มาตรฐานการชันสูตรโรคเลปโตรไปโรซิส (Leptospirosis)

ส่วนที่ 1 : แบคทีเรียวิทยา

1. บทนำ

เชื้อเลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรค (*Leptospira interrogans*) จัดแบ่งตามการเกิดปฏิกิริยาการเกิดตะกอนทางซีรัมวิทยา ปัจจุบันมีจำนวน 23 serogroups มากกว่า 200 serovars ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรคในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และคน การแสดงอาการทางคลีนิค อาจไม่มีอาการให้เห็น (asymptimatic or subclinical)

อาการทางคลีนิคในโค และสุกร ส่วนใหญ่จะรุนแรงในลูกสัตว์ (acute form) สัตว์ที่โตเต็มวัย จะมีอาการแบบเรื้อรัง และมีปัญหาการแท้งลูก (abortion) ในแพะ แกะ อาการส่วนใหญ่จะพบแบบรุนแรงโดยเฉพาะ serovar *hardjo* ในม้าส่วนใหญ่ไม่แสดงอาการ อาจมีวิการที่ตา (periodic opthalmia) ในสุนัข serovar *copenhageni* พบในประเทศออสเตรเลีย ในคน ส่วนใหญ่เป็นโรคนี้จากการสัมผัสน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อและอวัยวะซากสัตว์ในโรงฆ่าสัตว์

วิการของโรค บางครั้งมีจุดเนื้อตายที่ไต (white spotting) ในสุกร ซึ่งสามารถมองเห็นด้วยตาและกล้องจุลทรรศน์ แต่ต้องแยกวิการจุดเนื้อตายออกจากโรคอื่นๆ ด้วย

การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ที่ใช้กันอยู่ทั่วไปมี 3 วิธี คือ 1. ซีรัมวิทยา 2. การตรวจหาเชื้อ 3. การหาสารพันธุกรรม สำหรับทางซีรัมวิทยามีบทบาทสำคัญมากสำหรับโรคนี้ แต่การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปร่าจะเป็นวิธีที่ดีกว่าโดยการเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะหรือเนื้อเยื่อ แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อต้องใช้เวลานาน ยุ่งยากลำบากและค่าใช้จ่ายสูง การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากปัสสาวะและการย้อมสี (histochemical staining) เป็นทางเลือกที่ดีอีกวิธีหนึ่ง สำหรับการตรวจหาสารพันธุกรรมจะเป็นวิธีที่ใช้กันในอนาคต

2. การเก็บตัวอย่าง

1. ปัสสาวะ (mid-stream urine) เพื่อตรวจหาเชื้อด้วย dark field microscope
   - ถ้าปัสสาวะไม่สามารถตรวจภายใน 20 นาที หลังเก็บควรจะหยด 0.1 N HCl / 0.1 N NaOH วัด pH ให้เป็นกลาง (7.0-7.2)
   - เพื่อรักษารูปร่างเชื้อเลปโตสไปร่า ให้เติมของ 10% formalin จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ลงในปัสสาวะ 20 มิลลิลิตร สามารถตรวจดูเชื้อได้หลายวัน
2. ปัสสาวะ (mid-stream urine) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อควรจะเจือจางในอัตราส่วน 1:10 ด้วย 1% bovine serum albumin (BSA) ใน phosphate buffered saline (PBS)
3. เลือด (whole blood) จากสัตว์ที่กำลังป่วย (leptospiraemic phase) เก็บเลือด 0.5 มิลลิลิตร ใน 10% sodium oxalate หรือ 1.0 มิลลิลิตร ใน 1% heparin
4. ไต (kidney)
   - ใช้ pasteur pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะเข้าไปในไต แล้วนำไปบดในน้ำกลั่น ตรวจหาเชื้อภายใต้ dark field microscope
   - เนื้อเยื่อไต สามารถนำไปบดเพาะแยกเชื้อได้ เชื้อมีชีวิตอยู่ในไตได้หลายวัน ถ้าไตยังไม่เน่าหรือแช่แข็ง

3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Bacteriological culture)

มีจุดมุ่งหมาย คือ เพาะแยกเชื้อเลปโตสไปร่าจากตัวอย่างที่ตรวจ และเก็บรักษาเชื้อที่ได้ไว้ใช้ตรวจโดยวิธี microscopic agglutination test (MAT)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 แบบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (liquid medium) และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (semisolid medium)

