77079

การประเมินวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากซีรัมบนกระดาษซับ

Evaluation of Immunofluorescence Assay for Detection of Leptospira Antibody on Dried Serum Spots

ศราวุธ สุทธิรัตน์
ทวีพร พันธุ์พาณิชย์
ศันสนีย์ ตันติ์จธัม

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2545

ชื่อเรื่อง การประเมินวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากซีรัมบนกระดาษซับ

ผู้วิจัย ศราวุธ สุทธิรัตน์ ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ ศันสนีย์ ตันติ์จธัม

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2547

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 55

คำสำคัญ เลปโตสไปรา, การหยดซีรัมแห้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธีอินไดเรคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ที่พัฒนาขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธีอินไดเรคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก พบว่ามีความไว ความจำเพาะ ประสิทธิภาพ ค่าทำนายผลบวก และค่าทำนายผลลบเป็นร้อยละ 95.38, 99.28, 98.05, 98.41 และ 97.89 ตามลำดับ เมื่อนำซีรัมที่ให้ผลบวกซึ่งหยดอยู่บนกระดาษซับมาชะซีรัมออกในวันที่ 0, 4, 7, 14 และ 21 พบว่าระดับไตเตอร์จากการตรวจซีรัมที่ชะออกในวันที่ 0, 4 และ 7 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อคำนวณค่าความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจจากซีรัมสด กับซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ พบว่า ในวันที่ 0, 4, 7, 14 และ 21 มีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สรุปได้ว่าผลการตรวจซีรัมที่นำส่งโดยกระดาษซับไม่แตกต่างจากซีรัมที่นำส่งโดยตรงในระยะเวลา 7 วัน สำหรับการตรวจเชิงกึ่งปริมาณและในระยะเวลา 21 วันสำหรับการตรวจเชิงคุณภาพ การนำส่งซีรัมโดยวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ง่าย ประหยัดและเหมาะที่จะนำมาใช้นำส่งซีรัมจากถิ่นทุรกันดารมาตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ

Research Title Evaluation of Immunofluorescence Assay for Detection of Leptospira Antibody on Dried Serum Spots

Researchers Sarawut Suttirat, Taweeporn Phunpanich, Sansanee Tanjatham

Institution Huachiew Chalermprakiet University

Year of Publication 2004

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Sources Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages 55

Keywords Leptospira, Dried Serum Spots

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

Comparison of the developed indirect immunofluorescence assay (IFA) to IFA from Regional Medical Sciences Center (Phitsanulok) for detection of leptospiral antibody revealed the sensitivity, specificity, accuracy , positive and negative predictive values of 95.38, 99.28, 98.05, 98.41 and 97.89 % respectively. The titer of eluted sera on day 0, 4 and 7 were not statistically different ($p > 0.05$) and the titer of fresh sera by IFA correlated well with eluted sera on 0, 4, 7, 14, and 21 days ($p < 0.05$). Transport specimens, in form of dried serum spots could be kept atleast 7 days for semiquantitative analysis and 21 days for qualitative analysis. This handling method is appropriate for sending specimen from rural area to laboratory for confirmatory testing because it is simple, cost-effective and practical.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์บุษบา มาตระกูล คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้กรุณาให้โอกาสและสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศราวุธ สุทธิรัตน์
ทวีพร พันธุ์พาณิชย์
ศันสนีย์ ตันติ์จธัม

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญแผนภูมิ		ช
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	สมมติฐานของงานวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	23
	วิธีการทดสอบ	24
	การวิเคราะห์ผลการทดลอง	28
	วัสดุอุปกรณ์	28
บทที่ 4	ผลการวิจัย	30
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	45
	สรุปผลการวิจัย	45
	อภิปรายผล	45
	ข้อเสนอแนะ	49
บรรณานุกรม		51
ภาคผนวก		
	ประวัติย่อผู้วิจัย	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงผลิตภัณฑ์น้ำยาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีโรคเลปโตสไปโรซิส ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย	17
2	ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA	34
3	ระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผลบวก โดยวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก	35
4	การจำแนกกลุ่มควบคุมผลลบที่ได้จากผู้ป่วยที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นบวกกับการทดสอบอื่นยกเว้น แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา	35
5	ผลการตรวจโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นในการตรวจตัวอย่างควบคุมผลลบทั้งสามกลุ่ม	36
6	เปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA กับผลที่ได้จากภายนอกซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน	36
7	ความสัมพันธ์ระหว่างไตเตอร์ของซีรัมสดที่ตรวจโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก	37
8	ความสอดคล้องของผลการตรวจซีรัมสด ระหว่างวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก	38
9	ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 0	39
10	ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 0 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	39
11	ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 4	40
12	ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 4 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	40
13	ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 7	41
14	ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 7 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 14	42
16	ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 14 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	42
17	ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 21	43
18	ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 21 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	43

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	การเตรียม Leptospira antigen สำหรับเคลือบบนสไลด์ทดสอบ	26
2	ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้นต่างๆ	31
3	ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อ incubate ที่เวลาต่างกัน	32
4	ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อ incubate ที่อุณหภูมิต่างกัน	33

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเลปโตสไปโรซิส (โรคฉี่หนู : Leptospirosis) เป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ชนบทที่ห่างไกลความเจริญ จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของกองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข พบว่า อัตราป่วยของประชากรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างมากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2538 เป็นต้นมา โดยอัตราป่วยจากเดิมอยู่ในช่วง 0.07-0.5 ต่อแสนประชากร ได้เพิ่มขึ้นเป็น 3.84, 3.57 และ 9.87 ในปี พ.ศ. 2540-2542 ตามลำดับ และอัตราป่วยตายในปี พ.ศ. 2542 พบว่ามีมากถึงร้อยละ 4.38 (สำนักระบาดวิทยา. 2542 : 200) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยในรอบห้าปีที่ผ่านมา พบว่าจากปี พ.ศ 2539-2540 จำนวนผู้ป่วยเพิ่มขึ้นถึง 6.5 เท่า แล้วชะลอตัวในปี พ.ศ. 2541 และจำนวนผู้ป่วยกลับเพิ่มขึ้นเป็น 2.7 เท่าในปี พ.ศ. 2542 จนถึงปี พ.ศ. 2543 จำนวนผู้ป่วยสูงขึ้นถึง 14,285 รายและเริ่มลดจำนวนลงเหลือ 10,271 รายในปี พ.ศ. 2544 อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าจำนวนผู้ป่วยเมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2539 ซึ่งเป็นปีแรกที่มีการระบาดของโรคนี้ในประเทศไทยพบว่ามีจำนวนผู้ป่วยสูงขึ้นถึงเกือบ 30 เท่า (สำนักระบาดวิทยา. 2544 : 187) ดังนั้นการตรวจกรองผู้ป่วยด้วยวิธีการที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วจะช่วยในการวางแผนควบคุมโรคและช่วยให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงทีซึ่งจะทำให้อัตราการเสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวลดน้อยลงได้

การตรวจกรองผู้ป่วยโรคนี้ทำได้โดยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีการตรวจกรอง (screening test) โดยทั่วไปจะใช้หลักการการเกาะกลุ่ม (agglutination) ได้แก่ latex agglutination (Ramadass P. 1999 : 137-40), microcapsule agglutination (Suputtamongkol Y. 1998 : 797-801) หรือหลักการอื่นๆได้แก่ ELISA (Terpsta WJ. 1985 : 21-85), chemiluminescence (Waitkins SA. 1986 : 353-6), immunoblot (Petchclai B. 1991 : 672-5) และ immunchromatography (Hatta M. 2000 : 515-20) เป็นต้น แต่พบว่าวิธีดังกล่าวยังมีความไวและความจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก ทำให้อาจจะต้องส่งตรวจซ้ำเพื่อป้องกันผลลบปลอม (false negative) ซึ่งตามรูปแบบแนวทางการตรวจวินิจฉัยที่จัดทำโดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543) ได้กำหนดให้ส่งตรวจซ้ำด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA) ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่มีความไวสูงแต่มีข้อจำกัดคือ

ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาและค่าบำรุงรักษาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผล การตรวจโดยวิธีนี้จึงมีเฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เช่นโรงพยาบาลจังหวัด โรงพยาบาลศูนย์หรือศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เท่านั้น

ดังนั้น เมื่อมีการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสในพื้นที่ทุรกันดารและไม่สามารถวินิจฉัยโรคนี้ได้จากผลการตรวจกรองของห้องปฏิบัติการนั้นๆ ทั้งที่ผู้ป่วยมีลักษณะอาการปรากฏ ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่าการวินิจฉัยโรคนี้ทางห้องปฏิบัติการทำได้โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อซึ่งมีปรากฏอยู่ในซีรัมของผู้ป่วย ดังนั้นการเจาะเลือดเพื่อส่งสิ่งส่งตรวจไปยังสถานที่ที่สามารถตรวจยืนยันผลจึงเป็นวิธีเดียวที่จะทำให้สามารถวินิจฉัยโรคนี้เพื่อการรักษาที่เหมาะสมได้ แต่การนำส่งเลือดไม่สะดวกเนื่องจากต้องแช่เย็นและอาจมีปัญหาการแตกของเม็ดเลือดแดงซึ่งอาจจะรบกวนการตรวจ แต่ถ้าจะส่งในรูปของซีรัมก็ยังมีปัญหาเดียวกันคือต้องแช่เย็นเพราะไม่เช่นนั้นจะเกิดการเน่าเสียของซีรัมทำให้ไม่สามารถนำมาตรวจได้

จากปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาวิธีการนำส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อให้สะดวกต่อการนำส่งทางระบบไปรษณีย์ เพื่อการป้องกันปัญหาต่างๆที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการนำส่งดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้ว รวมทั้งสามารถเก็บรักษาคุณภาพของสิ่งส่งตรวจไม่ให้เสียไป โดยการปั่นแยกเลือดแล้วนำซีรัมมาหยด (dot) บนกระดาษซับ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาระยะเวลาการเก็บตั้งแต่วันแรก วันที่ 4 วันที่ 7 วันที่ 14 และวันที่ 21 แล้วนำกระดาษซับมาแยกเอาซีรัมออก นำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราเปรียบเทียบกับการตรวจจากซีรัมส่งตรวจโดยตรง โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ซึ่งพัฒนาขึ้นจากวิธีการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ซึ่งผลงานวิจัยดังกล่าวจะช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายของการนำส่ง ช่วยป้องกันความสูญเสียที่เกิดจากการเน่าเสียของสิ่งส่งตรวจรวมทั้งเพื่อความสะดวกของผู้ปฏิบัติงานสาธารณสุขในพื้นที่ทุรกันดารในการยืนยันผลการตรวจกรองสำหรับผู้ป่วยที่มีอาการน่าสงสัยแต่ให้ผลการตรวจกรองเบื้องต้นเป็นลบอีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ เลปโตสไปราโดยวิธี indirect immunofluorescence ให้สามารถตรวจแอนติบอดีในกระดาษซับได้

2. เปรียบเทียบระดับความเจือจางของแอนติบอดีในซีรัมที่แยกจากกระดาษซับแล้วนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ในระหว่างวันแรก วันที่ 4, 7, 14 และ 21 จากตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกโดยวิธี immunofluorescence จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

3. วิเคราะห์ความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธี immunofluorescence ที่พัฒนาขึ้น

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการตรวจซีรัมส่งตรวจและซีรัมที่เก็บบนกระดาษซับ ภายในวันที่ 0, 4, 7, 14 และ 21 โดยใช้ตัวอย่างซีรัมส่งตรวจ จำนวน 4 กลุ่มคือ

1. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์

2. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการตรวจในโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรซิส เช่น โรคมะเร็งตับ (AFP-positive) โรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเอง (rheumatoid factor, ANA –positive) โรคไข้เลือดออก เป็นต้น

3. ซีรัมจากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีอาการของโรค

4. ซีรัมจากผู้ที่มีสุขภาพดี และไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด รวมทั้งไม่มีประวัติของการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมาก่อน

สมมติฐานงานวิจัย

ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากซีรัมที่ชะออกจากกระดาษซับที่เก็บไว้ 0, 4, 7, 14 และ 21 วัน ไม่มีความแตกต่างกับผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างซีรัมเดียวกันที่ไม่ได้ชะออกจากกระดาษซับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA

2. ได้วิธีนำส่งสิ่งส่งตรวจที่มีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยในการตรวจยืนยันผลสำหรับการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสของผู้ป่วยที่อยู่ในถิ่นทุรกันดาร

3. ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการนำส่งซีรัมที่เก็บในกระดาษซับสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติของโรค

โรคเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis) หรือโรคฉี่หนูเป็นโรคที่สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คนได้ โดยมีหนูเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ นอกจากนี้ยังมี สุนัข โค สุกร ม้า นก ฯลฯ ที่เป็นพาหะนำโรคได้ โรคนี้มีชื่อเรียกอีกหลายชื่อ ได้แก่

- Weil's disease
- Mud fever
- Seven day fever
- Canicola fever
- Swineherd's disease

โรคเลปโตสไปโรซิสมีการระบาดในสัตว์ ต่อมาพบว่ามีการก่อโรคในคนโดยที่เป็นเชื้อตัวเดียวกัน ในปี พ.ศ.2429 Adolf Weil นายแพทย์ชาวเยอรมันได้รายงานว่า มีผู้ป่วยที่มีไข้ ตัวเหลือง และมีจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง และเรียกโรคนี้ว่า Weil's disease แต่มีการค้นพบเชื้อสาเหตุของโรคเกิดขึ้นในปี พ.ศ.2457 โดย Inada R. และคณะ ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อได้จากผู้ป่วยไข้ตัวเหลือง และเรียกชื่อเชื้อที่แยกได้ว่า *Spirocheta icterohemorrhsgia* และใน พ.ศ.2460 Noguchi H. พบว่าเชื้อนี้มีความแตกต่างจากสไปโรขีตที่รู้จักกันเป็นส่วนใหญ่จึงตั้งสกุลใหม่ในเชื้อตัวนี้ว่า *Leptospira*

