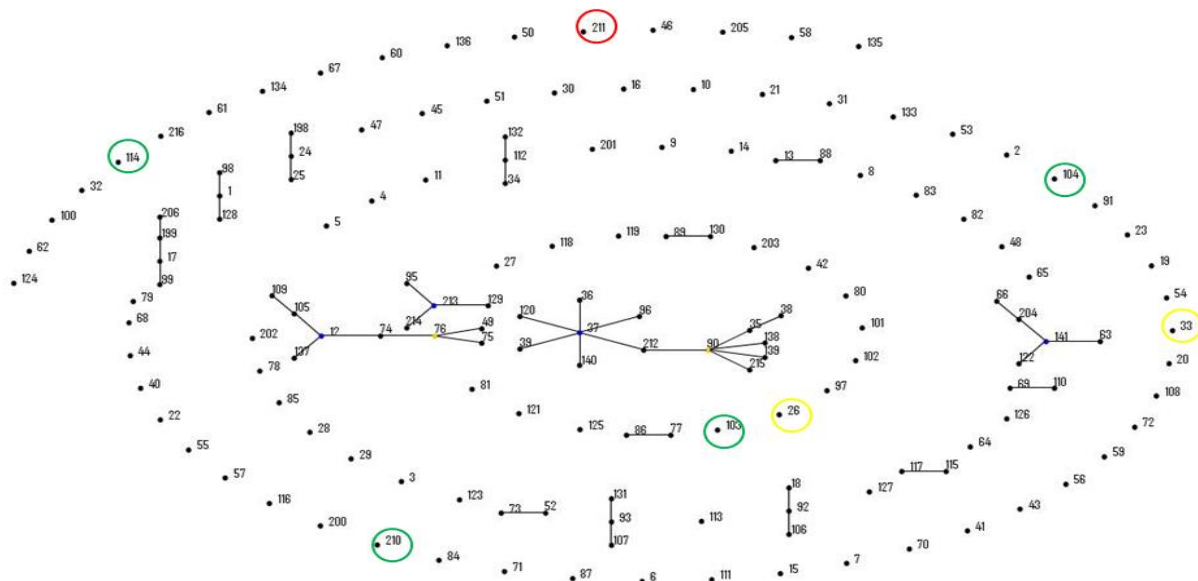


รูปภาพที่ 13 Neighbour-joining phylogenetic tree ของ near-full length 16S *rRNA*. Red dot แสดงตัวอย่างจากคน, Blue dot แสดงตัวอย่างจาก สิ่งแวดล้อม, Green dot แสดงตัวอย่างจากหนู และ Yellow dot แสดงตัวอย่างจากสุนัข

Multilocus sequence typing (MLST) and phylogenetic tree of 7 housekeeping genes concatenated sequence

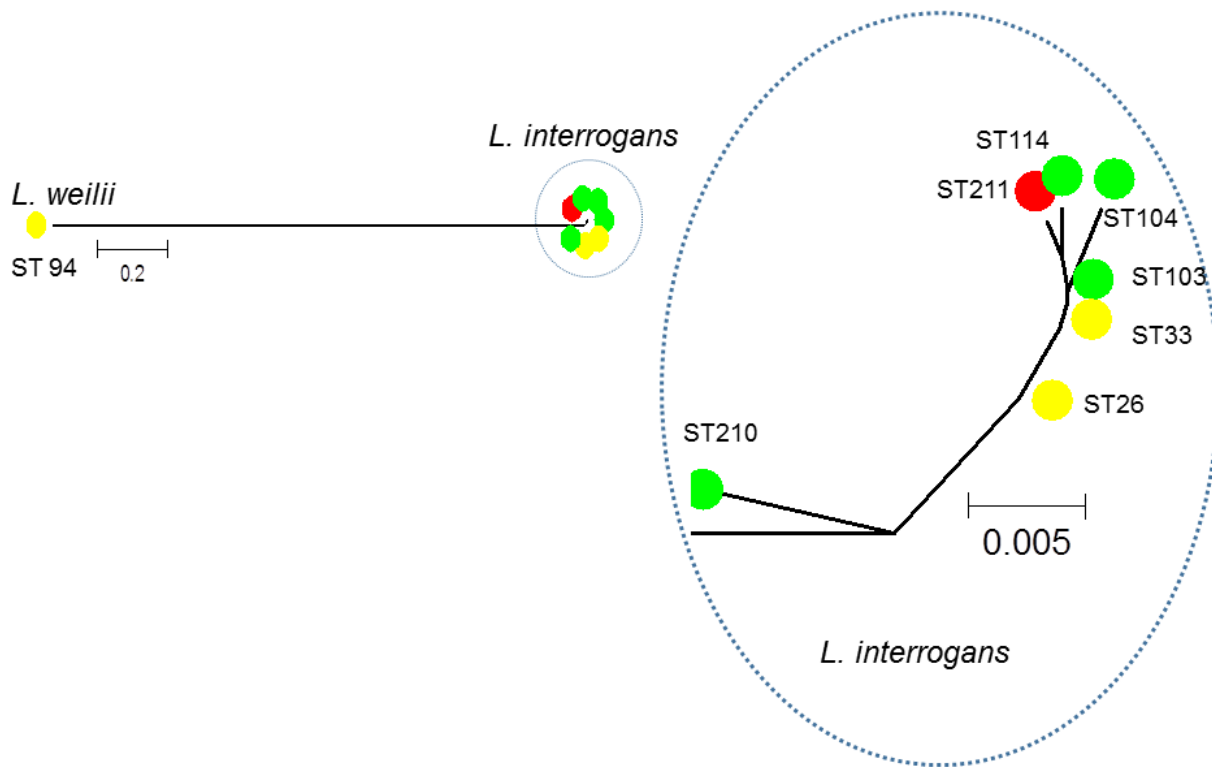
ผลจาก MLST พบว่าตัวอย่างที่แยกได้จากคน, สุนัข และ หนู ให้ sequence type (STs) ใหม่ซึ่งไม่ปรากฏในฐานข้อมูล โดยพบ ST 211 ในคน ST 26, ST 33 และ ST 94 ในสุนัข ST 103, ST 104, ST 114 และ ST 210 ในหนู พบว่า ST 211, ST 26, ST33, ST 103, ST 104, ST 114 และ ST 210 อยู่ในกลุ่มของ *L. interrogans* ในขณะที่ ST 94 อยู่ในกลุ่ม *L. weillii*

จากการทำ eBURST analysis ในกลุ่มของ *L. interrogans* ที่แยกได้จากคน, สุนัข และ หนู พบว่า ลักษณะของแต่ละ STs เป็น singleton แสดงถึงที่มาหรือจุดกำเนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่คน, สุนัข และ หนูรับมาไม่ได้มาจาก clone เดียวกัน ดังแสดงในรูปภาพที่ 14



รูปภาพที่ 14 eBURST analysis ของ *L. interrogans* ที่แยกได้จากคน, สุนัข และหนู. Red circle แสดงตัวอย่างจากคน, Green circle แสดงตัวอย่างจากหนู และ Yellow circle แสดงตัวอย่างจากสุนัข

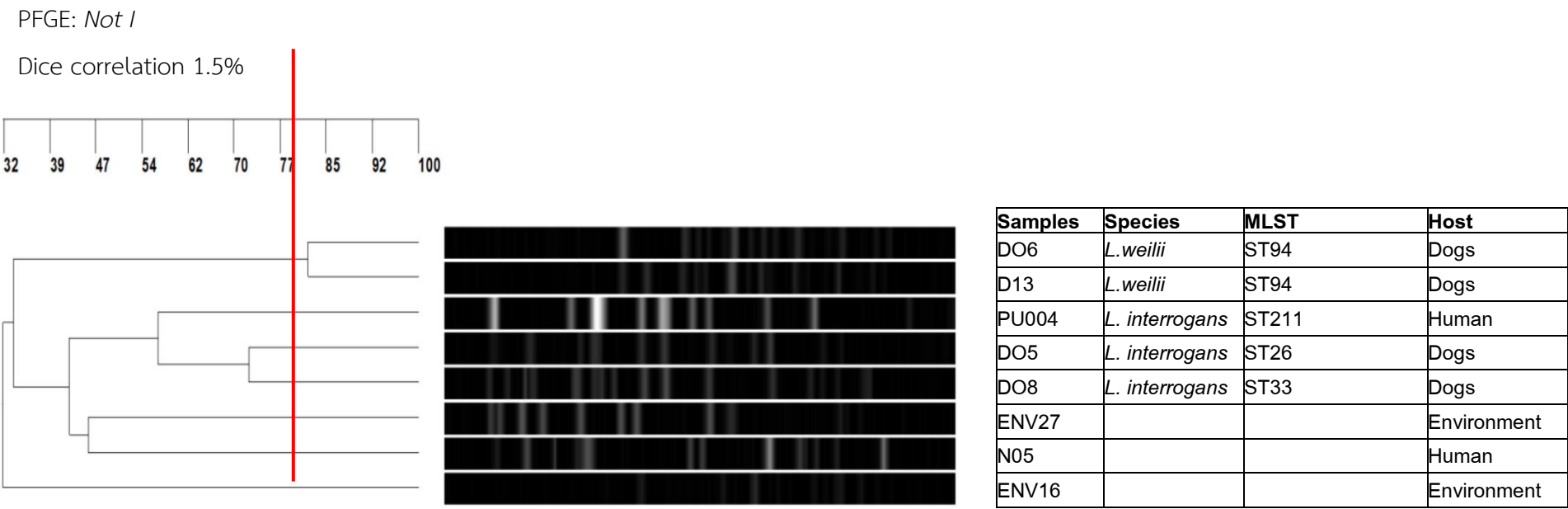
อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ housekeeping gene ทั้ง 7 มาเรียงต่อกัน (concatenated) และจัด
 ต้นไม้ไฟโลเจเนติก พบว่า ST 211 ที่แยกได้จากคน มีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ ST 114 ที่แยกได้จากหนู ดังแสดง
 ในภาพที่ 15