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH (Johnson and Harris modification of the Ellinghausen and McCullough medium)

EMJH โดยทั่วไป เตรียม medium base ซึ่งสามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ (autoclave) และ enrichment broth ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane 0.45 ไมครอน โดยใช้อัตราส่วนผสม 9:1 (base: enrichment) ปรับ pH ของ medium base และ enrichment ที่ 7.4

3.2 การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

เชื้อเลปโตสไปร่าเจริญเติบโตช้า การเพาะแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจส่วนใหญ่ ได้แก่ ปัสสาวะ และไต มักจะมีปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งเจริญเติบโตเร็วมาก การเพาะเลี้ยงเชื้อจะต้องใช้เวลานานอย่างน้อย 2 เดือน โดยการตรวจหาเชื้อทุกๆ สัปดาห์ หรือ 2 สัปดาห์ บ่มเชื้อที่ 30°C ก่อนที่จะตัดสินว่าตัวอย่างสิ่งส่งตรวจให้ผลลบต่อเชื้อเลปโตสไปร่า

สิ่งสำคัญในการเพาะแยกเชื้อ คือ การเก็บสิ่งส่งตรวจที่ใหม่ สด และปราศจากการปนเปื้อน เชื้อจะเพิ่มจำนวนมากขึ้น โดยวิธีการดังนี้

- การเจือจางสิ่งส่งตรวจ เป็นการลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลง และลดจำนวนสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเลปโตสไปร่า วิธีการคือ เตรียมตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (kidney and urine) ที่อัตราส่วน 1:10 และเจือจางด้วย PBS หรือ 1% BSA in PBS เป็น 1:100, 1:1,000,1:10,000
- เติมสารต่อต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) 5-fluorouracil 0.1 g/L และ actidione 0.1 g/L แต่ไม่สามารถป้องกันการปนเปื้อนทั้งหมดได้ อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่เติม antimicrobial agent 6 ชนิด (Alder et al., 1986) สามารถต่อต้านการปนเปื้อนได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ ใช้เพาะแยกเชื้อ *L. pomona* และ *L. hardjo* ได้จากปัสสาวะและเลือด แต่จากไตยังไม่มีรายงานว่าสามารถใช้ได้หรือไม่ และ serovar บางชนิด antimicrobial จะยับยั้งการเจริญเติบโต
- อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง ซึ่งมี 0.1-0.3% agar (Bacto) เป็นประโยชน์ในการเพาะแยกเชื้อโดยเฉพาะ *L. hardjo* การใช้ยาขับปัสสาวะ (furosemide 0.8 mg/kg) ช่วยทำให้การเพาะแยกเชื้อประสบผลสำเร็จมากขึ้นจากโค แกะ และสุกร

3.3 การตรวจเชื้อจากปัสสาวะ

เชื้อเลปโตสไปร่าปล่อยออกมากับปัสสาวะในช่วงของสัตว์ที่ได้รับการติดเชื้อเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งอาจจะตรวจดูเชื้อภายใต้ dark field microscope แต่บางครั้งจำนวนเชื้อน้อยเกินกว่าที่จะตรวจพบได้

การตรวจเชื้อจากปัสสาวะโดยตรงสามารถทำได้ แต่ต้องตรวจภายใน 2-3 ชั่วโมงหลังเก็บปัสสาวะที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะเห็นเชื้อมีชีวิตและเคลื่อนไหว อาจนำปัสสาวะไปปั่นที่ 3,000 rpm 20 นาที แล้วนำตะกอนจากการปั่นมาตรวจดูเชื้อที่กำลังขยาย 200 หรือ 400 เท่า การใช้ formalin ในการฆ่าเชื้อเลปโตสไปร่าไม่แนะนำให้ทำกัน

3.4 การเก็บเชื้อเลปโตสไปร่า

เชื้อเลปโตสไปร่าสามารถปรับตัวในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และคงอยู่ได้หลายวันในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว การ subculture หลายครั้งทำให้สูญเสียความรุนแรงของเชื้อ (lose virulence) และอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมในการติดเชื้อเข้าไปในสัตว์ ถ้าไม่คำนึงถึงความรุนแรงของเชื้อ สามารถเก็บเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็งที่ 30°C ในที่มืด สามารถเก็บเชื้อได้นานถึง 3 ปี แต่จะดีที่สุดถ้าจะ subculture ทุกๆ 6 เดือน