สาเหตุของโรค

เกิดจากเชื้อ *Leptospira* ซึ่งเป็นแบคทีเรียใน class: Schizomycetes, order: Spirochaetaceae, genus: Leptospira

เชื้อ *Leptospira* มีอยู่หลายสายพันธุ์ที่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ชนิดต่างๆ เกือบทั้งโลก ทั้งในทวีปเอเชีย ยุโรป ออสเตรเลียและอเมริกาใต้ โรคนี้จัดเป็นโรคติดต่อระหว่างสัตว์กับคนที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทย

Leptospira ที่ก่อโรคในคนและสัตว์ (pathogenic) มีหลายสายพันธุ์ แต่ที่สำคัญคือเชื้อสายพันธุ์ *Leptospira interrogans* (parasitic) และ *Leptospira biflexa* (saprophytic)

เชื้อที่พบทั้งในคนและสัตว์จากการทดลองพบว่ามี antigenic variation หลายอย่างทำให้จำแนกเชื้อออกได้เป็น subgroup ตามคุณสมบัติของแอนติเจนที่คล้ายคลึงกัน และแต่ละ subgroup ยังแบ่งเป็น serotype (serovar) ต่างๆตามปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination) กับแอนติเจน เช่น *L.interrogans* มีไม่น้อยกว่า 31 serogroup และไม่น้อยกว่า 240 serotype ส่วน *L.biflexa* มีประมาณ 38 serogroup และ 63 serotype โดยใช้วิธี agglutination lysis method ในการหา serotype

ในประเทศไทย ผลการสำรวจทาง serology ในคน หนู สุนัข โค กระบือ สุกรและแมว และรายงานตั้งแต่ต้นจนถึงปี 2540 มีรายงานพบเชื้อรวม 12 serogroup (20 serovars) คือ Australis (*L. australis, L.bangkok, L.ballico* และ *L.lora*) Autumnalis (*L.autumnalis, L.rachmati* และ *L.forbragg*) Bataviae, Canicola, Grippotyphosa, Hebdomadis, Tarassori, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Pomona, Pyrogense (*L.pyrogenes* และ *L.saxkoebing*) และ Hebdomadis (*L. wolffi*)

ในช่วงตั้งแต่เริ่มมีการระบาดจนถึงปี พ.ศ. 2540 มีการเฝ้าระวังโรคเฉพาะเชื้อที่พบบ่อย ได้แก่ *L.akiyami A, L.ballico, L.bataviae, L.canicol, L.grippotyphosa, L.habdomadis, L.hyos, L.icterohaemorrhagia, L.javanica, L.pomona, L.pyrogenes* และ *L.wolffi* ในปี พ.ศ. 2541 ผลการศึกษาของกระทรวงสาธารณสุขร่วมกับศูนย์ป้องกันและควบคุมแห่งสหรัฐอเมริกาพบว่าประเทศไทยควรเพิ่มการเฝ้าระวังเชื้อเลปโตสไปรา เช่น Australis (*L.bratislava*), Autumnalis (*L.new*), Ballum, Cellidoni, Cynopteri, Djasiman, Icterohaemorrhagiae (*L.copenhageni*), Javanica (*L.poi*), Louisisana (*L.saigon*), Sejore (*L.hardjo* และ *L.sejore*) และsemaranga (*L.patoc*) เป็นต้น

คุณสมบัติและลักษณะของเชื้อ

Leptospira เป็นพวกสไปโรขีต มีขนาด 0.1-0.2x6-20 ไมโครเมตร ลักษณะเรียวเป็นเกลียว (coils) เคลื่อนตัวได้เร็วมากโดยการหมุน (spinning) หรือการทำตัวโค้งงอ (bending) โดยมากปลายทั้งสองข้างจะโค้งงอเป็นขอ (hook) แต่อาจพบเชื้อที่เป็นเส้นตรงซึ่งมักจะหมุนและเคลื่อนไหวได้ช้ากว่า ตัวเชื้อจะย้อมสีแกรมไม่ติดแต่เห็นได้ถ้าย้อมด้วย silver stain และดูด้วยกล้อง dark field microscope

เชื้อ *Leptospira* มีเยื่อหุ้ม (membrane) 3–5 ชั้น เป็นเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ภายในเซลล์เป็น protoplasmic cylinder ซึ่งประกอบด้วยชั้น peptidoglycan และ cytoplasmic membrane ซึ่งห่อหุ้ม cytoplasm ของเซลล์ปลายเซลล์ทั้ง 2 ด้านจะมี flagella ข้างละ 1 เส้น cytoplasm ประกอบด้วยนิวเคลียส ไรโบโซม (ribosome) มีโซโซม (mesosome) อินคลูชั่นบอดีส์ (inclusion bodies) ไม่พบว่าเชื้อเลปโตสไปรามี endotoxin เชื้อเลปโตสไปราที่อยู่อย่างอิสระ

(*L. biflexa*) และเชื้อเลปโตสไปราที่เป็นเชื้อก่อโรค (*L.interrogans*) มีรูปร่างลักษณะที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างกันได้

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *L.interrogans* ซึ่งเป็น aerobic bacteria ต้องมีสารโปรตีนพวก bovine serum albumin (หรือซีรัมกระต่าย) กรดไขมัน ฟอสเฟต เหล็ก thiamine และ cyanocobalamine ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเจริญได้ดีที่ pH 7.2-7.4 ที่อุณหภูมิ 28 °ซ -30 °ซ การเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลาประมาณ 6-14 วัน หรืออาจนานถึง 6 สัปดาห์ได้ ส่วนพวก *L. biflexa* ไม่ต้องการโปรตีนและมีความสามารถปรับตัวอยู่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ เช่น ในน้ำ ในอุจจาระ

เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติได้หลายวันหรือหลายสัปดาห์ถ้ามีความชื้นที่เหมาะสม เป็นบริเวณที่มีร่มเงา แสงแดดส่องไม่ถึง ความเป็นกรดด่างปานกลางหรือค่อนข้างเป็นด่าง (pH 7.2–8.0) ถ้า pH สูงกว่า 8.0 หรือต่ำกว่า 6.5 จะเป็นภาวะที่ไม่เอื้อต่อการอยู่รอดของเชื้อ อุณหภูมิประมาณ 28^{0}ซ –32^{0}ซ จะเหมาะแก่การอยู่รอดของเชื้อ แต่อุณหภูมิ 42^{0}ซ ขึ้นไปสามารถฆ่าเชื้อให้ตายได้ และที่อุณหภูมิ 57^{0}ซ เชื้อจะตายภายใน 2–3 นาที แสงแดด (ultraviolet) และความแห้งจะทำลายเชื้อได้รวดเร็ว ในดินที่แห้งเชื้อจะตายได้รวดเร็ว ในดินที่แห้งเชื้อจะตายได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง ความเค็ม (น้ำเกลือ น้ำทะเล) นม ปัสสาวะที่มีฤทธิ์เป็นกรด น้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น ไอโอดีน คลอรีน ทำลายเชื้อได้เช่นกัน (ดาริกา กิ่งเนตร. 2544 : 7)

การติดต่อและการแพร่กระจายของโรค

เลปโตสไปโรซิสเป็นโรคของสัตว์ที่ติดต่อมายังคนได้ โดยทั่วไปเชื้อแต่ละ serotype จะมีสัตว์ที่เป็นโฮสต์เฉพาะของแต่ละชนิด เช่น *L.canicola* ในสุนัข, *L.pompna* ในโคและสุกร, *L.icterohaemorrhagiae* ในหนู เป็นต้น แต่พบว่า serotypeที่ก่อโรคได้นั้น สามารถแพร่ระหว่างสัตว์เชื้อสายชนิดเดียวกันได้แล้วยังสามารถแพร่เชื้อให้สัตว์ต่างเชื้อสายได้ด้วยแต่จะก่อให้เกิดอาการของโรคต่างๆ กันไปในสัตว์แต่ละชนิดตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงขั้นรุนแรงถึงชีวิต นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงสายพันธุกรรมในระหว่างสายพันธุ์ได้บ่อย ซึ่งมีผลต่อการระบาดของโรคทั้งในสัตว์และคน

สัตว์ที่เป็นรังของโรค (reservoir host) ซึ่งกักเก็บเชื้อโรค คือ หนู สัตว์ฟันแทะ และสัตว์อื่นๆ เช่น สุนัข โดยอาจจะไม่แสดงอาการ หรือแสดงอาการเล็กน้อย จนถึงรุนแรง สัตว์เหล่านี้จะมีเชื้ออยู่ในไตและถูกขับออกมากับปัสสาวะได้เป็นระยะเวลายาวนาน เมื่อเชื้อถูกขับออกมาจากร่างกายของสัตว์มาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เชื้อจะมีชีวิตสั้นลง ในบางส่วนของโลกพบเชื้อในสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นๆ เช่น สุกร แพะ แกะ โค กระบือ และมีรายงานพบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ คางคก ปลา หอย สัตว์เลื้อยคลาน นก คนเป็นโฮสต์โดยบังเอิญ และยังไม่พบการแพร่เชื้อ

จากคนไปยังคนและสัตว์ คนติดเชื้อโดยเชื้อจะไชเข้าสู่ผิวหนังรอยแตก รอยถลอก ขีดข่วน หรือเชื้อเข้าตามเยื่อบุ (mucous membrane) ของจมูก ปาก ตา เมื่อคนเข้าไปสัมผัสกับปัสสาวะ หรือเนื้อสัตว์ของสัตว์ที่ป่วยเป็นโรค

การตรวจพบเชื้อและสถานการณ์การระบาดในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกเมื่อ พ.ศ.2486โดยนายแพทย์ใช้ ยูนิพันธ์ ซึ่งมีผู้ป่วยโรคนี้ 4 รายในโรงพยาบาลศิริราช ต่อมามีรายงานผู้ป่วยและมีการศึกษาโรคนี้มากขึ้นจนถึงตั้งเป็นศูนย์วิจัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ.2504 เชื้อที่พบในผู้ป่วยกรุงเทพมหานคร ส่วนใหญ่เป็น serotype *Leptospira bataviae* สำหรับในภูมิภาคมักเป็น serotype *L.icterohaemorrhagiae, L. bataviae* และ*L. hebdomadis*

สถานการณ์การระบาดของโรคเริ่มรุนแรงขึ้นในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 พบว่าการระบาดเกิดในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมติดต่อกันมาจนถึงปัจจุบัน และอุบัติการณ์ของโรคมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี พ.ศ.2539 เริ่มมีรายงานผู้ป่วยทั้งสิ้น 358 ราย จาก 38 จังหวัดแล้วเพิ่มมากขึ้นเป็น 2,334 ราย จาก 48 จังหวัด ในปี พ.ศ.2540 สำหรับในปี พ.ศ.2541 พบ 2,230 ราย จาก 59 จังหวัด หลังจากนั้นมีรายงานเพิ่มขึ้นเป็น 6,080 ราย จาก 60 จังหวัด ในปี พ.ศ.2542 พบ 13,461 ราย ในปี พ.ศ.2543 ที่ผ่านมา (สำนักระบาดวิทยา. 2542 : 200) พบผู้ป่วยร้อยละ 85-90 จากจังหวัดต่างๆ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดบุรีรัมย์ ขอนแก่น สุรินทร์ มหาสารคาม นครราชสีมา เลย กาฬสินธุ์ และร้อยเอ็ดและในขณะนี้เริ่มมีการรายงานการพบผู้ป่วยมากขึ้นทางภาคเหนือในปี พ.ศ.2542 เช่น จังหวัดแพร่ เพชรบูรณ์ เป็นต้น และทางภาคใต้ในปี พ.ศ.2543 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของโรคนี้ตลอดเวลาในปัจจุบัน

ในการระบาดครั้งนี้ยังพบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปราในสัตว์และสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง และตรวจพบ serovarใหม่ๆ ซึ่งไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อนหลายชนิด อาทิเช่น bratislava, copenhageni และ sejroe เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมีอาการและอาการแสดงออกทางคลินิกที่รุนแรงทำให้อัตราการตายในบางโรงพยาบาลสูงถึงร้อยละ15-20 ทำให้โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยในขณะนี้ (ยุพิน ศุพุทธมงคล. 2544 : 203-11)

พยาธิกำเนิด

เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายคนโดยทางผิวหนังหรือบาดแผล หรือเข้าทางเยื่อบุของจมูก ปาก ตา เชื้อจะเข้าสู่กระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้เกิดภาวะ bacteremia เชื้อจะเพิ่มจำนวนได้สูงสุดภายใน 2–4 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่มีไข้สูง และแพร่กระจายไปทั่วร่างกายตามอวัยวะต่างๆ เช่น ลำไส้ เยื่อหุ้มสมอง ปอด หัวใจ โดยเฉพาะที่ตับ ไต สมอง และระบบประสาทส่วนกลาง เกิดการอักเสบของอวัยวะดังกล่าว เช่น ตับโต อาการตัวเหลือง (jaundice) จะปรากฏวันที่ 2–5 หลังเป็นไข้ และตัวเหลืองขณะอาการเลวลง (ต่างจากตัวเหลืองเพราะไวรัสจากตับอักเสบบี ซึ่งจะตัวเหลืองขณะอาการดีขึ้นและไม่มีภาวะแทรกซ้อน) บางรายพบตับมีการบวมเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากการคั่งของเลือดภายในตับ (ดาริกา กิ่งเนตร. 2544 : 13)