รูปภาพที่ 15 Neighbour-joining tree ของ housekeeping gene ทั้ง 7 นำมาต่อกัน (concatenated). Red dot แสดงตัวอย่าง
 จากคน, Green dot แสดงตัวอย่างจากหนู และ Yellow dot แสดงตัวอย่างจากสุนัข

Pulse field gel electrophoresis (PFGE)

ผลของ PFGE พบว่า ST94 ที่พบในสุนัขจากการทำ MLST ให้รูปแบบ PFGE ที่แตกต่างกัน แต่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุดเมื่อ cut-off รูปแบบของ PFGE ที่ร้อยละ 80 ในขณะที่เชื้อเลปโตสไปราอื่นที่เหลือให้ผลสอดคล้องกับ MLST คือ มีรูปแบบของ PFGE ที่จำเพาะและแตกต่างกัน

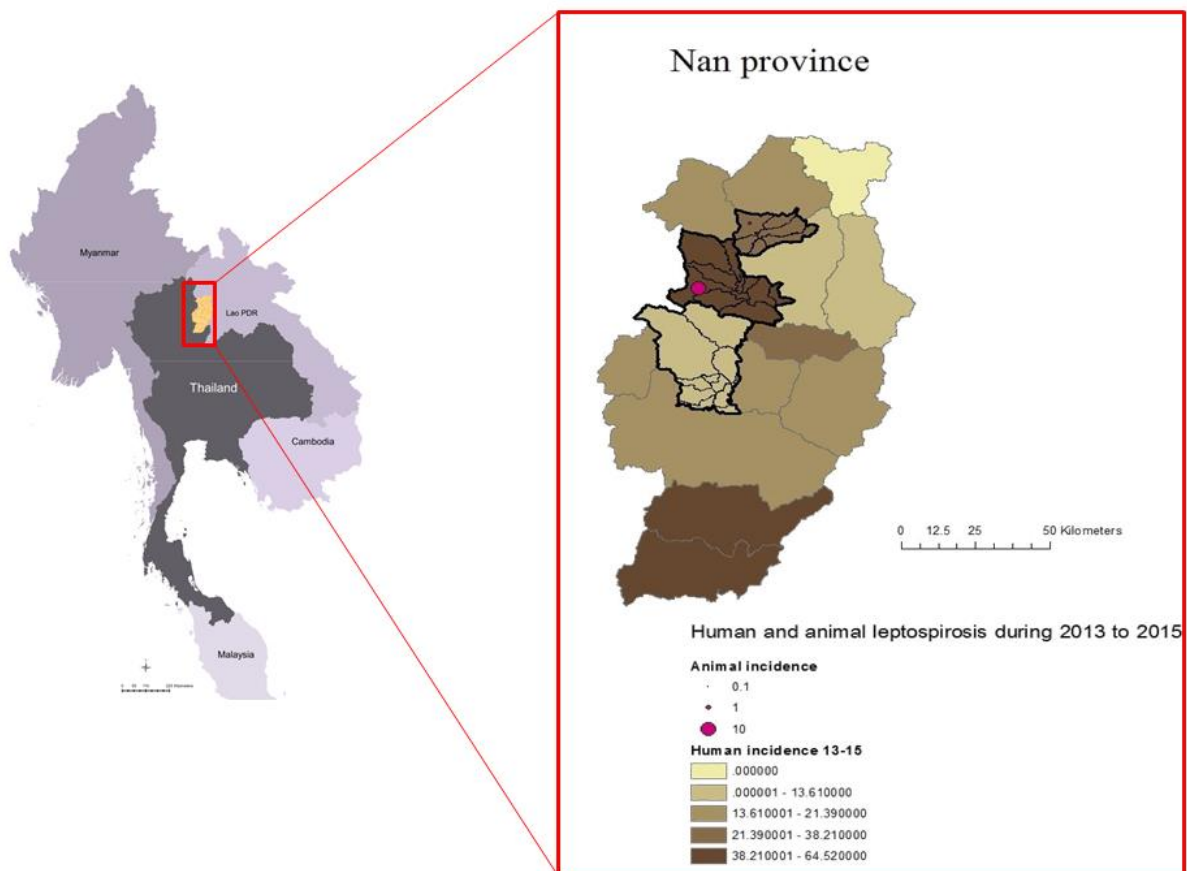


รูปภาพที่ 16 แสดงรูปแบบของ PFGE ของเชื้อเลปโตไปราตัวแทนที่แยกได้จากคน, สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาระบาดวิทยาเชิงโมเลกุลและความสัมพันธ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากคน, สัตว์ และ สิ่งแวดล้อม ในจังหวัดน่าน พบว่าในพื้นที่จังหวัดน่านซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา โดยพบสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่สามารถระบุชนิดได้หลักๆ ได้แก่ *L. interrogans*, *L. weilii*, *L. kmetyi* ซึ่งทั้งหมดเป็น pathogenic *Leptospira* จากข้อมูลของต้นไม้ไฟโลเจเนติกพบความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากคนและหนู แต่พบว่าจากข้อมูลของ MLST พบว่าเชื้อที่แยกได้จากคน, สัตว์ และสิ่งแวดล้อม มีต้นกำเนิดหรือที่มา (Clone) ที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบของ PFGE ที่แตกต่างกัน

จากข้อมูลทางระบาดวิทยาของอุบัติการณ์การป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่จังหวัดน่านระหว่างปี 2013 ถึง 2015 (รูปภาพที่ 17) พบว่าอำเภอท่าวังผาเป็นอำเภอหนึ่งที่พบอุบัติการณ์การเกิดโรคเลปโตสไปโรซิสในคนสูง ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาของทางคณะผู้วิจัย ที่พบว่าในพื้นที่ที่พบอุบัติการณ์ของโรคเลปโตสไปโรซิสในคนที่สูง สัตว์ในพื้นที่นั้นก็พบความชุกของโรคเลปโตสไปโรซิสที่สูงเช่นกัน โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค และ สุกร ซึ่งชาวบ้านในพื้นที่นิยมเลี้ยงไว้ ค้าขายและบริโภค สัตว์เหล่านี้สามารถตรวจพบว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสโดยไม่แสดงอาการว่าป่วย ซึ่งเป็น carrier ที่มีความสำคัญนอกเหนือจากหนูที่สามารถถ่ายทอดเชื้อเลปโตสไปโรซิสไปสู่คนได้



รูปภาพที่ 17 แสดงแผนที่จังหวัดน่านและอุบัติการณ์สะสมในแต่ละอำเภอของโรคเลปโตสไปโรซิสในคนระหว่างปี 2013 ถึง 2015 รวมถึงความชุกของโรคเลปโตสไปโรซิสในสัตว์ในช่วงเวลาเดียวกัน

โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาการทดลองการติดเชื้อโรคเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในวัวและสุกร โดยทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ทีมวิจัยได้ดำเนินการทดสอบการติดเชื้อโรคเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในสุกร ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี เนื่องจากการเตรียมความพร้อมของสถานที่เพื่อใช้ในการเลี้ยงและการทดสอบการติดเชื้อในสัตว์ใหญ่ที่สามารถป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายโรคได้