การเก็บเชื้อที่ยาวนาน และยังคงรักษาความรุนแรงของเชื้อไว้ โดยเก็บใน liquid nitrogen โดยวิธีของ Palit et al. (1986) ดังนี้

1. เพิ่มจำนวนเชื้อเลปโตสไปร่า 10^9 leptospires/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด liquid EMJH medium
2. เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสุดท้าย 2.5% (DMSO ควรกรองแบคทีเรียก่อนใช้)
3. แจกเชื้อที่เพาะเลี้ยงลงในหลอดเก็บที่สามารถลงใน liquid nitrogen ได้
4. ปิดฝาหลอดเก็บด้วย parafilm และเก็บใน -70°C ถึง -80°C
5. นำหลอดเก็บเชื้อมาลงในถัง liquid nitrogen

การนำเชื้อที่เก็บมาใช้ โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือใน waterbath 30°C และ subculture ชนิด liquid EMJH medium บ่มเชื้อที่ 30°C ประมาณ 5-7 วัน และ subculture เพื่อเจือจาง DMSO

การเก็บเชื้อเลปโตสไปร่า ใน liquid nitrogen ไม่ควรเติม glycerol เพราะจะเป็นพิษต่อเชื้อ

4. ภาคผนวก

4.1 Formula for EMJH basal medium

		g/L
Disodium hydrogen phosphate	Na_2HPO_4	1.0
Potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	0.3
Sodium chloride	NaCl	1.0
Ammonium chloride	NH_4Cl	0.25
Thiamine		0.005
Glycerol		0.1

4.2 Formula for EMJH enrichment broth

		g/L
Bovine albumin, fraction V		100.0
Calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	0.1
Magnesium chloride	$MgCl_2.6H_2O$	0.1
Zinc sulfate	$ZnSO_4.7H_2O$	0.04
Copper sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	0.003
Iron sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	0.5
Vitamin B12		0.002
Tween 80		12.5

ส่วนที่ 2 : ซีรัมวิทยา

1. บทนำ

วิธีการตรวจทางซีรัมวิทยา เป็นการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัม แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 Genus-specific test วิธีนี้บอกได้ว่าเป็นเลปโตสไปโรซิส มีประโยชน์ในการตรวจกรอง (screening test) แต่ไม่สามารถบอก serogroup หรือ serovar ของ *L. interrogans* ได้แก่ วิธี macroscopic slide agglutination, hemagglutination, complement fixation test, ELISA, immunofluorecent test, latex agglutination test เป็นต้น

1.2 Group-specific test โดยวิธีนี้จะสามารถบอกได้ว่าติดเชื้อ *L. interrogans* serovar ใด วิธีที่ใช้คือ microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับการแนะนำจากองค์การอนามัยโลก

ปัจจุบันสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติและศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ประจำภาคต่างๆ ตรวจโดยวิธี MAT (microscopic agglutination test) โดยใช้แอนติเจนเลปโตสไปร่า จำนวน 24 serovars / serogroups คือ *australis, autumnalis, ballum, bataviae, canicola, celledoni, cynopteri, djasiman, grippotyphosa, hebdomadis, icterohaemorrhagiae, javanica, louisiana, manhao, mini, panama, pomona, pyrogenes, ranarum, sarmin, sejroe, shermani, tarassovi, patoc*

2. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างซีรัม

1. เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำ 5-10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปั่นแยก ซีรัมอย่างน้อย 1 มิลลิลิตร ส่วนครั้งที่ 2 ให้เจาะเลือดห่างจากครั้งแรกเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์

2. เขียนชื่อ เลขตัวสัตว์ ข้างหลอดซีรัมให้ถูกต้อง พร้อมปิดจุกหลอดซีรัมให้แน่น พันปากหลอดด้วย parafilm เพื่อป้องกันฝาจุกหลุด เก็บซีรัมไว้ในตู้เย็น แช่แข็ง (-4°C / -20°C)