พยาธิสภาพ

มีเลือดออกได้ในทุกอวัยวะ การที่มีเลือดออกนี้เข้าใจว่าเกิดจากผนังหลอดเลือดฝอยถูกทำลาย มีผู้ศึกษาการแข็งตัวของเลือดในผู้ป่วยโรคนี้ ไม่พบสิ่งผิดปกติ นอกจากอาจมีเกล็ดเลือดจำนวนน้อยลง และบางรายมี prothrombin time นานขึ้น ซึ่งจะกลับเป็นปกติทันทีเมื่อได้รับการฉีดวิตามินเอ ในตับมี mild interstitial edema และ vascular congestion ทั่วๆ ไป จนถึง focal necrosis มี cell infiltration เป็นกลุ่มเม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear และ round cell ในไตพยาธิสภาพที่พบเสมอ คือ interstitial nephritis และ tubular epithelial necrosis สำหรับพยาธิสภาพอย่างแรกมักพบในคนไข้ที่มีชีวิตอยู่นานพอ (เกินกว่า 1 สัปดาห์) ส่วน tubular epithelial necrosis ของ distal tubule จะพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกของโรค

ต่อมาในปี พ.ศ.2523 นายแพทย์วิศิษฐ์ สิตปรีชาและคณะ ได้รายงานว่าพยาธิสภาพที่ไตในโรคนี้เป็นแบบ tubulointerstitial nephritis ซึ่งเป็นเหตุทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงไปและกลไกที่แท้จริงของการเกิดพยาธิสภาพที่ไตเช่นนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ส่วนในบางรายพยาธิสภาพที่ไตก็พบแต่เพียง interstitial nephritis เพียงอย่างเดียวและในรายเช่นนี้พบว่าหน้าที่การทำงานของไตอยู่ในเกณฑ์ปกติ ปอดมี hemorrhagic pneumonitis เป็นหย่อมๆ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ สมองและเยื่อหุ้มสมองมีการอักเสบและเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาเพียงเล็กน้อย

ถ้าใช้วิธีการย้อมสีชนิด silver impregnation method อาจพบเชื้อเลปโตสไปราอยู่ในหลอดเลือดฝอยในไตได้

กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคนี้ แม้ยังไม่สามารถแยกทอกซินจากเชื้อได้ แต่ก็มีหลักฐานทางคลินิกและทางจุลกายวิภาคที่สนับสนุนว่า น่าจะเกิดจากทอกซิน ซึ่งมีผู้แนะนำว่าถูกปลดปล่อยออกมาโดยการสลายเชื้อ เพราะหลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วประมาณ 3 วัน แม้ว่าจะให้ยาที่ทำให้จำนวนเชื้อลดลงแล้ว ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพและการดำเนินโรคด้วย

อาการของโรคในคน เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะมีระยะฟักตัวประมาณ 10–12 วัน โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 2-30 วัน โรคนี้จะเป็นได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ มีอาการเพียงเล็กน้อย ไม่มีตัวเหลือง จนถึงอาการรุนแรงเฉียบพลัน ตัวเหลือง ภาวะตับและไตล้มเหลว และอาจตายได้ โดยทั่วไปอาการไม่แน่นอนและคล้ายคลึงกับโรคอื่นมาก อาการที่พบเสมอคือ มีไข้ ปวดศีรษะ หนาวสั่น ตัวเหลือง ปวดกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะบริเวณน่องและคอ คลื่นไส้ โลหิตจางเนื่องจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย อาการสมองอักเสบ ตับม้ามโต และไตทำงานผิดปกติ โดยทั่วไปไม่พบไข่ขาวในปัสสาวะในระยะแรกของอาการป่วย ยกเว้นรายที่เป็นหนักมาก

เชื้อที่พบทำให้เกิดอาการรุนแรงมักเป็น *L.icterohaemorrhagiae* ร่างกายมักได้รับเชื้อผ่านทางผิวหนัง หรือทางปากพร้อมอาหาร น้ำดื่มที่ปนเปื้อนกับปัสสาวะสัตว์ที่มีเชื้อ อาการตัวเหลือง ไข้ ตับม้ามโต พร้อมกับมีอาการโรคไตผิดปกติ จะเป็นลักษณะเด่นของ Weil's disease ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระยะ

ระยะแรก มีไข้ 2–3 วัน

ระยะที่สอง วันที่ 3–7 มีอาการตัวเหลือง ตับม้ามโต และจุดเลือดออกตามผิวหนัง ผู้ป่วยมักตายระยะนี้และสามารถตรวจพบเชื้อในปัสสาวะผู้ป่วยได้

ระยะที่สาม วันที่ 7–13 จะมีไข้หนาวสั่น อาการในระบบทางเดินอาหาร ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ ตาแดง พบไข่ขาวในปัสสาวะ (albuminurea) ถ้าผ่านระยะนี้ไปได้มักไม่เสียชีวิต พบเชื้อในเลือดมากซึ่งถ้านำไปฉีดเข้าหนูตะเภา เพื่อการวินิจฉัยโรคจะให้ผลบวกชัดเจน สำหรับเชื้อ serotype *L.pomona* พบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้สูง

อาการแสดง

โรคนี้มีระยะฟักตัวโดยเฉลี่ย 5–14 วัน ผู้ที่ได้รับเชื้อนี้จำนวนหนึ่งอาจไม่มีอาการทางคลินิก (subclinical infection) ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกอาจแบ่งเป็น 2 ระยะตามพยาธิกำเนิด

ระยะแรก (leptospiremic phase) เป็นระยะ 4–7 วันแรกของการดำเนินโรคซึ่งสามารถแยกเชื้อเลปโตสไปราได้จากเลือดและน้ำไขสันหลัง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูงแบบทันทีทันใด ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อมากโดยเฉพาะกล้ามเนื้อหลัง น่องและคอ คลื่นไส้อาเจียน ตาแดง ซึ่งเป็นผลจากการที่เส้นเลือดในเยื่อบุตาขยายตัวโดยไม่มีการอักเสบเป็นหนองมักพบใน 3 วันแรกของโรคและ

เป็นอยู่ได้นานถึง 1 สัปดาห์ อาจพบมีอาการคอแข็ง ความดันโลหิตต่ำ การตรวจร่างกายอื่นที่อาจพบได้แต่ไม่บ่อยได้แก่ ผื่นแดง ต่อมน้ำเหลืองโต ตับม้ามโต

ระยะที่สอง (immune phase) เป็นระยะที่ผู้ป่วยเริ่มสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดโรคนี้ หรือหลังจากเริ่มมีอาการไข้ประมาณ 1 สัปดาห์ โดยจะมีช่วงที่ไข้ลดลงประมาณ 1–2 วันแล้วกลับมีไข้ขึ้นใหม่ ในระยะนี้ผู้ป่วยมักมีอาการปวดศีรษะ ซึ่งไม่ค่อยตอบสนองต่อการกินยาแก้ปวด มีไข้ต่ำๆ คลื่นไส้อาเจียนแต่ไม่รุนแรง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ม่านตาอักเสบ และพบหน้าที่ของตับและไตผิดปกติ ระยะนี้อาจกินเวลาตั้งแต่ 4-30 วัน และจะพบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดและน้ำไขสันหลังได้ใน 1–2 วันแรกและหลังจากนั้นเชื้อจะออกมาในปัสสาวะนาน 1–3 สัปดาห์ ผู้ป่วยซึ่งมีอาการรุนแรงจะมีไข้สูงลอยและมีอาการแสดงของระยะนี้ตั้งแต่ปลายสัปดาห์แรกของโรคโดยไม่มีช่วงที่ไข้ลดลง (ยุพิน ศุพุทธมงคล. 2544 : 203-211)

ระบบทางเดินอาหาร : เบื่ออาหาร เจ็บคอ อาจมีท้องเดิน ปวดท้องทั่วๆ ไป หรือปวดท้องที่ชายโครงขวา อาการปวดท้องในบางรายอาจเป็นรุนแรงจนถึงกับต้องผ่าตัดช่องท้อง ซึ่งพบได้ยากกว่าแบบแรก

ตับ : อาจโตหรือไม่โตก็ได้ แต่มักมี hepatocellular dysfunction, transaminase ไม่ค่อยสูงมาก ถ้ามีอาการเหลือง มักจะปรากฏในวันที่ 2–5 หลังจากมีไข้ จะเหลืองในขณะที่มีไข้มีอาการเลวลง ไม่ใช่ในขณะดีขึ้นอย่างในตับอักเสบจากเชื้อไวรัส

ม้าม : มักไม่โต

ไต : ในระยะแรก ตรวจปัสสาวะจะไม่พบไข่ขาว เม็ดเลือดและgranular cast ระดับยูเรียในเลือดมักเพิ่ม แม้ว่าไม่มีภาวะปัสสาวะน้อยหรือในรายที่ไม่มีอาการเหลือง

ระบบหัวใจ : มีการเต้นผิดปกติของหัวใจได้ อาจเกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุการตายได้

ระบบประสาท : มีเยื่อหุ้มสมองอักเสบได้บ่อย จะปวดศีรษะมาก คอแข็ง น้ำไขสันหลังมีเซลล์เพิ่ม (ระยะแรกเป็นชนิด neutrophil ระยะหลังเป็นชนิด lymphocyte) แรงดันน้ำไขสันหลังเพิ่ม โปรตีนเพิ่ม ระดับน้ำตาลค่อนข้างปกติ เชื้อที่ทำให้เกิดอาการนี้ได้บ่อย คือ canicola

ต่อมน้ำเหลือง : อาจโตได้เฉพาะที่อยู่ใต้ผิวหนัง และในกลุ่ม mesentery

กล้ามเนื้อ : ปวดเจ็บได้มากๆ ไม่เฉพาะแต่ที่น่องเท่านั้น แต่ที่ขา หน้าอก หลัง หรือท้องได้ด้วย

ผิวหนัง : มี muscular rash เกิดได้ระหว่างวันที่ 3–5 ของโรค อาจมีเป็นหย่อมหรือทั่วตัวก็ได้ จุดเลือดออกพบได้บ่อยกว่า

ระบบหลอดเลือด : มีเลือดออกได้ทุกอวัยวะ เช่น มีเลือดกำเดาออก จุดและจ้ำเลือดที่ผิวหนัง เลือดออกใต้เยื่อบุตา (subconjunctival) ที่ไต (มีเลือดในปัสสาวะ) ที่ปอด (ไอเป็นเลือด) ที่กระเพาะอาหารและลำไส้ (อาเจียนเป็นเลือดและมีเลือดในอุจจาระ)

ตา : มีอาการกลัวแสง เยื่อตาแดง เลือดออกใต้เยื่อบุตา ที่พบบ่อยคือ uveitis และ ตาอักเสบพวกที่มีอาการน้อย จะมีอาการเหมือนไข้หวัด

อาการแสดงทางคลินิก

1. ภาวะเยื่อบุตาแดง (conjunctival suffusion) เกิดขึ้นในตาทั้งสองข้าง ภายใน 3 วันแรกของโรค และอยู่ได้นานตั้งแต่ 1 วันถึง 1 สัปดาห์ อาจพบร่วมกับเลือดออกที่ตาขาว (conjunctival hemorrhages) ข้างเดียวหรือสองข้างก็ได้ แต่ไม่ใช่ตาแดงที่เกิดจากการอักเสบชนิดเป็นหนอง

2. กดเจ็บกล้ามเนื้ออย่างรุนแรงโดยเฉพาะที่น่อง

3. มีเลือดออกแบบต่างๆ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและมีอาการเหลือง เช่น จุดเลือดออกทางผิวหนัง (petechiae), ผื่นเลือดออก (purpuric spots), เลือดออกใต้เยื่อบุตา (conjunctival hemorrhages) หรือเสมหะเป็นเลือด บางครั้งอาจพบเพียงผื่นเลือดออก 2–3 แห่ง ที่หน้าอก ท้อง หรือแขน เชื่อว่าเกิดจากเส้นเลือดฝอยที่เปราะ ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดย tourniquet for capillary fragility (Hess) test[1] แต่การตรวจ bleeding time, clotting time และ prothrombin time มักจะอยู่ในเกณฑ์ปกติ อย่างไรก็ตามในรายที่มีอาการรุนแรง (classical Weil's disease) พบว่าค่า prothrombin time ผิดปกติได้

4. ผื่นอาจพบได้หลายแบบ เช่น ผื่นแดงราบ (erythematous), ผื่นแดง (macular), ผื่นและตุ่มแดง (maculopapular), ผื่นลมพิษ (urticaria) ซึ่งผื่นเหล่านี้อาจจะพบเฉพาะที่หรือเป็นได้ทั้งตัว ผื่นมักจะเป็นชั่วคราวและบางรายอาจจะพบมากกว่าในหนึ่งสัปดาห์ได้

5. อาการเหลือง มักจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาในการตรวจทางคลินิก ถ้ามีอาการเหลืองน้อยๆ อาจจะต้องตรวจในที่มีแสงสว่างเพียงพอ อาการเหลืองจะเกิดระหว่างวันที่ 4–6 ของโรค แต่ก็อาจจะเกิดได้เร็วตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป (วราลักษณ์ ตังคณะกุล. 2544 : 25)

---

[1] Hess test : การใช้เครื่องวัดความดันโลหิตรัดแขนที่ความดันโลหิตเท่ากับค่าที่อยู่ระหว่างความดัน diastolic และ systolic เป็นเวลา 5–10 นาที แล้วตรวจสอบว่ามีจุดเลือดออกตามผิวหนัง (petechiae) ในพื้นที่เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ที่บริเวณท้องแขนด้านในใต้บริเวณที่วัดความดันโลหิตหรือไม่ ถ้าพบว่ามี ประมาณ 10–20 จุด แสดงว่าอาจจะมีความเปราะของเส้นเลือดฝอย (suspected) ถ้ามีมากกว่า 20 จุด แสดงว่ามีความเปราะของเส้นเลือดฝอย

ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสอาจมีอาการแสดงทางคลินิกและการดำเนินโรคที่แตกต่างกันได้มาก อาทิเช่น ไข้เฉียบพลัน ซึ่งหายได้เองหรือมีอาการข้างเคียงต่างๆ ร่วมด้วยที่อาจรุนแรงและทำให้เสียชีวิตได้ โดยทั่วไปแบ่งได้เป็นสองกลุ่มตามการพยากรณ์โรคดังนี้