แผนการดำเนินงาน ประกอบด้วย

1. การเตรียมเชื้อโรคเลปโตสไปราที่ใช้ในการ inoculation

เชื้อโรคเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เก็บใน liquid nitrogen จำนวน 5-10 isolates จะถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium ที่ 30°C จนได้เชื้อที่แข็งแรง อยู่ใน log phase และมีปริมาณมากเพียงพอ 10^6 - 10^8 cells/ml โดยหลีกเลี่ยงการ sub-culture เพื่อให้ความสามารถในการทำให้เกิดโรคไม่เปลี่ยนแปลง จากนั้นทำการทดสอบ virulence เพื่อคัดเลือก isolate ที่มี LD₅₀ ในหนูแฮมสเตอร์ไม่เกิน 100 จำนวน 2 isolates เพื่อให้สามารถนำมา inoculate ดูลักษณะของการติดเชื้อ ใน สุกร

เชื้อที่ผ่านการทดสอบจะนำมาเพิ่มจำนวนใน EMJH ให้ได้ปริมาณมากพอเพื่อทดสอบในสัตว์ต่อไป

2. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่จะใช้ในการศึกษาต้องปลอดจากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อโรคเลปโตสไปรา ก่อนการ inoculation โดยสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ คือ

- สุกร อายุ 3 เดือน เพศเมีย รวม 4 ตัว

3. การให้เชื้อแก่สัตว์ทดลอง (animal inoculation) และการจัดกลุ่มสัตว์ทดลอง

การ inoculation แก่สัตว์ทดลองจะให้ทาง จมูก ตา ปาก และ ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เพื่อเลียนแบบวิธีการติดเชื้อในธรรมชาติ โดยให้เชื้อในที่เท่ากับหรือมากกว่า 100 LD₅₀ ของหนูแฮมสเตอร์ โดยจะทำการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองในแต่ละชนิด คือ

- 1) กลุ่มทดลอง จำนวน 3 ตัว ต่อเชื้อ 1 isolate
- 2) กลุ่มควบคุม จำนวน 1 ตัว

ทำการให้เชื้อแก่กลุ่มทดลองและให้สารควบคุมแก่กลุ่มควบคุม จากนั้นทำการสังเกตอาการป่วยต่างๆ และวัดอุณหภูมิตัวสัตว์ทุกวัน หลังได้รับเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการวัดอุณหภูมิตัวสัตว์ ทุกสัปดาห์จนเสร็จสิ้นการทดลอง ที่ระยะเวลา 3 เดือนหลังการ inoculation

4. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างต่างๆจากสัตว์ทดลองได้แก่ ปัสสาวะ สารคัดหลั่งจากช่องคลอด (Vaginal secretion) ของสัตว์ เพศเมียเมื่อเข้าสู่ระยะการเป็นสัด (estrus cycle) และเลือด เพื่อนำไปเพาะแยกเชื้อและศึกษาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อโรค

โอสไปรา โดยทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 7 14 28 42 56 70 และ 84 หลังการ inoculation จึงทำการการุณยฆาต (สำหรับซีรัมจะเก็บวันที่ 0 14 28 56 และ 84)

5. การเพาะแยกเชื้อ และการตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้จากสัตว์ทดลอง

เมื่อทำการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลอง จะทำการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่าง ปัสสาวะ สารคัดหลั่งและเลือด เมื่อเพาะแยกเชื้อได้จะทำการ ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้จากสัตว์แต่ละชนิดว่ามีความแตกต่างจากเชื้อที่ใช้ inoculate หรือไม่ โดยการทำ genome fingerprint ของเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี MLST และตรวจหา serovar ด้วยวิธี microscopic agglutination test (MAT)

6. การตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

ตัวอย่างซีรัมจากสัตว์ทดลองจะถูกนำมาทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา serovar มาตรฐานต่างๆด้วยวิธี MAT หรือ immunoblotting เพื่อพิสูจน์ว่าเมื่อสัตว์ทดลองชนิดที่ต่างกันนี้ เมื่อติดเชื้อเลปโตสไปรา serovar เดียวกันที่มาจากผู้ป่วย จะมีการตอบสนองทางซีรัมวิทยาเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรและ รูปแบบการเกิด cross reaction กับเชื้อ serovar ต่างๆเป็นอย่างไร

7. การศึกษาพยาธิวิทยา

เมื่อครบกำหนด สัตว์ทดลองจะถูกทำ การุณยฆาต เพื่อตรวจหาพยาธิสภาพที่อวัยวะต่างๆ ได้แก่ ไต หัวใจ ตับ ปอด ม้าม และ อวัยวะสืบพันธุ์ และทำการตรวจหาเชื้อในอวัยวะดังกล่าวโดยการเพาะแยกเชื้อและตรวจเชื้อด้วยวิธี Direct immunofluorescence และวิธี real-time PCR เพื่อตรวจอวัยวะที่เชื้อแอบแฝงอยู่

8. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในแฮมสเตอร์

เตรียมแฮมสเตอร์จำนวน 15 ตัว โดยแบ่งเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว จากนั้นนำเชื้อเลปโตสไปราสองนับจำนวน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Dark Field แล้วเตรียมเชื้อให้ได้มีจำนวน 10^3 , 10^4 และ 10^5 ต่ออาหาร EMJH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเชื้อดังกล่าว เข้าผ่านทางช่องท้องของแฮมสเตอร์ แล้วตามเฝ้าดูการรอดชีวิตเป็นเวลานาน 15 วัน บันทึกผลของแฮมสเตอร์ที่รอดชีวิตและตายในช่วงเวลาดังกล่าว

ผลการทดลอง

การทดลองการติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในสุกรเริ่มต้นจากการคัดเลือกสุกรเพศเมียอายุประมาณ 1 เดือนที่ปลอดจากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เลปโตสไปโรสิส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติในการตรวจทางห้องปฏิบัติการด้วยวิธี MAT จากนั้นนำสุกรที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 4 ตัวเข้าเลี้ยงในโรงเรือนที่ใช้เป็นสถานที่ทำการทดสอบการติดเชื้อเป็นระยะเวลา 2 เดือนจนสุกรมีอายุครบ 3 เดือนซึ่งพร้อมสำหรับการทดสอบ ในช่วงระหว่าง 2 เดือนที่ทำการเลี้ยงสัตว์ทดลองในโรงเรือน ทีมวิจัยได้เก็บตัวอย่างปัสสาวะสุกรเพื่อทำการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราเป็นระยะๆ ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่าสัตว์ทดลองไม่มีการติดเชื้อเลปโตสไปราก่อนทำการทดสอบ นอกจากนี้ทีมวิจัยยังได้ทำการทดสอบระบบความปลอดภัยในการดำเนินการทดลอง รวมถึงทดสอบระบบการกำจัดของเสียที่เกิดจากการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบไปสู่สิ่งแวดล้อม

การทดลองครั้งนี้ใช้เชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วย จ. น่าน (isolate PU004 ทีม อ. กัลยาณี) โดยเชื้อถูกเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH และมีปริมาณเชื้อ 8.34×10^7 cell/ml ณ วันที่นำไปทำการทดลอง ซึ่งการให้เชื้อแก่สุกรกลุ่มทดลองทั้ง 3 ตัวมีวิธีการให้เชื้อและปริมาณเชื้อที่ให้เหมือนกันทุกตัวดังนี้

- ให้เชื้อโดยการหยอดตาทั้ง 2 ข้างๆละ 0.5 ml
- ให้เชื้อโดยการหยอดจมูกทั้ง 2 ข้างๆละ 0.5 ml
- ให้เชื้อโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง 6 ml

หลังให้เชื้อแก่สัตว์ทดลองแล้ว เชื้อส่วนหนึ่งจะถูก inoculate ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการตรวจสอบความสมบูรณ์ของตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ จากนั้นสัตว์แพทย์ทำการสังเกตอาการป่วยต่างๆ และวัดอุณหภูมิตัวสัตว์ทุกวัน หลังได้รับเชื้อ เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการวัดอุณหภูมิตัวสัตว์ ทุกสัปดาห์จนเสร็จสิ้นการทดลองที่ระยะเวลา 3 เดือนหลังการ inoculation และเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะสัตว์ทดลองในวันที่ 0, 3, 7, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 หลังการให้เชื้อเพื่อนำมาเพาะแยกเชื้อ, ตรวจหาตัวเชื้อด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาและตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัมด้วยวิธี MAT

ผลการวัดอุณหภูมิตัวสัตว์ทดลอง

อุณหภูมิของสุกรกลุ่มทดลองทั้ง 3 ตัวอยู่ในระดับปกติ ไม่บ่งชี้ถึงอาการไข้ หลังจากสัตว์ได้รับเชื้อ

ผลการเพาะแยกเชื้อ

สำหรับการตรวจสอบความสมบูรณ์ของตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มไว้ที่ 28°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์มาตรวจภายใต้กล้อง dark field พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเชื้ออยู่ในระดับ 3+ ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แสดงว่าเชื้อที่ใช้ในการทดสอบมีความสมบูรณ์ของตัวเชื้อดี