3. นำส่งโดยแช่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง

3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางซีรัมวิทยา

3.1 Microscopic agglutination test (MAT)

3.1.1 การเตรียมแอนติเจน

เชื้อที่ใช้เป็นงานประจำ (live antigen) ควรจะ subculture 2 ครั้งต่อสัปดาห์ (ห่างกัน 3-4 วัน) โดยหยดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (liquid medium) ปริมาณ 5-10 หยด (ขึ้นกับเชื้อแต่ละชนิดเจริญเติบโตช้าหรือเร็ว และความเข้มข้นของเชื้อ) บ่มเชื้อที่ 30°C นาน 3-4 วัน ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อเลปโตสไปร่า ประมาณ 2×10^8/มิลลิลิตร โดยการนับจาก bacterial counting chamber หรือจากประสบการณ์ความชำนาญ ดูความหนาแน่นของเชื้อด้วยการมองด้วยตาเปล่าหรือจาก microscope การเก็บรักษาเชื้อที่ยาวนานควรเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดกึ่งแข็ง (semisolid medium)

3.1.2 การเตรียมซีรัม

ซีรัมที่เก็บอย่างถูกวิธี สามารถนำมาใช้ได้เลย สำหรับซีรัมที่ปนเปื้อนหรือมีตะกอน ควรนำมาปั่นหรือกรองผ่าน membrane 0.45 ไมครอน ก่อนจะให้ผลการอ่านปฏิกิริยา MAT ถูกต้อง สะดวกยิ่งขึ้น

3.1.3 วิธีการตรวจ Microscopic agglutination test (MAT)

หลักการ

เป็นวิธีการตรวจทางซีรัมวิทยา โดยใช้เชื้อเลปโตสไปร่าเป็นแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปร่าในซีรัมของสัตว์ ตรวจดูการเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มระหว่างแอนติเจนและ

แอนติบอดีด้วย dark field microscope ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปร่ามีลักษณะเป็น lysis ball, star

ซีโรวาร์ที่ใช้ในการทดสอบคือ

1. australis	9. grippotyphosa	17. pomona
2. autumnalis	10. hebdomadis	18. pyrogenes
3. ballum	11. icterohaemorrhagiae	19. ranarum
4. bataviae	12. javanica	20. sarmin
5. canicola	13. louisiana	21. sejroe
6. celledoni	14. manhao	22. shermani
7. cynopteri	15. mini	23. tarassovi
8. djasiman	16. panama	24. patoc