1. กลุ่มที่ไม่แสดงอาการตัวเหลืองตาเหลือง (anicteric leptospirosis) โดยทั่วไปรายงานว่าพบได้ร้อยละ 85–90 ของผู้ติดเชื้อที่แสดงอาการทั้งหมด ผู้ป่วยกลุ่มนี้อาการไม่รุนแรงและหายได้เอง อัตราตายต่ำ เชื้อที่มีรายงานว่าทำให้เกิดโรคในกลุ่มนี้บ่อยๆ เช่น *L.ballum, L.hardjo* เป็นต้น

อาการทางคลินิกที่พบในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไข้เฉียบพลัน (ไข้ขึ้นสูง 38^{0}ซ –40^{0}ซ อาจมีหนาวสั่นร่วมด้วย) เยื่อบุตาบวมแดง (conjunctival suffusion) ปวดศีรษะและปวดกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง (โดยเฉพาะที่น่อง โคนขา กล้ามเนื้อหลัง มีอาการกดเจ็บกล้ามเนื้อดังกล่าวร่วมด้วย) อาจมีคลื่นไส้อาเจียน อาการพบตั้งแต่หนึ่งวันถึงหลายวัน ลักษณะของไข้มีลักษณะเป็น biphasic (ระยะมีไข้สลับกับระยะไข้ลดและระยะกลับมามีไข้อีกครั้ง) ระยะแรกเป็นระยะที่มีเชื้อในกระแสเลือดและน้ำไขสันหลัง (septicemic stage) ระยะนี้มีไข้ประมาณ 4–7 วัน ตามด้วยระยะที่ไม่มีไข้และไม่มีอาการ 1–3 วัน หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่สอง (immune stage) ระยะนี้สั้น ประกอบด้วยไข้ขึ้นอีกครั้ง (recurrent of fever) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และมีเชื้อออกมาในปัสสาวะ (leptospinuria) อย่างไรก็ตามลักษณะของไข้ที่เป็น biphasic ไม่พบในผู้ป่วยทุกราย

2. กลุ่มที่มีอาการตัวเหลืองตาเหลือง (icteric leptospirosis) เป็นกลุ่มที่มีอาการรุนแรง ไม่พบลักษณะไข้แบบ biphasic กลุ่มนี้อาการในระยะแรก (septicemic illness) จะไม่หายไป ความรุนแรงจะเพิ่มขึ้นโดยพบว่ามีอาการเหลือง และไตวาย อาการทางคลินิกประกอบด้วย อาการที่พบในกลุ่มที่มีอาการไม่รุนแรงร่วมกับอาการที่เกิดจากพยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆ ได้แก่ มีผื่นที่เพดานปาก มีจุดเลือดออกตามผิวหนังและเยื่อบุตับและไตวาย ดีซ่าน เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (ทำให้ความรู้สึกสับสน เพ้อ ซึม) กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ อาจมีอาการทางระบบทางเดินหายใจ โดยมีหรือไม่มีอาการไอเป็นเลือด (hemoptysis) กลุ่มที่มีอาการรุนแรงพบไม่ถึงร้อยละ 10 ของคนไข้ทั้งหมด กลุ่มนี้อาการเหลืองจะเกิดระหว่างวันที่ 4–6 ของโรค ปัสสาวะออกน้อยในสัปดาห์ที่ 2 ของโรค แต่อาจพบได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของโรค ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตในระยะนี้หรือในต้นสัปดาห์ที่สามจากภาวะไตวาย ภาวะมีเลือดออกอย่างรุนแรงเป็นสาเหตุการตายจากโรคได้ การเสียชีวิตเนื่องจากภาวะตับวายพบน้อย อัตราป่วยตายในกลุ่มที่มีอาการรุนแรงและไม่ได้รับการรักษาพบร้อยละ 15-40 ส่วนใหญ่ที่ผ่านมารายงานว่าเกิดจากการติดเชื้อ serovar bataviae และ icterohaemorrhagiae มากที่สุด แต่ในการระบาดครั้งนี้พบว่าเกิดจากเชื้อเลปโตสไปรา serovar อื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น pyrogenes, sejroe เป็นต้น

การวินิจฉัยโรค

1. จากประวัติของผู้ป่วย

โดยการสอบถามเกี่ยวกับโอกาสสัมผัสกับสัตว์หรือสิ่งที่มีการปนเปื้อนปัสสาวะสัตว์ เช่น น้ำ ดิน โคลน ท่อระบายน้ำทิ้ง รวมทั้งสุขนิสัยการบริโภคอาหาร เป็นต้น ซึ่งควรถามย้อนหลังให้ครอบคลุมระยะฟักตัวของโรค คือ ประมาณ 20–30 วัน

2. การวินิจฉัยทางคลินิก

โดยตรวจวินิจฉัยจากอาการแสดง ประวัติการสัมผัสโรค การทำงาน แต่อาการจะไม่แน่นอน ยากต่อการวินิจฉัย เพราะบางครั้งไม่มีอาการตัวเหลือง ดังนั้นโรคนี้เป็นโรคหนึ่งที่ควรคำนึงถึงเมื่อผู้ป่วยเกิดเป็นไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ

การวินิจฉัยแยกโรคทางคลินิก

ไข้ร่วมกับอาการที่ไม่บ่งเฉพาะ จำเป็นต้องแยกจากไข้หวัดใหญ่,ไข้จากการติดเชื้อไวรัส, ไข้ไม่ทราบสาเหตุ,ตับอักเสบ.ไข้ไทฟอยด์,มาลาเรีย,ไตอักเสบ,ไข้เลือดออก, สครับทัยฟัส และมิวรีนทัยฟัส ไข้ร่วมกับอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือสมองอักเสบ ต้องแยกโรคจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดที่เกิดจากแบคทีเรีย และ ไวรัสไข้สมองอักเสบ หรือโปลิโอ บางครั้งอาการทางคลินิกแยกยากจากการติดเชื้อเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากไวรัส การพบเลือดออกที่ตาหรือประวัติสัมผัสสัตว์อาจจะทำให้คิดถึงการติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่า การตรวจน้ำไขสันหลังและการส่งตรวจทางน้ำเหลืองจะสามารถแยกโรคได้

ไข้ร่วมกับอาการดีซ่าน ต้องแยกจากตับอักเสบจากเชื้อไวรัส มาลาเรีย หรือภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง โรคตับอักเสบจากไวรัสมักจะแยกยากที่สุดแต่การติดเชื้อเลปโตสไปรามักจะเริ่มเป็นไข้อย่างเฉียบพลัน ปวดศีรษะและปวดกล้ามเนื้อมาก เยื่อบุตาบวมแดง การตรวจพบไข่ขาวในปัสสาวะจะทำให้คิดถึงโรคเลปโตสไปโรซิสมากกว่า นอกจากนี้อาการไข้มักจะไม่พบหลังจากเหลืองแล้วในตับอักเสบจากไวรัส

ไข้ร่วมกับอาการเลือดออก ต้องแยกจากการติดเชื้อฮันตาไวรัส เนื่องจากลักษณะอาการทางคลินิก และระบาดวิทยาของโรคมีความคล้ายคลึงกันมาก อีกทั้งยังพบมีการติดเชื้อทั้งสองชนิด การแยกต้องอาศัยการส่งตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฮันตาไวรัส ซึ่งมีรายงานการตรวจพบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในโรคดังกล่าว (Appassakij H. 1995 : 340-343) นอกจากนี้ยังต้องแยกจาก ไข้เลือดออกเด็งกี่ อย่างไรก็ดีส่วนมากไข้เลือดออกเด็งกี่ส่วนใหญ่พบในเด็กและในภาวะที่ไข้ลดมักมีอาการช็อคตามมา

อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกได้แนะนำการวินิจฉัยโดยการกำหนดนิยามผู้ป่วยไว้ใน WHO Recommended Surveillence Standard, 1997 ซึ่งมีรายละเอียดคือ

ผู้ป่วยสงสัย (suspected case) ได้แก่ ผู้ที่มีอาการ ไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้ออ่อนเพลียมาก ร่วมกับอาการใดอาการหนึ่ง คือ ตาแดง เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปัสสาวะน้อย (หรือปัสสาวะไม่ออก) มีโปรตีนในปัสสาวะ ดีซ่าน เลือดออก (ที่ลำไส้ ปอด) การเต้นของหัวใจผิดปกติ (หรือหัวใจล้มเหลว) หรือผื่นที่ผิวหนัง และมีประวัติสัมผัสสัตว์หรือสิ่งปนเปื้อนปัสสาวะสัตว์

ผู้ป่วยยืนยัน (confirmed case) ได้แก่ ผู้ป่วยสงสัยที่ได้รับการยืนยันผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน

ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยโรค เลปโตสไปโรซิส

3. การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

กรณีผู้ป่วยมีอาการอย่างอ่อน การใช้การทดสอบทางห้องปฏิบัติการมาช่วยในการวินิจฉัยจะเป็นประโยชน์ต่อการดูแลรักษาผู้ป่วยและการพยากรณ์โรค และหากสามารถบอกชนิดของเชื้อ (serovars หรืออย่างน้อย serogroup) ได้ ก็จะช่วยในการป้องกันโรคในชุมชนได้อีกด้วย การตรวจทางห้องปฏิบัติการแบ่งเป็น 2 วิธี คือการตรวจหาตัวเชื้อ และ การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

3.1 การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจ ได้แก่

- การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่าง เช่น เลือด ปัสสาวะและน้ำไขสันหลังโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope) หรือย้อมสีด้วย giemsa หรือ silver stain การตรวจวิธีนี้มีข้อผิดพลาดสูง เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อเลปโตสไปรากับสิ่งปลอมปนอื่นๆ โดยเฉพาะในปัสสาวะ

- การเพาะแยกเชื้อ จากเลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง หรืออวัยวะต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษสำหรับเชื้อเลปโตสไปรา คือ EMJH medium (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสำคัญ เพราะสามารถแสดงเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้โดยตรงและควรทำควบคู่ไปกับการวินิจฉัยโดยวิธีอื่นๆ ด้วยทุกครั้ง

- การฉีดเข้าสัตว์ทดลอง โดยการนำเลือดผู้ป่วยหรือตะกอนปัสสาวะฉีดเข้าช่องท้องสัตว์ทดลองประเภทหนูแฮมสเตอร์หรือหนูตะเภาที่เพิ่งหย่านม สัตว์ทดลองจะป่วย ดูดน้ำในช่องท้องหรือเจาะเลือดสัตว์เพื่อตรวจดูเชื้อโดยตรงหรือนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าสัตว์ตายเอาชิ้นเนื้อจากตับและไตมาเพาะเชื้อ

- การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา โดยอาศัยเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหรือเทคนิคที่เรียกว่า PCR (polymerase chain reaction) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาเชื้อได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของโรค แต่เป็นวิธีที่อาศัยเทคนิคเฉพาะ ต้องการความชำนาญสูง และมีราคาแพง ส่วนใหญ่วิธีนี้ยังจำกัดอยู่เฉพาะการนำไปใช้ในงานวิจัยมากกว่าการนำไปใช้เพื่อวินิจฉัยโรค

3.2 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเลปโตสไปราในซีรัม ซึ่งเป็นการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

โดยปกติแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากเริ่มแสดงอาการไปแล้ว 1 สัปดาห์และมีระดับสูงสุดภายใน 4 สัปดาห์ ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีจึงควรตรวจจากซีรัมคู่ (paired sera) ที่เก็บห่างกันอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อหา four-fold rising titer หรือการเจาะเลือดครั้งเดียวแล้วดูระดับความแรงของแอนติบอดี (titer) เทียบกับค่าระดับความแรงแอนติบอดีที่มีนัยสำคัญ (significant titer) ซึ่งการตรวจหาแอนติบอดีมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีแบ่งเป็น

- การทดสอบที่เป็น **genus specific** ซึ่งเป็นการตรวจเพื่อคัดกรองว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไม่ โดยแอนติเจนที่ใช้มักเตรียมจากเชื้อ serovar หนึ่ง หรือจาก *L.biflexa* ซึ่งเป็นเชื้อไม่ก่อโรค เช่น indirect hemagglutination test (IHA), macroscopic slide agglutination test (MSAT), indirect fluorescent antibody technique(IFA), microcapsule agglutination test (MCAT), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น

- **การทดสอบซึ่งเป็น serogroup specific** ได้แก่ microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งสามารถบอก serogroup หรือ serovar ที่ก่อโรคได้ ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกถือเป็นวิธีมาตรฐานในการยืนยันการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

3.2.1 Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

หลักการ

ใช้เชื้อ Leptospira ทั้ง 26 ซีโรวาร์ (serovars) เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ในซีรัมของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) เมื่อดูด้วยกล้อง darkfield ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อเลปโตไปรา การตรวจทุกครั้งควรทำ positive และ negative control พร้อมกันไปด้วย วิธีนี้เป็นวิธีที่ยุ่งยากต้องใช้เชื้อหลายซีโรวาร์ และเป็น live antigen ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และดวงพร พูลสุขสมบัติ. 2544 : 45)

3.2.2 Indirect Hemagglutination Test (IHA)

หลักการ

นำแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรามาเคลือบบนเม็ดเลือดแดงคนกรุ๊ป "O" แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อในซีรัมของคน เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination)

ในกรณีที่ให้ผลบวก จะเจือจางซีรัมแบบ two-fold serial dilution โดยเริ่มจาก dilution 1:50 เพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงใน dilution สุดท้ายที่รายงานเป็นไตเตอร์ (titration procedure) วิธี IHA มี ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง เท่ากับ 83% ,97.5% และ92.7% ตามลำดับ จากงานวิจัยที่ได้ศึกษามาแล้วสรุปว่าวิธี IHA เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ตรวจวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมากได้ โดยสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการตรวจวินิจฉัย (สิริพรรณ แสงอรุณ. 2542 : 335-341)