การตรวจหาตัวเชื้อจากตัวอย่างเลือด, ปัสสาวะ และสารคัดหลั่งจากช่องคลอดของสุกรในวันที่ 0, 3, 7, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 หลังการให้เชื้อพบว่าผลการเพาะแยกเชื้อให้ผลลบทั้งหมดทั้งในสุกรกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจหาตัวเชื้อด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

ทีมวิจัยตรวจหาตัวเชื้อในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของสุกรด้วยวิธี quantitative real-time PCR โดยใช้ *lipL32* primers ปรากฏว่าไม่พบตัวเชื้อจากตัวอย่างเลือดและปัสสาวะของสุกรที่เก็บในวันที่ 0, 3, 7, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีในซีรัม

การตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี MAT ในซีรัมสุกรที่เก็บในวันที่ 0, 3, 7, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 หลังการให้เชื้อ พบว่า สุกรไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อทั้ง 24 ตัวใน panel ที่ใช้ในการตรวจ แต่ตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 จากซีรัมสุกรที่เก็บในวันที่ 7, 14, 28, 42, 56, 70 และ 84 โดยระดับแอนติบอดีในซีรัมสุกรตัวที่ 1 ที่เก็บในวันที่ 7 และ 14 อยู่ที่ 1:200 จากนั้นระดับแอนติบอดีลดลง 4 เท่าจากเดิมเป็น 1:50 ในวันที่ 28 และอยู่ในระดับคงที่ที่ 1:50 จนถึงวันที่ 84 ในขณะที่สุกรตัวที่ 2 และ 3 ตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 ในซีรัมที่เก็บในวันที่ 7 คือ 1:400 และ 1:200 ตามลำดับ จากนั้นระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้น 2 เท่าจากเดิมเป็น 1:800 และ 1:400 ตามลำดับ และคงที่ในระดับเดิมจนถึงวันที่ 56 จากนั้นระดับแอนติบอดีลดลง 4 เท่าจากเดิมเป็น 1:200 และ 1:100 ตามลำดับในวันที่ 70 และยังคงระดับ

เดิมจนถึงวันที่ 84 สำหรับซีรุ่มสูตรตัวที่ 3 แต่พบระดับแอนติบอดีกลับมาเพิ่มขึ้นในซีรุ่มสูตรตัวที่ 2 จากเดิม 1:200 เป็น 1:400 ส่วนสูตรกลุ่มควบคุมไม่มีแอนติบอดีต่อตัวเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจ รายละเอียดตามตารางที่ 23 และรูปภาพที่ 1

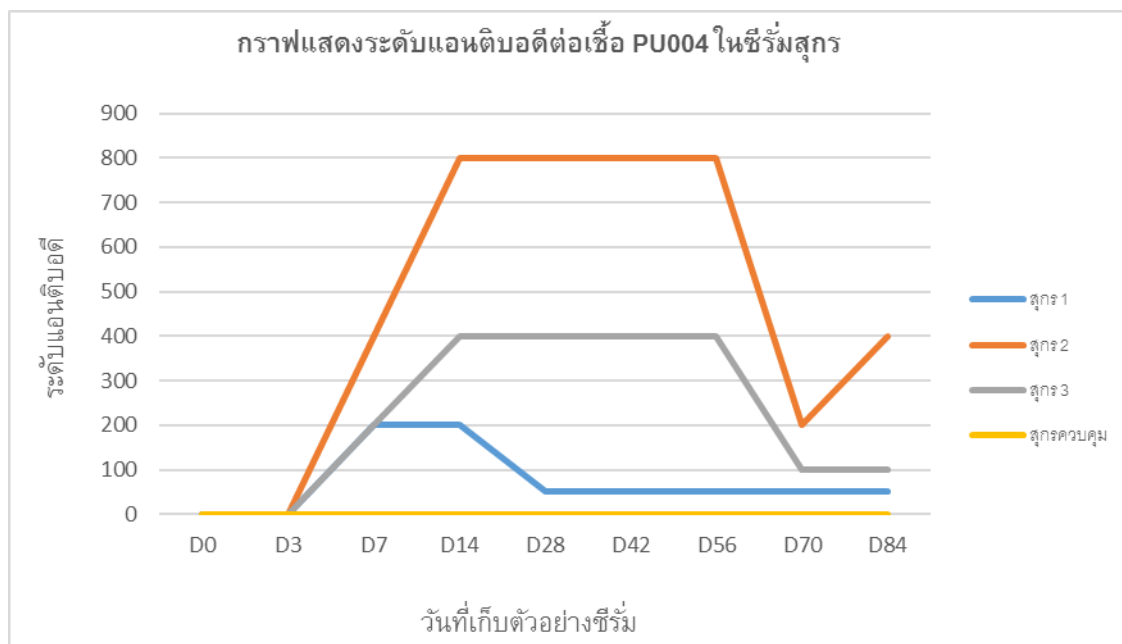
ตารางที่ 23 แสดงผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 ในซีรุ่มสูตร

สูตร	ระดับแอนติบอดีในซีรุ่มสูตร								
	D0	D3	D7	D14	D28	D42	D56	D70	D84
1	-	-	200	200	50	50	50	50	50
2	-	-	400	800	800	800	800	200	400
3	-	-	200	400	400	400	400	100	100
ควบคุม	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ตัวอย่างซีรุ่มเริ่มเจือจาง ที่ 1 : 12.5

ตัวอย่างที่ไม่ได้ลงผลแสดงว่ามีระดับแอนติบอดีน้อยกว่า 1:25

กราฟที่ 1 แสดงผลการตรวจระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อ PU004 ในซีรุ่มสูตร



เมื่อครบกำหนด 84 วัน สัตว์ทดลองถูกทำการุณยฆาต และตรวจหาพยาธิสภาพที่อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ไต หัวใจ ตับ ปอด ม้าม และ อวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งจากนั้นเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะดังกล่าวเพื่อนำมาเพาะแยกเชื้อและตรวจหาตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในอวัยวะด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและวิธี Direct immunofluorescence

ผลการตรวจหาพยาธิสภาพที่อวัยวะ

ภายหลังทำการการุณยฆาตแก่สัตว์ทดลอง สัตว์แพทย์ผู้ร่วมทีมวิจัยทำการตรวจหาพยาธิสภาพเบื้องต้นที่อวัยวะของสัตว์ทดลองปรากฏว่าไม่พบรอยโรคในอวัยวะซึ่งประกอบด้วย ไต หัวใจ ตับ ปอด ม้าม และ อวัยวะสืบพันธุ์ของสุกรกลุ่มทดลองทั้ง 3 ตัวและสุกรกลุ่มควบคุม 1 ตัว

ผลการเพาะแยกเชื้อ

ผลการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะของสุกรทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมยังให้ผลลบทั้งหมด

ผลการตรวจหาตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในอวัยวะ

ทีมวิจัยตรวจหาตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะของสุกรด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ *lipL32* primers ปรากฏว่าไม่พบตัวเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะทุกชนิดของสุกรทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ส่วนการตรวจหาตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในตัวอย่างชิ้นเนื้อด้วยวิธี Direct immunofluorescence เบื้องต้นเลือกชิ้นเนื้อไตของสุกรในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมาทำการทดสอบก่อน ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการดำเนินการ

เนื่องจากผลการทดลองข้างต้นไม่พบการติดเชื้อและการปล่อยเชื้อทางปัสสาวะในสุกรกลุ่มทดลอง ซึ่งส่วนหนึ่งอาจมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับตัวเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ดังนั้นทีมวิจัยจึงประสานขอความอนุเคราะห์ไปยังศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในการดำเนินการทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในหนูแฮมสเตอร์ ซึ่งขณะที่จัดทำรายงานฉบับนี้การทดสอบกำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการย่อยที่ 2

ผลการทดสอบการติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในสุกร พบว่าสุกรกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อมีการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาซึ่งสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวเชื้อ PU004 ที่ใช้ในการทดสอบจากตัวอย่างซีรั่มสุกรกลุ่มทดลอง โดยเริ่มตรวจพบระดับแอนติบอดีในวันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ และยังคงตรวจพบระดับแอนติบอดีจนถึงวันที่ 84 หลังได้รับเชื้อในสุกรกลุ่มทดลองทั้ง 3 ตัว แต่ผลการเพาะแยกเชื้อและผลการตรวจด้วยวิธี quantitative real-time PCR ไม่พบตัวเชื้อในตัวอย่างเลือด ปัสสาวะและสารคัดหลั่งของสุกรกลุ่มทดลองในช่วงเวลาดังกล่าวตั้งแต่สุกรได้รับเชื้อจนถึงวันที่ 84 หลังได้รับเชื้อ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสุกรที่ได้รับเชื้อไม่เกิดการติดเชื้อและไม่ปล่อยเชื้อออกมาทางปัสสาวะแต่ยังเห็นผลการตอบสนองทางซีรั่มวิทยาของสุกรหลังได้รับเชื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อครบกำหนด สัตว์ทดลองถูกทำการุณยฆาตเพื่อตรวจหาพยาธิสภาพที่อวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ไต หัวใจ ตับ ปอด ม้ามและอวัยวะสืบพันธุ์ ร่วมกับการตรวจหาเชื้อที่อาจแอบแฝงอยู่ในอวัยวะดังกล่าวด้วยวิธี PCR และ Direct immunofluorescence ซึ่งเบื้องต้นไม่พบพยาธิสภาพและไม่พบตัวเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้ออวัยวะทุกชนิดของสุกรทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองข้างต้นไม่เอื้ออำนวยให้ทีมวิจัยสามารถตอบคำถามวิจัยของโครงการในส่วนของการศึกษาธรรมชาติของการติดเชื้อและพยาธิวิทยาจากการติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในสุกร และในส่วนของการศึกษาความสามารถของสุกรในการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราหลังจากมีการติดเชื้อเกิดขึ้น แต่ยังให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา

รูปแบบทางชีววิทยาของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสุกรที่ติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยได้ ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทดลองคือตัวเชื้อที่ให้แก่สัตว์ทดลอง สำหรับการทดลองนี้เชื้อที่ให้แก่สัตว์ทดลองเป็นเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในจังหวัดน่านจากโครงการที่ 1.1 ของทีม อ. กัลยาณี ซึ่งเบื้องต้นระบุเป็นสายพันธุ์ *L. interrogans* จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *16s rRNA* แต่ยังไม่ทราบข้อมูล serovar ของเชื้อ เชื้อนี้ไม่ได้ผ่านการทดสอบหาความรุนแรงของเชื้อในหนูแฮมสเตอร์ก่อนการทดลอง จึงไม่มีข้อมูล LD₅₀ ของเชื้อ นอกจากนี้เชื้อไม่ได้ทำการเก็บรักษาใน liquid nitrogen และได้ผ่านการ subpassage หลายครั้ง ซึ่งมีโอกาสที่เชื้อจะลดความรุนแรงลง ดังนั้นขั้นตอนการเตรียมตัวเชื้ออาจต้องนำไปฉีดผ่านเข้าหนูแฮมสเตอร์ ที่เป็น susceptible host เพื่อทำให้เชื้อมีความรุนแรงก่อนนำมาให้แก่สัตว์ทดลอง (Haak DA, 2006) ปริมาณเชื้อ จำนวนครั้งที่ให้เชื้อและวิธีการให้เชื้อแก่สุกรอาจเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการทดลอง ปริมาณเชื้อและจำนวนครั้งที่ให้เชื้อแก่สัตว์ทดลองในการทดลองนี้มีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Chaudhary RK และคณะในปี 1966 ที่ให้เชื้อเลปโตสไปรา serovar Pomona ปริมาณ 10⁸ ตัวแก่สุกรอายุ 1 เดือนทางจมูก ตา และปาก จำนวน 1 ครั้ง เพื่อดูลักษณะการติดเชื้อในสุกร (Chaudhary RK. Et al., 1966) ส่วนวิธีการให้เชื้อแก่สุกรอาจมีบางส่วนต่างกันโดยทีมวิจัยให้เชื้อโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังแทนการให้ทางปาก อย่างไรก็ตามวิธีการให้เชื้อของการทดลองพยายามเลียนแบบการติดเชื้อในธรรมชาติที่จะเป็นไปได้ ซึ่งบางส่วนสอดคล้องกับการศึกษาของ Steele JH ในปี 1960 ที่กล่าวถึงความเป็นไปได้ของการติดเชื้อของสุกรในธรรมชาติผ่านทางเยื่อปอด จมูก หรือ ปาก (Steele JH, 1960) ปัจจัยต่างๆข้างต้นอาจมีผลต่อการทดลองทำให้เชื้อที่เข้าสู่ตัวสัตว์ไม่สามารถเจริญเติบโตภายในตัวสัตว์ได้และตัวเชื้ออาจถูกกำจัดโดยระบบภูมิคุ้มกันของตัวสัตว์เองทำให้ไม่พบตัวเชื้อจากการตรวจเลือดและปัสสาวะของสุกรแต่เห็นผลการตอบสนองทางชีววิทยาของสุกรหลังได้รับเชื้อ มีข้อสังเกตเกี่ยวกับการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อเชื้อที่ฉีดในสุกรกลุ่มทดลอง โดยแอนติบอดีในซีรัมสุกรไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 24 serovars ที่ใช้ในการตรวจแต่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับตัวเชื้อ PU004 แสดงถึงความจำเพาะของแอนติบอดีและไม่ตรงกับ serovar ที่เคยสำรวจพบในสุกรในประเทศไทยก่อนหน้านี้ได้แก่ Ranarum, Pomona และ Bratislava (Suwancharoen D. et al., 2013) แอนติบอดีเริ่มตรวจพบใน 1 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อและสุกร 2 ตัวในกลุ่มทดลองมีระดับแอนติบอดีสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 จากนั้นคงที่และเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 10 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะปกติของการตอบสนองทางชีววิทยาเมื่อได้รับเชื้อ (Levette PN ,2001) ส่วนระดับแอนติบอดีของสุกรตัวที่ 1 ในช่วง 2 สัปดาห์แรกอยู่ที่ระดับ 1:200 และลดลงเป็น 1:50 อย่างรวดเร็วภายในสัปดาห์ที่ 3 หลังได้รับเชื้อ ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะการตอบสนองทางชีววิทยาในสุกรที่ติดเชื้อ *L. interrogans* serovar bratislava ที่รายงานว่าพบแอนติบอดีในระดับต่ำตั้งแต่ 50 – 200 หรือถ้ามีระดับแอนติบอดีที่สูงกว่านี้จะพบการขึ้นลงเร็วของแอนติบอดี ซึ่งต่างจากสุกรที่ติดเชื้อ serovar อื่นที่ทำให้ระดับแอนติบอดีมีแนวโน้มสูงถึง 800 หรือมากกว่านั้น (Bolin CA, 1994) ทั้งนี้ลักษณะการตอบสนองทางชีววิทยาที่แตกต่างกันของสัตว์ทดลองอาจมีปัจจัยจากตัวสัตว์ทดลองเองด้วย

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การทดสอบการติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในสุกรพบว่าสุกรที่ได้รับเชื้อมีการตอบสนองทางชีววิทยา แต่ไม่พบตัวเชื้อในตัวอย่างเลือดและปัสสาวะ รวมถึงไม่พบตัวเชื้อที่แอบแฝงอยู่ในอวัยวะของสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษารูปแบบทางชีววิทยาของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสุกรที่ติดเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยได้ ในส่วนของการทดสอบเพื่อดูความสามารถของสุกรในการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราหลังจากมีการติดเชื้อ อ. รศนาหนึ่งในทีมผู้วิจัยเสนอแนะแนวทางเลือกในศึกษาโดยสำรวจหาสุกรในธรรมชาติที่มีการปล่อยเชื้อเลปโตสไปราออกมากับปัสสาวะ แล้วทำการ monitor สุกรนั้นเพื่อตรวจหาตัวเชื้อและปริมาณเชื้อในปัสสาวะ วิธีนี้อาจทดแทนการทดสอบในสัตว์ทดลองที่มีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องได้

บรรณานุกรม

- Adesiyun AA, Hull-Jackson C, Mootoo N, Halsall S, Bennett R, Clarke NR, et al. Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implications for vaccination and public health. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health*. 2006;53(2):91-9. Epub 2006/04/22.
- Adler B and de la Pena Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 140(3-4): 287-296.
- Bolin CA. Diagnosis of leptospirosis in swine. *Swine Health and production*. 1994;2(3):23-4
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG and Peacock SJ. 2013. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(1): e1954.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Chierakul W, Limmathurotsakul D, Day NP and Peacock SJ. 2011. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infect Dis*. 11: 338.
- Chirathaworn C, Inwattana R, Poovorawan Y and Suwancharoen D. 2014. Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalence. *Asian Pac J Trop Biomed*. 4(Suppl 1): S162-164.
- Evangelista KV and Coburn J. 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 5(9): 1413-1425.
- Faine S, Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. Medisci, Melbourne.
- Gautam R, Guptill LF, Wu CC, Potter A, Moore GE. Spatial and spatio-temporal clustering of overall and serovar-specific *Leptospira* microscopic agglutination test (MAT) seropositivity among dogs in the United States from 2000 through 2007. *Prev Vet Med*. 2010;96(1-2):122-31. Epub 2010/06/29.
- Haake DA. Hamster model of leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*. 2006; Chapter 12:Unit 12E.2.
- Heisey GB, Nimmanitya S, Karnchanachetanee C, Tingpalapong M, Samransamruajkit S, Hansukjariya P, Elwell MR and Ward GS. 1988. Epidemiology and characterization of leptospirosis at an urban and provincial site in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 19(2): 317-322.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Oct;7(10):736-47. Review.
- Kositantont U, Chotinantakul K, Phulsuksombati D, Tribuddharat C. Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of *Leptospira* strains isolated from field rats. *Journal of microbiological methods*. 2007;69(2):288-97. Epub 2007/03/10.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):296-326. Review
- Machry L, Ribeiro RL, Vital-Brazil JM, Balassiano IT, Oliveira IC, Avelar KE and Pereira MM. 2010. [Characterization of *Leptospira* sp reference strains using the pulsed field gel electrophoresis technique]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 43(2): 166-169.