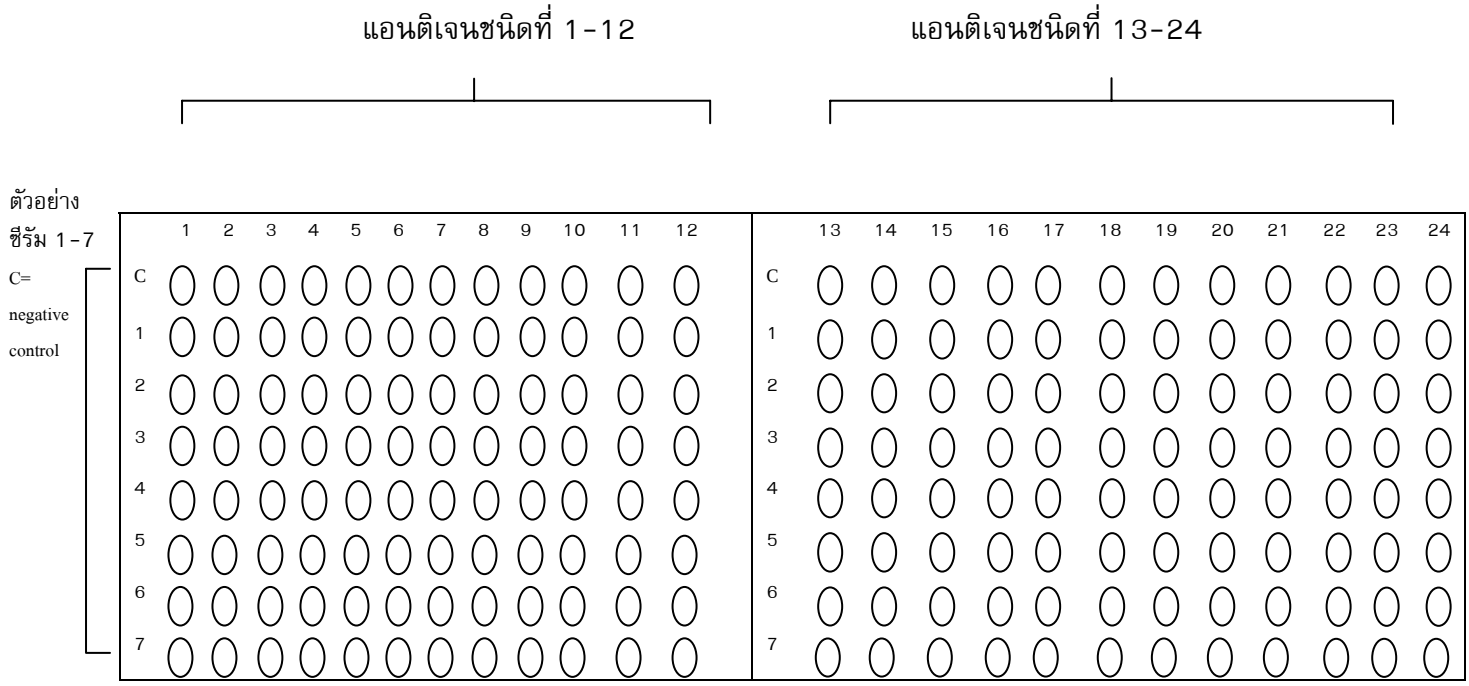
วิธีการตรวจ

1. Screening test

1.1 เจือจางตัวอย่างซีรัมให้เป็น 1: 25 ด้วย phosphate buffered saline (PBS pH7.4)

1.2 ใส่ซีรัมที่เจือจางแล้วใน microtiter plate โดยใส่ 25 ไมโครลิตร ต่อหลุม

1.3 เติมแอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดต่างๆ 24 ชนิด โดยใส่ 25ไมโครลิตร ต่อหลุม



1.4 นำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30°C 90 นาที

1.5 ตรวจดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเชื้อในแต่ละหลุมด้วย dark field microscope

1.6 นำตัวอย่างซีรัมที่มีปฏิกิริยาเกาะกลุ่มตั้งแต่ 50% ขึ้นไป (โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ) ไปทดสอบหาค่าไตเตอร์ ต่อเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดนั้น (titer test)

2. Titer test

2.1 เจือจางแอนติซีรัมให้เป็น 1:50, 1:100, 1:200 จนถึง 1:6400 ดังรูป

2.2 เติม 25 ไมโครลิตร แอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปร่าชนิดที่ให้ปฏิกิริยาเกาะกลุ่มในการทดสอบ screening test

2.3 นำมาเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 30°C 90 นาที

2.4 ตรวจดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเชื้อด้วย dark field microscope

WELL	→	1	2	3	4	5	6	7	8
		○	○	○	○	○	○	○	○
DILUTION	→	50	100	200	400	800	1600	3200	6400

การอ่านผล

การอ่านปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอนตั้งแต่ 50% ขึ้นไป (โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อเลปโตสไปร่าที่เกาะกลุ่มกับเชื้อที่เป็นอิสระ) ซีรัมเจือจางสูงสุดที่ให้ปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอนถือเป็นค่า end point

3.2 การแปลผลทางซีรัมวิทยา

การตัดสินผลว่า positive ทางซีรัมวิทยา บ่งบอกถึงการได้สัมผัสเชื้อ แต่จะบอกว่ากำลังเกิดปัญหาของโรคหรือไม่นั้น

1. ต้องทำ paired serum ห่างกันประมาณ 1-2 สัปดาห์ ถ้าระดับแอนติบอดีต่อโรคสูงขึ้น 4 เท่า แสดงว่าสัตว์กำลังเป็นปัญหาของโรคอยู่

2. กรณีฝูงสัตว์ที่มีปัญหาให้เก็บปัสสาวะ หรือซากที่แท้งมาตรวจ โดยการเพาะแยกเชื้อ ถ้าพบเชื้อแสดงว่าสัตว์อยู่ในระยะที่สามารถแพร่เชื้อติดต่อสัตว์อื่นได้