3.2.3 วิธี Macroscopic Slide Agglutination Test (MSAT)

หลักการ

ใช้แอนติเจนความเข้มข้นสูงทำให้ตายด้วยความร้อนหรือฟอร์มาลิน (heat / formalin killed concentrated antigen)ผสมกับซีรัมบนสไลด์ ในปริมาณที่เท่าๆกัน ซีรัมที่ให้ผลบวกจะทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับแอนติเจนบนสไลด์ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่ำกว่า MAT และมักเกิดผลบวกปลอมได้ง่าย ถ้าหากขาดการควบคุมคุณภาพในการเตรียมแอนติเจนแต่เป็นวิธีที่เตรียมได้ง่าย ขั้นตอนสะดวกไม่ยุ่งยาก รวดเร็วและให้ผลการตรวจในระยะเริ่มแรกของโรคได้ดี (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และ ดวงพร พูลสุขสมบัติ. 2544 : 48)

3.2.4 วิธี Indirect Immunofluorescent Antibody (IFA)

หลักการ

แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อ ตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสง fluorescein labeled anti-human IgM หรือ IgG ดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

3.2.5 วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

หลักการ

เคลือบแอนติเจนของเชื้อ เลปโตสไปรา บนผิวด้านในของ ELISA plate เมื่อเติมซีรัมของผู้ป่วยที่ถูกทำให้เจือจางแล้วนำไป incubate แอนติบอดีที่จำเพาะจะจับกับแอนติเจนของเชื้อ จากนั้นเติม peroxidase conjugate anti-human IgG หรือ IgM แล้ววัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader (พิมพ์ใจ นัยโกวิท และ ดวงพร พูลสุขสมบัติ. 2544 : 49)

3.2.6 วิธี Immunochromatography (Lepto-Dipstick test)

หลักการ

เคลือบแอนติเจนของเชื้อ บนแผ่น cellulose ร่วมกับ antihuman lgM dye conjugate และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยเกิดสีชมพูมองเห็นได้ชัด (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

3.2.7 วิธี Microcapsule Agglutination Test (MCAT)

หลักการ

แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา ได้แก่ *L.autumnalis, L.hebdomadis, L.australis, L. canicola, L.icterohaemorrhagiae*, และ *L. pyrogenes* ที่ถูกเคลือบไว้บน microcapsule (MC) particle ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยเกิด passive agglutination reaction (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

ชุดตรวจสำเร็จสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส (Commercial test kits) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

ชุดตรวจสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา ที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในปัจจุบันมีหลายชนิดหลายวิธีการตรวจ และหลายประเทศผู้ผลิต ซึ่งฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการทดสอบและประเมินผลการนำมาใช้กับตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศไทยแล้ว มีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์น้ำยาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย

ชื่อผลิตภัณฑ์	บริษัท ผู้ผลิต/ประเทศ	ระยะเวลาในการตรวจ	ราคาต่อหน่วยทดสอบ	บริษัทผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์
H.S. Leptospira Antigen (MSAT)	Sanofi/France	4 นาที	40 บาท	ซาโนฟี ไทยแลนด์
Leptospirosis IHA	MRL Diagnostics/USA	2 ชั่วโมง	200 บาท	บ. วอร์ดเมดิก
IgG/IgM LEPTOELISA	-	2-3 ชั่วโมง	160 บาท	บ.ไทยแคนไบโอเทค
Leptospira IgM ELISA	Panbio/Australia	2-3 ชั่วโมง	180 บาท	บ. ไวเกอร์ซายน์
Dip-Stick Leptospira	Integrated Diagnostics/USA	½-1 ชั่วโมง	200 บาท	-
Lepto Dipstick	Organon/Belgium	3 ชั่วโมง	110 บาท	บ. ออกานอน ไทยแลนด์

(พิมพ์ใจ นัยโกวิทและ ดวงพร พูลสุขสมบัติ. 2544 : 56)

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการตรวจและการเปรียบเทียบวิธีการตรวจพบว่า ในปี พ.ศ. 2541 วินิตา บริราช และคณะ (วินิตา บริราช. 2541 : 57-65) ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IFA เทียบกับวิธี MAT โดยแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส 54 ราย ซึ่งพบว่าให้ผลบวกทั้งโดยวิธี IFA และ MAT กลุ่มผู้สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส 103 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่กลุ่มที่เป็นไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ 52 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบบี 51 ราย พบว่าให้ผลบวกว่ามีแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา 22 ราย และ 14 ราย ตามลำดับด้วยวิธี IFA ซึ่งให้ผลบวกมากกว่าMAT 5 รายทั้ง 2 กลุ่ม และกลุ่มคนปกติ 100 ราย ให้ผลบวกโดยวิธี IFA 10 ราย ให้ผลบวกโดยวิธี MAT 6 ราย พบว่าวิธี IFA และ MAT ให้ผลใกล้เคียงกัน โดยวิธี IFA ให้ความไว 100% ความจำเพาะ 90% และความถูกต้อง 94% ส่วนวิธี MAT ให้ค่าความไว 100% ความจำเพาะ 94% และความถูกต้อง 96% จากการศึกษาพบว่าวิธี IFA เป็นวิธีที่มีความไว วิธีการทำไม่ยุ่งยาก เหมาะสำหรับการตรวจกรองโรคเลปโตสไปโรซิส แต่วิธี MAT เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจยืนยันเพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรค เพราะสามารถตรวจได้ว่าเกิดจาก serotype ใด

ในปี ค.ศ.1992 คณะวิจัยของ Silva MV จากประเทศบราซิล (Silva MV. 1992 : 560-561) นำ paired saliva และ paired sera ของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส 40 ตัวอย่าง มาทำการตรวจหา IgM antibody โดยวิธี ELISA พบว่าน้ำลายให้ผลบวก 87.5% ส่วนซีรัมให้ผลบวก 100% จากการศึกษาถือว่าคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จอย่างมาก เพราะพบว่าสามารถใช้น้ำลายในการตรวจหาแอนติบอดีได้อีกทางหนึ่ง

ในปี ค.ศ.1995 คณะวิจัยของ Appassakij H และคณะ (Appassakij H. 1995 : 340-3) ได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA เทียบกับวิธี microscopic agglutination test (MAT) โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกน่าสงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส 175 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อตรวจซีรัมที่ได้จากผู้ป่วยในระยะเริ่มมีอาการ (acute phase) ด้วยวิธี IFA ซีรัมที่ให้ค่าไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 1:100 จะให้ค่าความจำเพาะ 97% และความไว 48% ซึ่งสูงกว่าวิธี MAT ที่มีความไวเพียง 17% และกลุ่มควบคุมซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี MAT 117 ตัวอย่าง ผู้บริจาคเลือดที่มีสุขภาพดี 101 ตัวอย่าง และผู้ป่วยโรคอื่น 5 โรคที่มีอาการใกล้เคียงกับโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 93 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีตัวอย่างใดให้ค่าไตเตอร์โดยวิธี IFA มากกว่าหรือเท่ากับ 1:400 แต่พบปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับโรคซิฟิลิส ในการตรวจน้ำเหลืองของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสระยะต่างๆ พบว่า แอนติบอดีที่ตรวจโดยวิธี IFA สามารถพบได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการป่วย และมีระดับสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 ของการป่วย โดยทั่วไปค่าไตเตอร์จะลดลงต่ำกว่า 1:400

หลังจาก สี่เดือน ผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าวิธี IFA มีความไวและความจำเพาะปานกลาง และน่าจะนำมาใช้แทนวิธี MAT ซึ่งมีความไวน้อยกว่าในการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นเพื่อการรักษาที่ทันท่วงที

ต่อมาในปี ค.ศ.1997 Silva MV และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธี dot–ELISA เพื่อตรวจหา IgM, IgA และ IgG โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 63 ราย พบว่าซีรัมที่เก็บในระยะที่เริ่มมีอาการของโรค (ประมาณ 7 วัน) เมื่อทำการตรวจหา IgM antibody พบว่ามีความไวเท่ากับ 98% ส่วน IgG เท่ากับ 70% และ IgA เป็น 76% ส่วนซีรัมที่ทำการเก็บในระยะหลังของการเป็นโรค (หลังจากเป็นโรคแล้ว 6 เดือน) พบว่าระดับของ IgM ยังคงสูงอยู่ แต่หลังจากนั้น 10 เดือนพบว่าความไวของ IgM ลดลงเหลือ 57% IgG ยังคงตรวจพบได้หลังจากโรค 4 เดือนจนถึงระยะสุดท้ายของการติดตามโรค ส่วน IgA สามารถตรวจพบได้ในคนไข้ทุกคนตั้งแต่ 1 เดือน จนถึง 6 เดือนของโรค จากการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยพบว่า วิธี dot–ELISA เหมาะเป็นการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการ และวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการตรวจหา IgM antibody มีข้อดี คือ ให้ผลชัดเจน รวดเร็ว และราคาไม่แพง อย่างไรก็ตามพบว่า การอ่านผลของวิธี dot ELISA เป็นลักษณะของ subjective คือไม่มีค่า cut off เป็นจุดตัดสิน แต่อาศัยการอ่านสีจากสายตา ซึ่งมีปัญหาในการอ่านผลสำหรับกลุ่มที่ผลการตรวจเป็นบวกอ่อนๆ (Silva MV. 1997 : 650-655)

ในปี ค.ศ. 1998 คณะวิจัยของ Suputtamongkol Y (Suputtamongkol Y. 1998: 797-801) ได้ทดสอบวิธี MCAT โดยใช้ซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่ได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธี MAT หรือ IFA ทั้งหมด 82 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 90.2% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 96.3% วิธี MCAT นี้มีข้อดี คือ ทำได้ง่ายไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญงาน เหมาะสำหรับตรวจคัดกรอง อ่านผลได้ภายใน 3 ชั่วโมง ต่อมาในปี ค.ศ.1999 คณะวิจัยของ Ramadass P (Ramadass P. 1999 : 137-140) ได้ทดลองหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี latex agglutination เทียบกับวิธี ELISA เพื่อใช้ในการตรวจกรองโรค ในการทดลองนี้ใช้ซีรัมของคน 276 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกโดยวิธี LA 84.8% และให้ผลบวกโดยวิธี ELISA 85.9% และซีรัมสัตว์ 65 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกโดยวิธี LA 63.1% และให้ผลบวกโดยวิธี ELISA 69.2% พบว่าวิธี ELISA มีค่าความไวสูงกว่าวิธี LA เล็กน้อย การศึกษาของคณะผู้ทำวิจัยในครั้งนี้นับว่าประสบความสำเร็จเพราะวิธี LA เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง เหมาะแก่การนำไปตรวจกรองโรคนี้

ในปี ค.ศ. 2000 คณะวิจัยของ Wagenaar J (Wagenaar J. 2000 : 316-320) ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้ศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธี IFA เทียบกับวิธี PCR โดยหาแอนติบอดีต่อ *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo ในปัสสาวะหมู และเปรียบเทียบผลของวิธี PCR กับผลของวิธี IFA, วิธี nucleic acid hybridization และวิธี bacteriologic culture ผลการทดลอง

พบว่าวิธี PCR ให้ค่าความจำเพาะเป็น 100% ค่าความไว 91% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ค่าความไวของวิธี nucleic acid hybridization 55% ในทางตรงกันข้าม ค่าความไวของวิธี bacteriologic culture 83% และวิธี IFA 93% จากการศึกษานี้พบว่าวิธี PCR และ IFA มีความไวสูงในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

ในปีเดียวกัน Hatta M และคณะ (Hatta M. 2000 : 515-520) ศึกษาการใช้ Lepto-dipstick specific IgM ทำการทดลองโดยใช้ผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลทั้งหมด 403 ราย ที่มีอาการไข้ และมีผู้ป่วยที่มีอาการไข้และอาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซิส 35 ราย และเมื่อทำการตรวจยืนยันโดยวิธี MAT แล้วพบว่ามี 24 ราย ที่ให้ผลบวกตรงกัน และมีอีก 8 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT หรือ Dipstick เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความไวได้เท่ากับ 91.6% และค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 93.6% สำหรับวิธีดังกล่าวพบว่ามีข้อดี คือ เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว แถบสีที่เกิดขึ้นชัดเจน อ่านผลได้ง่าย เหมาะสำหรับตรวจผู้ที่อยู่ในแหล่งระบาดของโรค แต่มีข้อจำกัดคือราคาที่ค่อนข้างสูงต่อหน่วยทดสอบ ในขณะที่ Smits HL และคณะ (Smits HL. 2000 : 1272-1275)ได้ทำการทดลองน้ำยา latex agglutination ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในการหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา โดยใช้ซีรัมกับน้ำยาในปริมาณที่เท่าๆ กัน สามารถอ่านผลได้ใน 2 นาที โดยใช้ซีรัมจากประเทศฮาวาย, ประเทศไทย และประเทศเนเธอแลนด์ พบว่ามีค่าความไวเท่ากับ 82.3% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 94.6% พบว่าวิธีนี้เหมาะสำหรับการตรวจในการใช้เป็นการตรวจกรองโรค

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ที่ไม่ใช่การตรวจพบทางซีโรโลยี (วราลักษณ์ ตังคณะกุล. 2544 : 28)