- Otaka DY, Martins G, Hamond C, Penna B, Medeiros MA and Lilenbaum W. 2012. Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet Rec.* 170(13): 338.
- Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine.* 2011;25(1):1-13
- Suwancharoen D, Chaisakdanugull Y, Thanapongtharm W, Yoshida S. Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand. *Epidemiol Infect.* 2013;141(11):2269-77.
- Steele JH. Epidemiology of leptospirosis in the United States and Canada. *J Am Vet Med Assoc.* 1960;136:247-52.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP and Peacock SJ. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis.* 1(1): e56.
- Victoriano AF, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, et al. Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC infectious diseases.* 2009;9:147. Epub 2009/09/08.
- Weese JS and Fulford MB. Companion animal zoonoses. Blackwell Publishing Ltd 2011. Page 157-64.
- Wuthiekanun V, Amornchai P, Langla S, Oyuchua M, Day NP and Limmathurotsakul D. 2014. Maintenance of leptospira species in leptospira Vanaporn Wuthiekanun agar. *J Clin Microbiol.* 52(12): 4350-4352.
- Wuthiekanun V, Amornchai P, Paris DH, Langla S, Thaipadunpanit J, Chierakul W, Smythe LD, White NJ, Day NP, Limmathurotsakul D and Peacock SJ. 2013. Rapid isolation and susceptibility testing of *Leptospira* spp. using a new solid medium, LVW agar. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1): 297-302.
- Wuthiekanun V, Sirisukkarn N, Daengsupa P, Sakaraserane P, Sangkakam A, Chierakul W, Smythe LD, Symonds ML, Dohnt MF, Slack AT, Day NP and Peacock SJ. 2007. Clinical diagnosis and geographic distribution of leptospirosis, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 13(1): 124-126.

ภาคผนวก

Reference	GAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCCTCCGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGG	60
B4	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
B12	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
B19	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
D13	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
G1	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
P39	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
B5	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
B6	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60
DO6	gaacgggtgagtaaacacgtgggtaatcttcctccgagctctgggataactttccgaaaggg	60

Reference	GAGCTAATACTGGATAGTCCCAGAGGTCATATGATTTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTC	120
B4	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
B12	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
B19	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
D13	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
G1	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
P39	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
B5	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
B6	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
DO6	gagctaatactggatgggtcccagagaggtcatatgatttttcgggtaaagattttattgctc	120
	***** * *****	
Reference	GGAGCTGAGCCCGCGCCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGAT	180
B4	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
B12	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
B19	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
D13	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
G1	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
P39	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
B5	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
B6	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180
DO6	ggagctgagcccgcgcccgattagctagttgggtgaggtaatggctcaccaaggcgacgat	180

Reference	CGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCCGCCACAATGGAAC TGAGACACGGTCCATACTCCT	240
B4	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
B12	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
B19	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
D13	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
G1	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
P39	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
B5	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
B6	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240
DO6	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacgggtccatactcct	240

Reference	ACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATGGGGGAACCTGAAGCAGCGACGCCGC	300
B4	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
B12	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
B19	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
D13	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
G1	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
P39	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
B5	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
B6	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
DO6	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300

Reference	GTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAATAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAAT	360
B4	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
B12	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
B19	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
D13	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
G1	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
P39	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
B5	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
B6	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360
DO6	gtgaacgatgaaggtcttcggtattgtaaagttcaataagcagggaaaaataagcagcgat	360

Reference	GTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	420
B4	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
B12	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
B19	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
D13	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
G1	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
P39	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
B5	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
B6	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
DO6	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420

Reference	TATGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAA	443
B4	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
B12	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
B19	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
D13	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
G1	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
P39	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
B5	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
B6	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
DO6	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443

ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ของเชื้อ *L. weillii* ที่ตรวจพบได้จากปัสสาวะของโค (B4, B5, B6, B12, B19), สุนัข (P39), แกะ (G1) และสุนัข (DO6,D13)

B20	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
Reference	GAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCTCTGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGG	60
P38	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
P7	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
D1	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
DO5	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
DO8	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
H1	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
W1	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60
D3	gaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctctgagctctgggataactttccgaaaggg	60

B20	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
Reference	AAGCTAATACTGGATGGTCCCGAGAGATCACAAGATTTTTCGGGTAAAGATTATTGCTC	120
P38	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
P7	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
D1	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
DO5	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
DO8	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
H1	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
W1	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120
D3	aagctaatactggatggtcccagagagatcataagatttttcgggtaaagattttattgctc	120

B20	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
Reference	GGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGAT	180
P38	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
P7	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
D1	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
DO5	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
DO8	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
H1	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
W1	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180
D3	ggagatgagcccgcgctccgattagctagttggtgaggtaaaggctcaccaaggcgacgat	180

B20	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
Reference	CGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCT	240
P38	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
P7	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
D1	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
DO5	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
DO8	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
H1	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
W1	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240
D3	cggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaactgagacacggtccatactcct	240

B20	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
Reference	ACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTTGCTCAATGGGGGGAACCTGAAGCAGCGACGCCGC	300
P38	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
P7	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
D1	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
DO5	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
DO8	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
H1	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
W1	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300
D3	acgggagggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaaccctgaagcagcgacgccgc	300

B20	gtgagcgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
Reference	GTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAAT	360
P38	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
P7	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
D1	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
DO5	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
DO8	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
H1	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
W1	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
D3	gtgaacgatgaaggtcttcggattgttaaagttcagtaagcagggaaaaataagcagcaat	360
	**** *	
B20	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
Reference	GTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG	420
P38	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
P7	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
D1	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
DO5	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
DO8	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
H1	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
W1	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
D3	gtgatgatggtacctgcctaaagcaccggctaactacgtgccagcagccgcggttaatac	420
	***** *	
B20	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
Reference	TATGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAA	443
P38	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
P7	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
D1	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
DO5	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
DO8	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
H1	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
W1	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443
D3	tatggtgcaagcggttggttcggaa	443

ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ของเชื้อ *L. interrogans* ที่ตรวจพบได้จากปัสสาวะของโค (B20), สุกร (P7,P38), คนป่วย (H1), สุนัข (D3,DO5,DO8) และน้ำจากสิ่งแวดล้อม (w1)

#Leptospira	TGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCAGAGATCATAA	60
DO5NFL	TGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCAGAGATCATAA	60
DO8NFL	TGAGTCTGGGATAACTTTCCGAAAGGGAAGCTAATACTGGATGGTCCCAGAGATCATAA	60

#Leptospira	GATTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGT	120
DO5NFL	GATTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGT	120
DO8NFL	GATTTTTCGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGATGAGCCCGCTCCGATTAGCTAGTTGGT	120

#Leptospira	GAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTTCGGCCACAA	180
DO5NFL	GAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTTCGGCCACAA	180
DO8NFL	GAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTTCGGCCACAA	180

#Leptospira	TGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATG	240
DO5NFL	TGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATG	240
DO8NFL	TGGAAGTGAACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATG	240

#Leptospira	GGGGGAACCTGAAGCAGCGACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTC	300
DO5NFL	GGGGGAACCTGAAGCAGCGACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTC	300
DO8NFL	GGGGGAACCTGAAGCAGCGACGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTC	300

#Leptospira	AGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGTAA	360
DO5NFL	AGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGTAA	360
DO8NFL	AGTAAGCAGGGAAAAATAAGCAGCAATGTGATGATGGTACCTGCCTAAAGCACCGGTAA	360

#Leptospira	CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTGTTCCGAATCATTGGGCG	420
DO5NFL	CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTGTTCCGAATCATTGGGCG	420
DO8NFL	CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTGTTCCGAATCATTGGGCG	420

#Leptospira	TAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAAGTGCAGGCTCAACTCGCAGC	480
DO5NFL	TAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAAGTGCAGGCTCAACTCGCAGC	480
DO8NFL	TAAAGGGTGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAAGTGCAGGCTCAACTCGCAGC	480

#Leptospira	CTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGAATTCAGGTGTAGCG	540
DO5NFL	CTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGAATTCAGGTGTAGCG	540
DO8NFL	CTGCACTTGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGAATTCAGGTGTAGCG	540

#Leptospira	GTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAAC	600
DO5NFL	GTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAAC	600
DO8NFL	GTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAAC	600

#Leptospira	TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCACGC	660
DO5NFL	TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCACGC	660
DO8NFL	TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCACGC	660

#Leptospira	CCTAAACGTTGTCTACCAGTTGTTGGGGGTTTAAACCTCAGTAACGAACCTAACGGATT	720
DO5NFL	CCTAAACGTTGTCTACCAGTTGTTGGGGGTTTAAACCTCAGTAACGAACCTAACGGATT	720
DO8NFL	CCTAAACGTTGTCTACCAGTTGTTGGGGGTTTAAACCTCAGTAACGAACCTAACGGATT	720

#Leptospira	AAGTAGACCGCCTGGGGACTATGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTC	780
DO5NFL	AAGTAGACCGCCTGGGGACTATGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTC	780
DO8NFL	AAGTAGACCGCCTGGGGACTATGCTCGCAAGAGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTC	780

#Leptospira	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCT	840
DO5NFL	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCT	840
DO8NFL	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCT	840

#Leptospira	TGACATGGAGTGGAATCATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCCGCTTCACAGGTGCTGC	900
DO5NFL	TGACATGGAGTGGAATCATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCCGCTTCACAGGTGCTGC	900
DO8NFL	TGACATGGAGTGGAATCATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCCGCTTCACAGGTGCTGC	900

#Leptospira	ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC	960
DO5NFL	ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC	960
DO8NFL	ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC	960

#Leptospira	TCACCTTATGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCGTAAGGAACTGCCGGTGACAAACCGG	1020
DO5NFL	TCACCTTATGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCGTAAGGAACTGCCGGTGACAAACCGG	1020
DO8NFL	TCACCTTATGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCGTAAGGAACTGCCGGTGACAAACCGG	1020

#Leptospira	AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACACGTGCT	1080
DO5NFL	AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACACGTGCT	1080
DO8NFL	AGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACACGTGCT	1080

#Leptospira	ACAATGGCCGGTACAAAGGGTAGCCAACCTCGCGAGGGGAGCTAATCTCAAAA-ATCCGG	1140
DO5NFL	ACAATGGCCGGTACAAAGGGTAGCCAACCTCGCGAGGGGAGCTAATCTCAAAAAT-CCGG	1140
DO8NFL	ACAATGGCCGGTACAAAGGGTAGCCAACCTCGCGAGGGGAGCTAATCTCAAAAATCCCGG	1140
	***** :	****
#Leptospira	TCCCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1200
DO5NFL	TCCCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1200
DO8NFL	TCCCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC	1200

#Leptospira	GGATCAGCATGC-CGCGGTGAATACGTTCCCGGACCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA	1260
DO5NFL	GGATCAGCATGC-CGCGGTGAATACGTTCCCGGACCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA	1260
DO8NFL	GGATCAGCATGCCCGCGGTGAATACGTTCCCGGACCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA	1260

#Leptospira	CCTGAGTGGGGAGCACCCGAAGTGGTCTTTGCCAACCGCAA	1301
DO5NFL	CCTGAGTGGGGAGCACCCGAAGTGGTCTTTGCCAACCGCAA	1301
DO8NFL	CCTGAGTGGGGAGCACCCGAAGTGGTCTTTGCCAACCGCAA	1301

ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Near full-length 16S rRNA ของเชื้อ *L. interrogans* บริสุทธิ์แยกได้จากสุนัข

DO6NFL	gagtagcaatactcagcgcggaacgggtgagtaacacgtgggtaatcttcctccgagtct	60
Leptospira	-----CAATACTCAGCGCGGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTTCTCCGAGTCT	60
D13NFL	-----gggtaatcttcctccgagtct	60

DO6NFL	gggataactttccgaaaggggagctaatactggatgggtcccagaggtcatatgattttt	120
Leptospira	GGGATAACTTTCCGAAAGGGGAGCTAATACTGGATGGYCCCGAGAGGTCATATGATTTTT	120
D13NFL	gggataactttccgaaaggggagctaatactggatgggtcccagaggtcatatgattttt	120

DO6NFL	cgggtaaagattttattgtctcgagctgagcccgcgcccgattagctagttggtgaggtaa	180
Leptospira	CGGGTAAAGATTTATTGCTCGGAGCTGAGCCCGCGCCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA	180
D13NFL	cgggtaaagattttattgtctcgagctgagcccgcgcccgattagctagttggtgaggtaa	180

DO6NFL	tggctcaccaaggcgacgatcggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaact	240
Leptospira	TGGCTACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGTTCGGCCACAATGGAAC	240
D13NFL	tggctcaccaaggcgacgatcggtagccggcctgagaggggtgttcggccacaatggaact	240

DO6NFL	gagacacggtccatactcctacgggaggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaa	300
Leptospira	GAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAAGAATCTTGCTCAATGGGGGGAA	300
D13NFL	gagacacggtccatactcctacgggaggcagcagttaagaatcttgctcaatggggggaa	300

DO6NFL	ccctgaagcagcgacgccgctgaacgatgaaggtcttcggattgtaaagttcaataagc	360
Leptospira	CCCTGAAGCAGCGACGCCGCTGAACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTTCAATAAGC	360
D13NFL	ccctgaagcagcgacgccgctgaacgatgaaggtcttcggattgtaaagttcaataagc	360

DO6NFL	agggaaaaataagcagcgatgtgatgtggtacctgcctaaagcaccggcctaactacgtg	420
Leptospira	AGGGAAAAATAAGCAGCGATGTGATGATGTGACCTGCCTAAAGCACC GGCTAACTACGTG	420
D13NFL	agggaaaaataagcagcgatgtgatgtggtacctgcctaaagcaccggcctaactacgtg	420

DO6NFL	ccagcagccgcggttaatacgtatggtgcaagcggtgttcggaatcattgggcgtaaaggg	480
Leptospira	CCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAATCATTTGGGCGTAAAGGG	480
D13NFL	ccagcagccgcggttaatacgtatggtgcaagcggtgttcggaatcattgggcgtaaaggg	480

DO6NFL	tgcgtaggcggacatgtaagtcaggtgtgaaaactgcgggctcaactcgcagcctgcact	540
Leptospira	TGCGTAGGCGGACATGTAAGTCAGGTGTGAAAAC TGCGGGCTCAACTCGCAGCCTGC	540
D13NFL	tgcgtaggcggacatgtaagtcaggtgtgaaaactgcgggctcaactcgcagcctgcact	540

DO6NFL	tgaaactatgtgtctggagtttgggagaggcaagtggaattccaggtgtagcggtgaaat	600
Leptospira	TGAAACTATGTGTCTGGAGTTTGGGAGAGGCAAGTGGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAAT	600
D13NFL	tgaaactatgtgtctggagtttgggagaggcaagtggaattccaggtgtagcggtgaaat	600

DO6NFL	gcgtagatatctggaggaacaccagtggcgaaggcgacttgctggcctaaaactgacgct	660
Leptospira	GCGTAGATATCTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTTGCTGGCCTAAAAC TGACGCT	660
D13NFL	gcgtagatatctggaggaacaccagtggcgaaggcgacttgctggcctaaaactgacgct	660

DO6NFL	gaggcacgaaagcggtgggtagtgaaacgggattagataccccggtaatccacgcccctaaac	720
Leptospira	GAGGCACGAAAGCGTGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCACGCCCTAAAC	720
D13NFL	gaggcacgaaagcggtgggtagtgaaacgggattagataccccggtaatccacgcccctaaac	720

DO6NFL	gttgtctaccagttgttgggggttttaaccctcagtaacgaacctaacggattaagtaga 780	
Leptospira	GTTGTCTACCAGTTGTTGGGGGTTTTAACCCCTCAGTAACGAACCTAACGGATTAAGTAGA 780	
D13NFL	gttgtctaccagttgttgggggttttaaccctcagtaacgaacctaacggattaagtaga 780	

DO6NFL	ccgcctggggactatgctcgcaagagtgaactcaaaggaattgacgggggtccgcacaa 840	
Leptospira	CCGCCTGGGGACTATGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAA 840	
D13NFL	ccgcctggggactatgctcgcaagagtgaactcaaaggaattgacgggggtccgcacaa 840	