4. ภาคผนวก

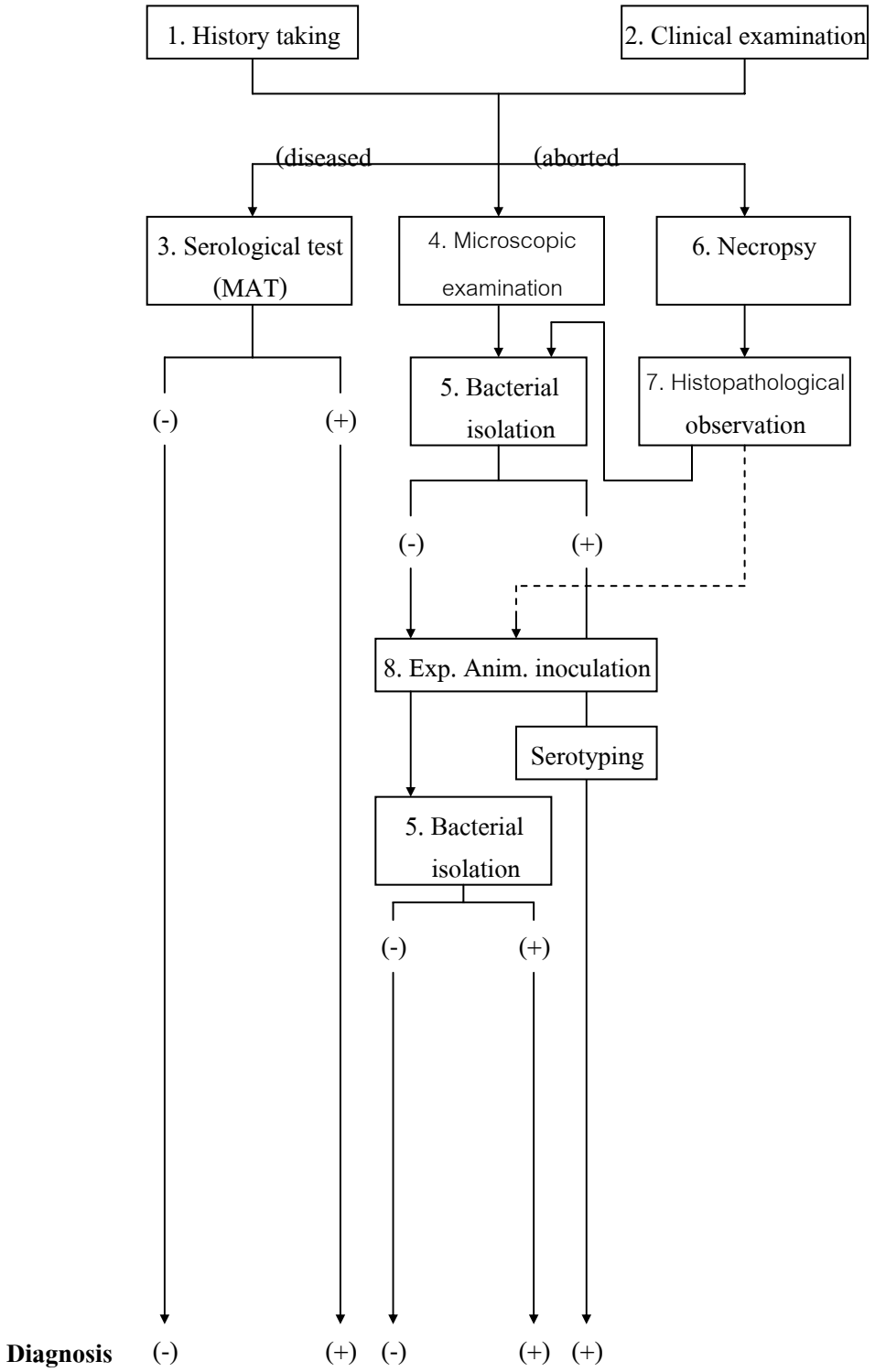
4.1 Formula for EMJH basal medium

		g/L
Disodium hydrogen phosphate	Na_2HPO_4	1.0
Potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	0.3
Sodium chloride	NaCl	1.0
Ammonium chloride	NH_4Cl	0.25
Thiamine		0.005
Glycerol		0.1

4.2 Formula for EMJH enrichment broth

		g/L
Bovine albumin, fraction V		100
Calcium chloride	$CaCl_2.2H_2O$	0.1
Magnesium chloride	$MgCl_2.6H_2O$	0.1
Zinc sulfate	$CuSO_4.5H_2O$	0.04
Copper sulfate	$ZnSO_4.7H_2O$	0.003
Iron sulfate	$FeSO_4.7H_2O$	0.5
Vitamin B12		0.002
Tween 80		12.5

4.3 แผนผังการชันสูตรโรคเลปโตสไปโรซิส



Notes : For serotyping of isolated, the cultured EMJH medium is sent to NIAH.