1. ในรายที่ไม่มีเลือดออก จำนวนเม็ดเลือดแดง และระดับฮีโมโกลบินจะปกติ
2. ผู้ป่วยที่มีอาการเหลือง จำนวนเม็ดเลือดขาวจะอยู่ระหว่าง 11,000-20,000/mm^3
3. จำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่า 100,000/mm^3
4. ESR เพิ่มขึ้น
5. ค่า BUN และ Creatinine เพิ่มขึ้นแม้ผู้ป่วยจะมีอาการไม่รุนแรง
6. ระดับ bilirubin, serum glutamic pyruvic transminase (SGPT) มักปกติหรือสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย(เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยแยกจากโรคตับอักเสบ ซึ่งมักจะพบระดับ SGPT สูงขึ้นชัดเจนมาก)
7. พบไข่ขาวในปัสสาวะในทุกระยะของโรค นอกจากนี้ยังอาจตรวจพบ pyruvic, hematuria, hyaline casts, granular casts แต่ไม่พบ red cell casts อาจตรวจพบน้ำดีในปัสสาวะ

8.ในผู้ป่วยที่มีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบจะพบเม็ดเลือดขาวในน้ำไขสันหลังโดยเฉพาะ lymphocytes ระดับโปรตีนในน้ำไขสันหลังเพิ่มขึ้น (1.0-2.0 g/l) ระดับน้ำตาลปกติ

การป้องกันและควบคุมโรค

เนื่องจากการติดต่อจากคนสู่คนไม่มี จึงไม่จำเป็นต้องแยกผู้ป่วยและกักกันผู้สัมผัสโรค การกวาดล้างเชื้อนี้ทำได้ยาก ทั้งนี้เพราะมีสัตว์เลี้ยงต่างๆ และสัตว์ป่าเป็นรังโรคอยู่ การป้องกันไม่ให้คนได้รับเชื้อนี้ ควรคำนึงถึงการให้การสุขศึกษา โดยเฉพาะในกลุ่มบุคคลที่มีอาชีพเสี่ยงต่อการเป็นโรค ให้รู้ถึงสาเหตุ แหล่งของตัวเชื้อ เช่น แนะนำให้ผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับการลุยน้ำ ล้างท่อระบายน้ำ ให้สวมรองเท้าบู๊ตยางชนิดยาว หรือการกระตุ้นให้คนสวมรองเท้า แนะนำให้ปกปิดอาหาร น้ำดื่ม ให้มิดชิดอย่าให้สัมผัสปัสสาวะสัตว์ที่เป็นพาหะ

การกำจัดหนู สุนัขจรจัด ซึ่งเป็นพาหะและกักตุนโรคที่สำคัญให้หมดนั้น ทางปฏิบัติเป็นไปได้ยาก แต่สามารถกระตุ้นให้คนรักษาความสะอาดบ้านเรือน อย่าให้สกปรกเป็นที่แพร่พันธุ์ของหนูเพิ่มมากขึ้น

สัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข โค กระบือ และสุกร ควรให้วัคซีนป้องกันโรคนี้ทุกปี หากสงสัยควรปรึกษาสัตวแพทย์ สำหรับในคนไม่นิยมใช้วัคซีน แต่เคยมีการใช้วัคซีนในประเทศญี่ปุ่นสำหรับคนที่ทำงานในเหมือง

การรักษา

การรักษาแบ่งเป็น 2 อย่าง คือ

1. การรักษาตามอาการ
2. การรักษาจำเพาะ

การรักษาตามอาการ

ในรายที่มีอาการไข้เฉียบพลันโดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนหรือการตรวจพบอาการดังกล่าวข้างต้นจะรักษาตามอาการ ได้แก่ การให้ยาลดไข้ เป็นต้น ส่วนในรายที่มีอาการรุนแรงหรือมีการตรวจพบอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งบ่งชี้ว่าอาจมีการดำเนินโรคที่รุนแรงต่อไปได้ ควรรับการรักษาในโรงพยาบาลเพื่อเฝ้าระวังอาการอย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะการวัดความดันโลหิตและการตรวจปัสสาวะบ่อยๆ ในระยะแรก ถ้าพบว่ามีอาการแสดงของการขาดน้ำ เช่น ความดันโลหิตต่ำ หรือปัสสาวะออกน้อย หรือเริ่มมีความผิดปกติของการทำงานของไต ควรให้สารน้ำอย่างพอเพียงร่วมกับยาที่ขยายหลอดเลือดไต หรือยาขับปัสสาวะถ้าจำเป็น แล้วติดตามวัดปริมาณปัสสาวะเพื่อประเมินผลการรักษา ต้องระวังการให้สารน้ำมากเกินไปด้วยในรายที่ปัสสาวะออกน้อย การรักษา

ตามอาการอื่นๆ ขึ้นกับภาวะแทรกซ้อนที่พบ ผู้ป่วยที่มีภาวะไตวายหรือเลือดออกผิดปกติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าผู้ป่วยเริ่มหรือมีอาการไอเป็นเลือดร่วมด้วยควรรับไว้รักษาในห้องอภิบาล เนื่องจากอัตราตายสูงมาก ต้องได้รับการใส่เครื่องช่วยหายใจอย่างทันท่วงทีและเตรียมการรักษาภาวะ Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) เมื่อเริ่มพบ มีภาวะการหายใจล้มเหลว มีรายงานการรักษาผู้ป่วยด้วยการใช้ก๊าซไนตริกออกไซด์ทางการหายใจร่วมกับการทำ hemofiltration ในผู้ป่วย 1 รายที่มีอาการไอเป็นเลือดปริมาณมากร่วมกับภาวะ ARDS ว่าสามารถทำให้ผู้ป่วยรอดชีวิตได้ อย่างไรก็ตามยังต้องรอผลการศึกษายืนยันประสิทธิภาพของการรักษาโดยวิธีดังกล่าวต่อไป ในรายที่มีภาวะไตวายควรเฝ้าระวังเฝ้าระวังด้วยการทำ hemodialysis หรือ peritoneal dialysis อย่างรวดเร็วในรายที่ปัสสาวะเริ่มออกน้อย เป็นต้น ไม่มีหลักฐานว่าการให้เกล็ดเลือดทดแทนในรายที่มีเกล็ดเลือดต่ำจะป้องกันภาวะเลือดออกผิดปกติได้ จึงควรพิจารณาให้เฉพาะรายที่มีปัญหาเลือดออกผิดปกติเท่านั้น การรักษาเหล่านี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากเท่ากับการให้ยาต้านจุลชีพ

การรักษาจำเพาะ

1. Leptospiral antiserum จะทำลายเชื้อในเลือดได้ถ้าใช้ในระยะที่มีเชื้อเลปโตสไปราในเลือด (leptospiraemia) คือระยะ 5 วันแรกของไข้ แต่ไม่ทำให้อาการทั่วไปดีขึ้นแต่อย่างใดเพียงแต่ลดการมีเลือดออกเท่านั้น ขนาดที่ใช้ 20–40 มล. ทางหลอดเลือดดำหรือเข้ากล้ามเนื้อ แต่ปัจจุบันวิธีรักษาแบบนี้ไม่มีผู้ใช้แล้ว

2. ยาปฏิชีวนะ ได้ผลในระยะต้นของโรคเท่านั้น บางแห่งกล่าวว่าจะได้ผลต้องให้เมื่อเป็นโรคนี้นานไม่เกิน 48 ชั่วโมง บางแห่งให้ระยะเวลานาน 2–5 วัน ยิ่งเร็วเท่าใดก็ยิ่งมีผลดี ไข้จะลดลงใน 24–48 ชั่วโมง และป้องกันภาวะแทรกซ้อนได้ ถ้าเป็นนานเกิน 5 วันแล้วจะไม่ได้ผลเลย ดังนั้นผู้ป่วยที่เป็นไข้มาเกิน 5 วัน ไม่ต้องให้ยา

ยาปฏิชีวนะที่นิยมให้ คือ penicillin สำหรับชนิดอื่นก็ใช้ได้ ยกเว้น chloramphenical ซึ่งได้ผลน้อย ขนาดที่ใช้ สำหรับ penicillin ใช้อย่างน้อยวันละ 2 ล้านหน่วย ในรายที่เริ่มรักษาหลังวันที่ 3 ของโรค หรือคนไข้อาการหนักควรให้ยาขนาดสูง อาจให้ 4–6 ล้านหน่วย ให้นานอย่างน้อยที่สุด 7 วัน สำหรับ tetracyclineใช้ 2 กรัม/วัน นาน 7 วัน นอกจากนี้มีผู้ทดลองใช้ streptomycin ฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 1 กรัม นาน 7 วันก็ได้ผลเช่นกัน แต่เนื่องจากผู้ป่วยโรคนี้มักจะมีภาวะไตวายร่วมด้วย จึงมีการใช้ streptomycin กันน้อย

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. เชื้อเลปโตสไปรา

เชื้อที่นำมาใช้เตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับทดสอบคือเชื้อ *Leptospira interrogans serovar bratislarva* ซึ่งในประเทศไทยพบว่าเป็นซีโรวาร์ที่มีการระบาดมากอยู่ใน 3 อันดับต้น (สุกัญญา ดีประดิษฐ์, 2545) โดยได้เชื้อนี้มาจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก จ. พิษณุโลก

2. ตัวอย่างซีรัม

ตัวอย่างซีรัมทดสอบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 205 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

2.1 กลุ่มตัวอย่าง (case) คือสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งผ่านการตรวจยืนยันผลจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารสหรัฐอเมริกาประจำประเทศไทย (AFRIM) จำนวน 65 ตัวอย่าง

2.2 กลุ่มควบคุม 1 (control 1) คือสิ่งส่งตรวจจากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีอาการของโรค จำนวน 40 ตัวอย่าง

2.3 กลุ่มควบคุม 2 (control 2) คือสิ่งส่งตรวจจากผู้ที่มีสุขภาพดี และไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด รวมทั้งไม่มีประวัติของการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสมาก่อน จำนวน 50 ตัวอย่าง

2.4 กลุ่มควบคุม 3 (control 3) คือ สิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวกต่อการตรวจในโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคเลปโตสไปโรซิส เช่น โรคมะเร็งตับ (AFP-positive) โรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเอง (rheumatoid factor, ANA –positive) โรคไข้เลือดออก เป็นต้น จำนวน 50 ตัวอย่าง

รวมตัวอย่างส่งตรวจทั้ง 4 กลุ่ม เป็นจำนวนทั้งสิ้น 205 ตัวอย่างโดยสิ่งส่งตรวจทั้ง 4 กลุ่ม ได้มาจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารสหรัฐอเมริกาประจำประเทศไทย (AFRIM) และ บริษัทศูนย์แล็บธนบุรีจำกัด เป็นต้น เพื่อคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ ค่าคาดหวังผลบวก ค่าคาดหวังผลลบ และ ประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ

การคำนวณกลุ่มตัวอย่างได้จากสูตรการคำนวณ (อมร ลีลารัศมี, 2532 : 31-50) ดังนี้

$$N = \frac{(15.4)P(1-P)}{(R-L)^2}$$

โดยที่ N = จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ เป็น case หรือ control

R = ค่าคาดหวังสูงสุดของความไวของวิธี IFA = 100% = 1.00

ค่าคาดหวังสูงสุดของความจำเพาะของวิธี IFA = 97% = 0.97

L = ค่าคาดหวังต่ำสุดของความไวของวิธี IFA = 84% = 0.84

ค่าคาดหวังต่ำสุดของความจำเพาะของวิธี IFA = 90% = 0.90

P = ค่าเฉลี่ยความไวของวิธีทดสอบ โดยวิธี IFA = 92% = 0.92

ค่าเฉลี่ยความจำเพาะของวิธีทดสอบ โดยวิธี IFA = 96% = 0.96

โดยการคำนวณหาค่าจำนวน case control จะใช้ค่าความจำเพาะ จากรายงานการวิจัย (Appassakij. 1995 : 340-343) ได้จำนวนตัวอย่างดังนี้

$$\text{กลุ่ม case} = \frac{(15.4)(0.92)(0.08)}{(1-0.84)^2} = 45 \text{ ตัวอย่าง}$$

$$\text{กลุ่ม control} = \frac{(15.4)(0.96)(0.04)}{(0.97-0.9)^2} = 118 \text{ ตัวอย่าง}$$

3. วิธีการทดสอบ

3.1 Microscopic Agglutination Test (MAT)

หลักการ

ใช้เชื้อเลปโตสไปรา ทั้ง 26 ซีโรวาร์ (serovars) เป็นแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ในซีรัมของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส เกิดปฏิกิริยาการรวมกลุ่ม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

วิธีการทดสอบ

เจือจางซีรัมแบบ two-fold dilution จาก 1:100 ถึง 1 : 1,600 ในไมโครเพลท ใส่แอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปรา 12 ชนิด คือ *L. australis*, *L. autumnalis*, *L. bataviae*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis*, *L. hyos*, *L. icterohemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. javanica*, *L. pyogenes* และ *L. wolffi* แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-4 ชั่วโมง นำมาอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด

การแปลผล

ผลบวกจะเกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา

ผลลบไม่เกิดการรวมกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา

ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อแอนติเจนของกลุ่มเชื้อซีโรวาร์ใดไตเตอร์สูงสุดให้ถือว่าเกิดจากเชื้อในกลุ่มซีโรวาร์นั้น

3.2 Latex Agglutination Test (LAT)

หลักการ

เม็ดลาเทกซ์ที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira interrogans serovar pyrogenes* นำไปทดสอบกับซีรัมผู้ป่วย อ่านผลปฏิกิริยาการรวมกลุ่มของเม็ดลาเทกซ์ที่เกิดขึ้นบนสไลด์สีดำ

วิธีการทดสอบ

1. หยดน้ำยาลาเทกซ์ ลงบนสไลด์ 1 หยด
2. หยดซีรัม 1 หยด ลงผสมกับน้ำยา
3. ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำยาและซีรัมให้เข้ากันดี อ่านผลปฏิกิริยาภายใน 2-5 นาที

การแปลผล

ผลบวกจะเกิดการรวมกลุ่มของเม็ดลาเทกซ์ที่เคลือบด้วยเชื้อเลปโตสไปรา

ผลลบ ไม่เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดลาเทกซ์ที่เคลือบด้วยเชื้อเลปโตสไปรา