DO6NFL	gcgggtggagcatgtggtttaattcgatgatacgcgaaaaacctcacctaggttgacatg 900	
Leptospira	GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAAAAACCTCACCTAGGCTTGACATG 900	
D13NFL	gcgggtggagcatgtggtttaattcgatgatacgcgaaaaacctcacctaggttgacatg 900	

DO6NFL	gagtggaattatgtagagatacatgagccttcgggccgcttcacaggtgctgcatggttg 960	
Leptospira	GAGTGGAATTATGTAGAGATACATGAGCCTTCGGGCCGCTTCACAGGTGCTGCATGGTTG 960	
D13NFL	gagtggaattatgtagagatacatgagccttcgggccgcttcacaggtgctgcatggttg 960	

DO6NFL	tcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaaccctcacctt 1020	
Leptospira	TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCACCTT 1020	
D13NFL	tcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaaccctcacctt 1020	

DO6NFL	atgttgccatcatttagttgggcactcgttaaggaactgccggtgacaaaccggaggaagg 1080	
Leptospira	ATGTTGCCAYCATTTAGTTGGGCACTCGTAAGGAAGTCCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG 1080	
D13NFL	atgttgccatcatttagttgggcactcgttaaggaactgccggtgacaaaccggaggaagg 1080	
	***** *****	
DO6NFL	cggggatgacgtcaaatcctcatggcctttatgtctagggcaacacacgtgctacaatgg 1140	
Leptospira	CGGGGATGACGTCAAATCCTCATGGCCTTTATGTCTAGGGCAACACACGTGCTACAATGG 1140	
D13NFL	cggggatgacgtcaaatcctcatggcctttatgtctagggcaacacacgtgctacaatgg 1140	

DO6NFL	ccggtacaaagggtagccaactcgcgagggggagctaattctcaaaaa 1188	
Leptospira	CCGGTACAAAGGGTAGCCAACCTCGCGAGGGGGAGCTAATCTCAAAAA 1188	
D13NFL	ccggtacaaagggtagccaactcgcgagggggagctaattctcaaaaa 1188	

ภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Near full-length 16S rRNA ของเชื้อ *L. weillii* บริสุทธิ์แยกได้จากสุนัข

ข้อมูลเพิ่มเติม
โครงการย่อยที่ 2
การศึกษาการทดลองการติดเชื้อโรคเลปโตสไปราที่แยกได้จากผู้ป่วยในวัวและสุกร
โดยทีมวิจัยของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในแฮมสเตอร์

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในแฮมสเตอร์ได้ดำเนินการทดสอบโดยใช้เชื้อเลปโตสไปรา isolate PU004 จำนวน 10^3 , 10^4 และ 10^5 ต่ออาหาร EMJH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดเช็ดดังกล่าว เข้าผ่านทางช่องท้องของแฮมสเตอร์ (5 ตัว/กลุ่ม) และประเมินการรอดชีวิตของแฮมสเตอร์เป็นเวลานาน 21 วัน บันทึกผลของแฮมสเตอร์ที่รอดชีวิตและตายในช่วงเวลาดังกล่าว ขั้นตอนการทดสอบทั้งหมดดำเนินการ ณ ศูนย์วิจัยโรคเมลิออยโดสิส คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการทดลอง

พบว่าแฮมสเตอร์ทั้ง 3 กลุ่มที่ฉีดเชื้อมีชีวิตรอดเช่นเดียวกับแฮมสเตอร์กลุ่มควบคุมจนครบกำหนด 21 วัน จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อเลปโตสไปราที่ให้แก่แฮมสเตอร์ไม่ทำให้สัตว์มีอาการป่วยและตายในระยะเวลาของการทดสอบ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ข้อมูลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปราในแฮมสเตอร์ข้างต้นอาจบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปรา isolate PU004 ได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจาก dose ที่ใช้ทดสอบยังไม่ครอบคลุมในระดับ high dose (10^6 - 10^9) ซึ่งมีข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเชื้อเลปโตสไปราที่ต้องให้แก่แฮมสเตอร์เพื่อทำให้สัตว์ทดลองตายอาจต้องใช้ในระดับสูงถึง 10^8 (Palaniappan RUM et al., 2006, Silva EF et al., 2008, Matsui M et al., 2016) อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อเลปโตสไปราปริมาณสูงเพื่อให้เกิดการติดเชื้อและตายของสัตว์ทดลองนอกจากจะไม่สอดคล้องกับลักษณะการติดเชื้อจริงในธรรมชาติแล้ว ยังอาจมีปัจจัยมาจาก non-susceptibility ของตัวสัตว์ทดลอง เช่น ในกรณีของหนูเม้าส์ ซึ่งมีความต้านทานต่อการติดเชื้อทำให้จำเป็นต้องใช้ปริมาณเชื้อเลปโตสไปราในระดับสูงถึง 10^8 เพื่อให้หนูเม้าส์แสดงอาการของโรคเลปโตสไปโรสิส (Ko AI et al., 2009) อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องคือความรุนแรงต่ำของตัวเชื้อเอง ในส่วนนี้มีข้อมูลที่น่าสนใจจากการศึกษาของ Silva EF และคณะในปี 2008 พบว่าเชื้อ *L. interrogans* ที่แยกได้จากเลือดผู้ป่วยสูญเสียความรุนแรงในการก่อโรคจากการทดสอบฉีดเชื้อปริมาณ 10^8 ในแฮมสเตอร์ ซึ่งความเป็นไปได้ที่ทำให้เชื้อสูญเสียความรุนแรงน่าจะมาจากการ sub-passage ติดต่อกันถึง 31 passage ของเชื้อในหลอดทดลองก่อนนำมาใช้ทดสอบในแฮมสเตอร์ (Silva EF et al., 2008) สอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาของ Haake DA และคณะในปี 1991 ที่พบว่าเชื้อที่ผ่านการ sub-passage จำนวนหลายครั้งมีผลทำให้ลดความรุนแรงของเชื้อลง (Haake DA et al., 1991) ในส่วนนี้อาจมีความใกล้เคียงกับเชื้อ PU004 เนื่องจากการ sub-passage หลายครั้งในหลอดทดลองก่อนนำมาใช้ทดสอบในแฮมสเตอร์เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าเชื้อเลปโตสไปราบางสายพันธุ์มีความรุนแรงในสัตว์ตามธรรมชาติแต่อาจไม่รุนแรงเมื่อนำมาทดสอบในสัตว์ทดลอง เช่น ในกรณีของเชื้อ *L. borgpetersenii* serovar Hardjo ที่เป็นปัญหาก่อโรคในวัว แต่สายพันธุ์ subtype A ของเชือนี้พบว่าไม่ทำให้แฮมสเตอร์ตายถึงแม้จะให้เชื้อแก่สัตว์ทดลองในระดับสูงถึง 10^9 ซึ่งต่างจากสายพันธุ์ subtype B ที่ทำให้แฮมสเตอร์ติดเชื้อและตายด้วยระดับ LD_{50} ประมาณ 10^4 (Zuerner RL et al., 2012) ซึ่งความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกันของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวในแฮมสเตอร์อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิด frameshift และ point mutation ของลำดับเบสบนจีโนมของเชื้อ (Bulach DM et al., 2006)

จากเหตุผลสนับสนุนข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อเลปโตสไปรา isolate PU004 ในแฮมสเตอร์อาจไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงจริงของเชื้อนี้ได้ รวมทั้งอาจไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงของเชื้อนี้เมื่อให้แก่สุกรในการทดสอบการติดเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

- Bulach DM, Zuermer RL, Wilson P, Seemann T, McGrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(39):14560-5.
- Haake DA, Walker EM, Blanco DR, Bolin CA, Miller MN, Lovett MA. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar grippityphosa during in vitro cultivation. *Infect Immun*. 1991;59(3):1131-40.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736-47.
- Matsui M, Roche L, Geroult S, Soupé-Gilbert ME, Monchy D, Huerre M, Goarant C. Cytokine and Chemokine Expression in Kidneys during Chronic *Leptospirosis* in Reservoir and Susceptible Animal Models. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156084.
- Palaniappan RU, McDonough SP, Divers TJ, Chen CS, Pan MJ, Matsumoto M, Chang YF. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infect Immun*. 2006;74(3):1745-50.
- Silva EF, Santos CS, Athanazio DA, Seyffert N, Seixas FK, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Brod CS, Reis MG, Dellagostin OA, Ko AI. Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine*. 2008; 26(31):3892-6.
- Zuermer RL, Alt DP, Palmer MV. Development of chronic and acute golden Syrian hamster infection models with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vet Pathol*. 2012;49(2):403-11.