3.3 Indirect Immunofluorescence

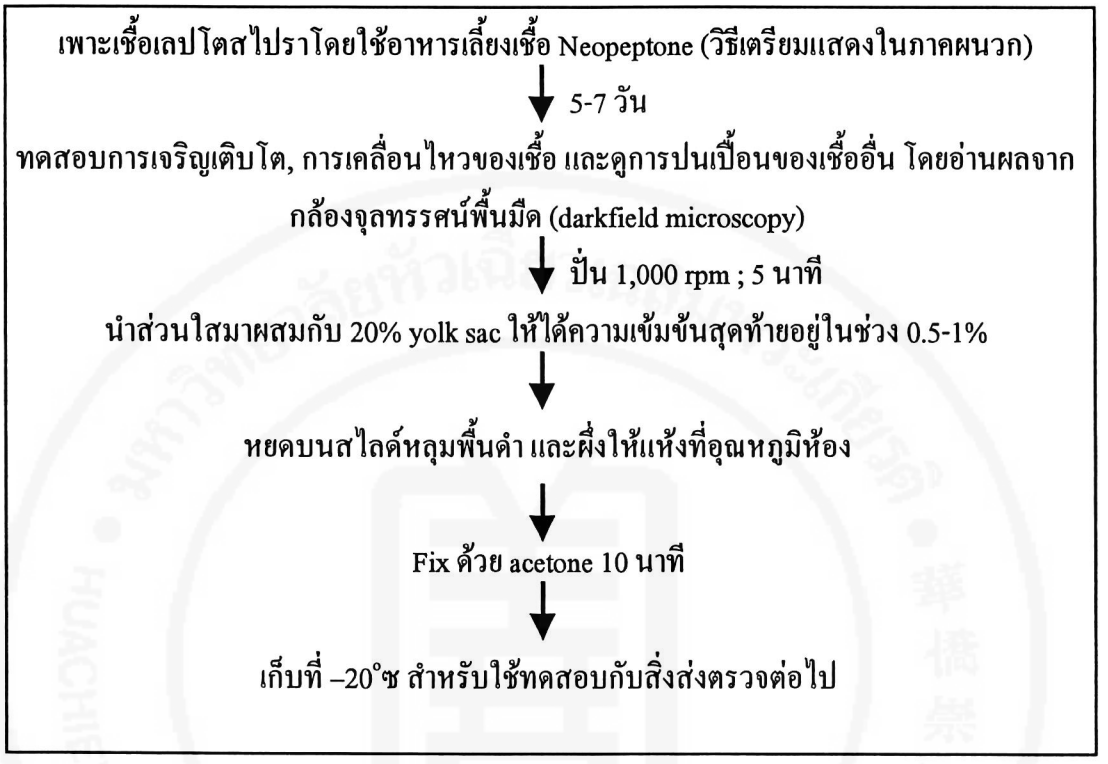
หลักการ

แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยจะทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อ *Leptospira interrogans serovar bratislarva* ตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสง fluorescein labeled anti-human IgM, IgG, IgA, kappa และ lambda นำมาดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง กรณีผลบวกจะพบการเรืองแสงสีเขียวเป็นรูปตัวเชื้อบนพื้นสีดำ

การเตรียมแอนติเจนสำหรับทดสอบ

การเพาะเชื้อ *Leptospira interrogans serovar bratislarva* เพื่อนำมาเตรียมเป็นแอนติเจนสำหรับเคลือบบนสไลด์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1

แผนภูมิที่ 1 การเตรียม Leptospira antigen สำหรับเคลือบบนสไลด์ทดสอบ



4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี indirect immunofluorescence

เนื่องจากวิธีการทดสอบมีหลายขั้นตอน โดยอ้างอิงวิธีการของ Terpstra WJ (Terpstra WJ. 1985 : 377-385) และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ซึ่งใช้วิธีการของ Myers DM (Myers DM. 1985 : 9-10) การปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในด้านต่างๆ จะใช้ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกและให้ผลลบจากการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน อย่างละ 5 ตัวอย่าง นำมาศึกษาความเหมาะสมในด้านต่างๆซึ่งประกอบด้วย

4.1 การปรับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกต

ผู้วิจัยใช้ anti human IgG, IgM, IgA, kappa, lambda conjugated FITC (DAKO, Denmark) ที่ปรับระดับความเข้มข้นเป็น 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 และ 1:160 โดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) เป็นตัวทำละลาย ระดับความเข้มข้นเริ่มต้นอ้างอิงจากวิธีการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก โดยใช้คอนจูเกต 10 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมทดสอบ

4.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

ผู้วิจัยปรับระยะเวลาในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกตโดยอ้างอิงจากระยะเวลาในการ incubate คอนจูเกต ของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกซึ่งใช้เวลา 30 นาที นำมาปรับเป็น 15, 30, 45 และ 60 นาที

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอน 4.1 และ 4.2 แล้ว นำสภาวะดังกล่าวมาทดสอบความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในการ incubate ระหว่างอุณหภูมิห้องปกติ และอุณหภูมิ 37 ^{o}ซ

ตัวอย่างซีรัมที่ใช้ในการทดสอบจะนำมาเจือจางแบบ two-fold dilution โดยเริ่มต้นจาก 1:100 จนถึง 1:1,600 ตามวิธีการทำของวิธีดังกล่าวในห้องปฏิบัติการทั่วไป

สำหรับระดับความเข้มข้นของแอนติเจนไม่ได้ปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากการเพาะเชื้อและเตรียมแอนติเจนจะดำเนินการที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ส่วนการวิจัยในส่วนอื่นทำที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

5. ความไวและความจำเพาะของวิธี IFA

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี IFA โดยใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกและผลลบชัดเจนจากวิธีมาตรฐานแล้ว นำวิธีดังกล่าวที่ได้มาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย (case) และตัวอย่างซีรัมปกติ, ตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยโรคอื่น และตัวอย่างซีรัมของผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค จำนวน 170 ตัวอย่าง เพื่อคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบ (efficiency) ดังกล่าว

6. การทดสอบระยะเวลาในการเก็บซีรัมบนกระดาษกรอง

นำซีรัมที่ให้ผลบวกโดยวิธี IFA ทุกตัวอย่างมา 10 ไมโครลิตร แล้วหยดบนกระดาษซับขนาด 1x2 นิ้ว จำนวน 5 แผ่น/ตัวอย่าง ทิ้งให้แห้ง แล้วเก็บกระดาษกรองไว้ 0, 4, 7, 14 และ 21 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลานำกระดาษกรองมาชะซีรัมออก 1 แผ่น โดยใช้บัฟเฟอร์ปริมาตร 990 ไมโครลิตรซึ่งจะ เทียบเท่ากับ ระดับความเจือจาง 1:100 นำมาอุ่นที่ 56^{o}ซ เป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำมาเจือจางจนถึงระดับ 1:1,600 ทดสอบดูความแตกต่างของแต่ละระดับความเจือจางในวันต่างๆกันเปรียบเทียบกับผลของซีรัมสดที่ตรวจด้วยวิธี indirect immunofluorescence เช่นเดียวกัน

7. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS for Windows version 9.01

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ สถิติวิจัยเชิงพรรณนา และ สถิติเชิงวิเคราะห์ ได้แก่ สถิติไคสแควร์, สถิติแคปปา (Kappa analysis) และสถิติ Wilcoxon Signed Ranks (ดุสิต สุจิรารัตน์. 2542 : 9)

8. วัสดุอุปกรณ์

1. ตู้อบปรับตั้งอุณหภูมิที่ 37° ซ
2. กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์
3. ตู้เย็น
4. ตู้แช่แข็ง
5. Vortex mixer
6. Autopipette 10–100 µl และ 100–1000 µl
7. อ่างน้ำ ปรับตั้งอุณหภูมิที่ 56°ซ
8. หลอดทดลองขนาด 12x75 มม.
9. ที่วางหลอดทดลอง (rack)
10. ถุงมือยาง
11. Coplin jar
12. กล่องพลาสติกเก็บความชื้น (moist chamber)
13. เสื้อกาวน์
14. กระดาษซับปูพื้นบริเวณปฏิบัติการ
15. Cover slip ขนาด 22x50 มม.
16. กระดาษกรอง Whatman No.1 ตัดให้มีขนาด 0.5 x 2.0 ซม.
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
18. ที่คีบ (forcep)
19. ถุงพลาสติกใส
20. กระดาษกาว
21. นาฬิกาจับเวลา
22. กรรไกร
23. เชื้อ *Leptospira interrogans* serovar bratislarva

9. น้ำยาและสารเคมี

1. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2–7.4
2. Liquid media (Neopeptone)
3. 20 % yolk sac
4. Anti human IgG, IgA, IgM conjugated FITC
5. Glycerine buffer
6. Leptospiral coated slide

บทที่ 4
ผลการวิจัย

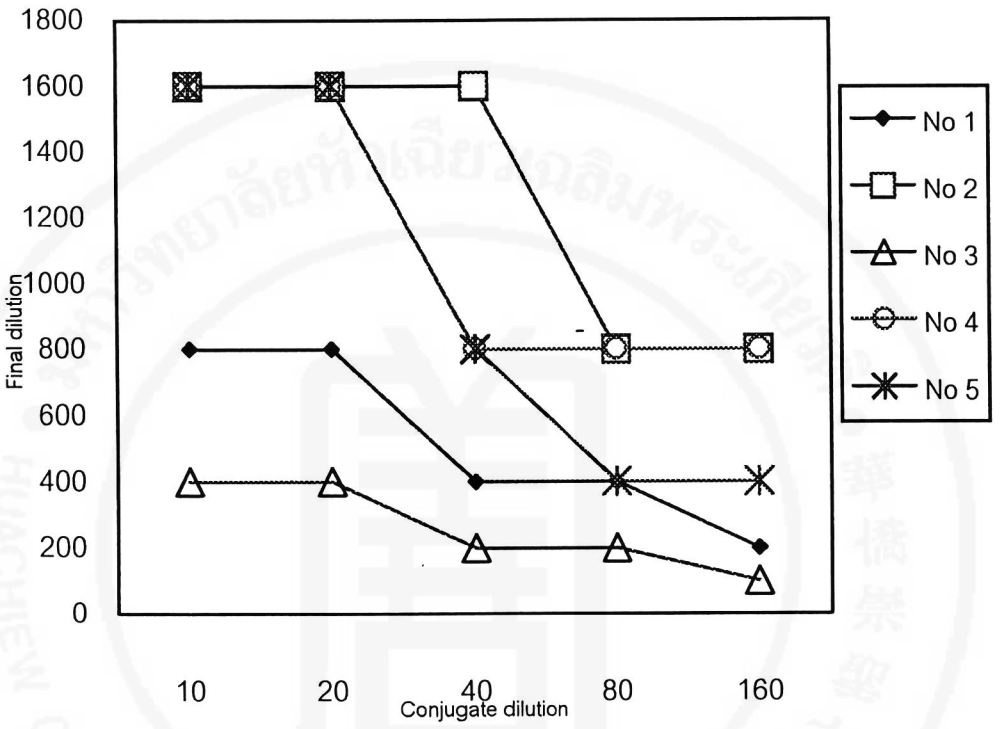
1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี indirect immunofluorescence

ตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ได้จากซีรัมผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหารสหรัฐอเมริกาประจำประเทศไทย จำนวน 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างซีรัมของนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ที่มีสุขภาพดี จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่นำมาทดสอบด้วยวิธี latex agglutination test (LAT) และตรวจยืนยันผลด้วยวิธี microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานแล้วพบว่าในกลุ่มผู้ป่วยทั้ง 5 รายให้ผลบวกทั้งสองวิธี ส่วนกลุ่มควบคุมให้ผลลบกับทั้งสองวิธีเช่นกัน

1.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกต

คอนจูเกตที่ใช้ในการศึกษานี้คือ rabbit anti-human IgG, IgA, IgM FITC conjugated การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกต ทำโดยนำตัวอย่างทั้งที่ให้ผลบวกและลบมาทดสอบด้วยวิธี IFA ตัวอย่างผลบวกทำการเจือจางซีรัมเป็น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600 ทดสอบโดยอ้างอิงวิธีการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกซึ่งใช้ระยะเวลาในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต 1 ชั่วโมงที่ 37^{o}ซ และปรับระดับความเข้มข้นของคอนจูเกต เป็น 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 และ 1:160 ให้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 2

แผนภูมิที่ 2 ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อใช้คอนจูเกตที่ความเข้มข้นต่างๆ

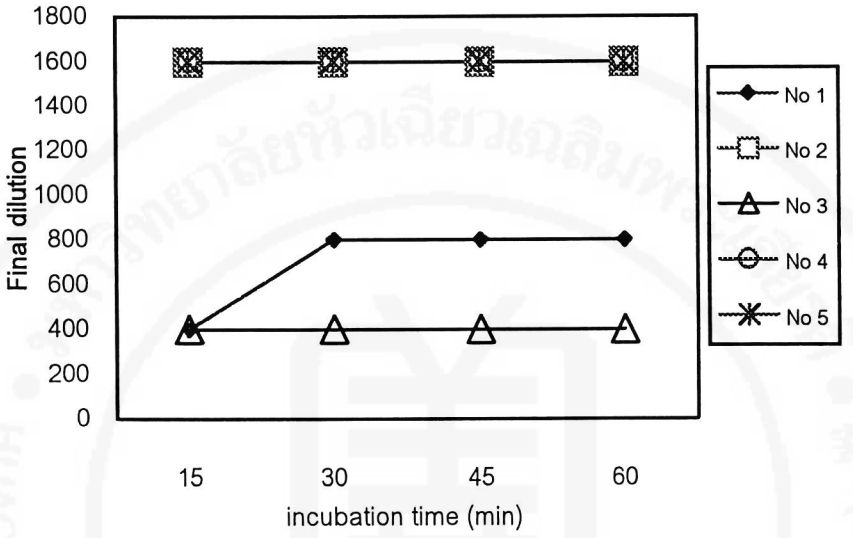


จากแผนภูมิที่ 2 จะเห็นว่า ระดับความเข้มข้นของคอนจูเกตที่ 1:20 เป็นระดับความเจือจางสุดท้ายที่ให้ค่าไตเตอร์สูงสุด สำหรับการทดสอบในตัวอย่างที่ 1, 3, 4 และ 5 แต่ในตัวอย่างที่ 2 พบว่าระดับความเจือจางสุดท้ายให้ค่าไตเตอร์สูงสุดเป็น 1:40 ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอนจูเกต ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ 1:20 ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอมในสิ่งส่งตรวจที่มีแอนติบอดีในระดับต่ำ

1.2 ระยะเวลาที่ใช้ในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการ incubate ทำโดยนำตัวอย่างทั้งที่ให้ผลบวกและลบมาทดสอบด้วยวิธี IFA ตัวอย่างผลบวกทำการเจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600 ทดสอบโดยใช้วิธีการตรวจของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก และระดับความเข้มข้นของคอนจูเกต ที่ 1:20 ใช้เวลาในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต เป็น 15, 30, 45 หรือ 60 นาที ให้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 3

แผนภูมิที่ 3 ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อ incubate ที่เวลาต่างกัน



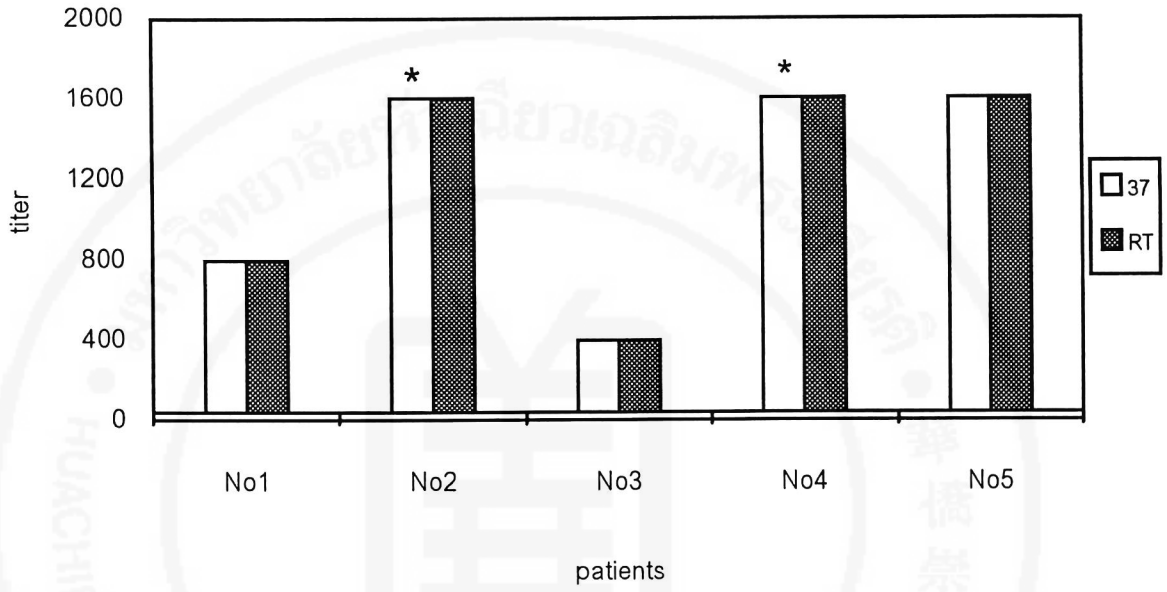
จากแผนภูมิที่ 3 จะเห็นว่าที่ระยะเวลาในการ incubate 30 นาที ตัวอย่างที่ 1 ให้ค่าระดับความเจือจางสุดท้ายที่เป็นผลบวกไม่แตกต่างจากเวลา 45 นาที หรือ 60 นาที แต่เมื่อลดระยะเวลาลงเหลือ 15 นาที ให้ค่าระดับความเจือจางสุดท้ายลดลง

ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการ incubate ที่ 30 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

1.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต ทำโดยนำตัวอย่างทั้งที่ให้ผลบวกและลบมาทดสอบด้วยวิธี IFA ตัวอย่างผลบวกนำมาเจือจางเป็น 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1,600 ทดสอบโดยอ้างอิงวิธีการตรวจจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ระดับความเข้มข้นคอนจูเกต ที่ 1:20 และระยะเวลาในการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต 30 นาที นำมาทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ incubate ที่ 37^{o}ซ และที่อุณหภูมิห้องให้ผลดังแสดงในแผนภูมิที่ 4

แผนภูมิที่ 4 ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างที่ให้ผลบวก 5 ราย เมื่อ incubate ที่อุณหภูมิต่างกัน



* ตัวอย่าง No2 และ No4 ที่ 37°ซ ให้ผลบวกถึงระดับไตเตอร์ 1:3,200

เนื่องจากทั้ง 5 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับไตเตอร์ไม่ว่าจะใช้อุณหภูมิเท่าใด แต่ผู้วิจัยสังเกตเห็นว่า ในตัวอย่างที่ 2 และ 4 เมื่อใช้อุณหภูมิห้องจะให้ผลบวกที่ค่อนข้างอ่อน (weakly positive) ที่ระดับความเจือจางสุดท้ายในขณะที่ incubate ที่ 37°ซ ให้ผลบวกชัดเจน จึงได้ทำการเจือจางตัวอย่างที่ 2 และตัวอย่างที่ 4 ต่อไปอีก 2 เท่า (1:3,200) พบว่า เมื่อ incubate ที่ 37°ซ ตัวอย่างที่ 2 และตัวอย่างที่ 4 ให้ผลระดับความเจือจางสุดท้ายเปลี่ยนจาก 1:1,600 เป็น 1:3,200 ในขณะที่เมื่อ incubate ที่อุณหภูมิห้อง ผลระดับความเจือจางสุดท้ายยังคงเท่าเดิมเป็น 1:1,600 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การ incubate ที่ 37°ซ ช่วยเพิ่มความไว (sensitivity of detection) ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 37°ซ สำหรับการ incubate ซีรัมและคอนจูเกต

2. การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

ภายหลังการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี IFA แล้ว สามารถสรุปวิธีการได้ดังนี้

เคลือบเพลทด้วยแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา serovar bratislarva โดยวิธีการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

นำซีรัมที่จะทดสอบมา inactivate ที่ 56°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเจือจางด้วย PBS pH 7.0 ที่ระดับความเจือจาง 1:100-1:1,600 incubate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย PBS buffer 2 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นเติม FITC conjugated ที่เจือจางด้วย PBS ที่ระดับความเจือจาง 1:20 incubate ที่ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างด้วย PBS 3 ครั้ง แล้ว mount ด้วย glycerol buffer pH 8.0-9.0 ปิดด้วย cover slip แล้วนำไปอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

3. ผลการทดสอบหาความไว ความจำเพาะ ค่าคาดหวังผลบวก ค่าคาดหวังผลลบ และ ประสิทธิภาพของวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

3.1 ทดสอบหาความไว ความจำเพาะ ค่าคาดหวังผลบวกและค่าคาดหวังผลลบของวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

จากตัวอย่างซีรัมผลบวกและซีรัมผลลบ จำนวน 205 ตัวอย่าง จำแนกดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างที่ใช้ทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA

ชนิดกลุ่มตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	คิดเป็น ร้อยละ
กลุ่มตัวอย่างผลบวก (case)	65	31.7
กลุ่มตัวอย่างจาก endemic area (control 1)	40	19.5
กลุ่มควบคุมจากผู้ที่มีสุขภาพดี (control 2)	50	24.4
กลุ่มควบคุมจากผู้ป่วยโรคอื่นๆ (control 3)	50	24.4
รวม	205	100

ผลการตรวจตัวอย่างผลบวกจำนวน 65 ตัวอย่าง โดยนักเทคนิคการแพทย์ผู้ชำนาญการของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ด้วยวิธี IFA พบว่ามีระดับความแรงของแอนติบอดี ตั้งแต่ 1:100 ถึง 1:1,600 (แสดงในตารางที่ 3) จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดในกลุ่มนี้มาทดสอบต่อที่ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นก่อนที่จะทดสอบซ้ำอีกครั้งในซีรัมที่ชะออกมาจากกระดาษซับในระยะเวลาที่ต่างกัน

กลุ่มตัวอย่างจาก endemic area จำนวน 40 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากกลุ่มประชากรในจังหวัดที่มีการระบาด 5 จังหวัด คือ ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ มหาสารคาม สกลนคร และขอนแก่น นำมาตรวจยืนยันผลโดยวิธี latex agglutination ก่อนที่จะทดสอบโดยวิธี IFA

กลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้ป่วยโรคอื่น จำนวน 50 ตัวอย่าง จำแนกเป็นกลุ่มโรคติดเชื้อและโรคไม่ติดเชื้อที่ผ่านการตรวจจากบริษัทศูนย์แล็บธนบุรี และให้ผลลบต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี latex agglutination จำแนกดังแสดงในตารางที่ 4

กลุ่มควบคุมที่ได้จากผู้มีสุขภาพดี จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้มาจากซีรัมของผู้ที่มารับบริการตรวจสุขภาพจากการออกบริการชุมชนของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ณ ชุมชนเทคโนโลยีเปรมฤทัย จ. สมุทรปราการ ที่ให้ผลการตรวจน้ำตาลและไขมันในกระแสเลือดเป็นปกติ รวมทั้งผลที่ได้จากการตอบแบบสอบถามเรื่องการดูแลสุขภาพอยู่ในเกณฑ์ปกติด้วย

ตารางที่ 3 ระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผลบวก โดยวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

ระดับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผลบวก	จำนวน (ตัวอย่าง)	ร้อยละ
1:100	18	27.6
1:200	12	18.5
1:400	15	23.1
1:800	10	15.4
1:1600	10	15.4
รวม	65	100

ตารางที่ 4 การจำแนกกลุ่มควบคุมผลลบที่ได้จากผู้ป่วยที่ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นบวกกับการทดสอบอื่นยกเว้นแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

โรคติดเชื้อ (40 ตัวอย่าง)	จำนวน	โรคติดเชื้อ (40 ตัวอย่าง)	จำนวน
- Weil - Felix test	3	- Mump IgG	1
- Widal test	5	- Herpes simplex IgG	1
- FTA-ABS	1	- Mycoplasma IgG	1
- TPHA	2	- CMV IgM	1
- VDRL	4	- VZV IgM	1
- Dengue IgM	1	- Melioidosis	5
- HBsAg	3	- ASO test	4
- HAV IgM	1	- Rubella IgM	1
- Anti HCV	3	- Anti HIV	2
โรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเอง(8 ตัวอย่าง)	จำนวน	อื่นๆ (2 ตัวอย่าง)	จำนวน
- ANA	3	- AFP	1
- Anti dsDNA	2	- β-HCG	1
- Rheumatoid factor	3		

ผลการตรวจโดยวิธี IFA ทั้งสามกลุ่มควบคุมผลลบแสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการตรวจโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น ในการตรวจตัวอย่างควบคุมผลลบทั้งสามกลุ่ม

		กลุ่มตัวอย่าง จาก endemic area (40 ตัวอย่าง)	กลุ่มควบคุมจาก ผู้ที่มีสุขภาพดี (50 ตัวอย่าง)	กลุ่มควบคุมจาก ผู้ป่วยโรคอื่นๆ (50 ตัวอย่าง)
ผลวิธี IFA	Positive	1	0	0
	Negative	39	50	50

ผลการตรวจที่ให้ผลบวกและลบทั้งหมดจำนวน 205 ตัวอย่าง ทั้งจากวิธีมาตรฐานและจากวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA กับผลที่ได้จากภายนอกซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

		วิธีมาตรฐาน		รวม
		Positive	Negative	
วิธี IFA	Positive	62	1	63
	Negative	3	139	142
รวม		65	140	205

นำค่าจากตารางมาคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ ค่าคาดหวังผลบวก ค่าคาดหวังผลลบ และประสิทธิภาพของวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น ได้ผลดังนี้

ความไว (Sensitivity) = 95.38%

ความจำเพาะ(Specificity) = 99.28%

ค่าคาดหวังผลบวก (Positive predictive value) = 98.41%

ค่าคาดหวังผลลบ (Negative predictive value) = 97.89%

ประสิทธิภาพ (Accuracy) = 98.05%

ตัวอย่างผลบวกจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก จ. พิษณุโลก จำนวน 65 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจโดยวิธี IFA ณ ห้องปฏิบัติการคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ พบว่าให้ผลการตรวจเป็นบวก เพียง 62 ตัวอย่าง อีก 3 ตัวอย่างให้ผลการตรวจเป็นลบ จึงนำทั้ง 3 ตัวอย่างนี้มาทดสอบซ้ำโดยวิธี latex agglutination พบว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบ

4. ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA จากซีรัมและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ

4.1 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA จากซีรัมสดโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเทียบกับวิธีของศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

จากจำนวนตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 65 ตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกโดยวิธีมาตรฐานจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก และตัวอย่างควบคุมผลบวกและควบคุมผลลบอย่างละ 5 ตัวอย่าง รวม 75 ตัวอย่าง นำมาทดสอบโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นแสดงผลดังตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างไตเตอร์ของซีรัมสดที่ตรวจโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

		ผลการตรวจโดยวิธี IFA จาก RMSC						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผลวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น (ซีรัมสด)	(-)	5*	3					8
	(+) 1:100		20**					20
	(+) 1:200			12				12
	(+) 1:400				15			15
	(+) 1:800					10		10
	(+) 1:1,600						10	10
รวม		5	23	12	15	10	10	75

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 จำนวน 15 ตัวอย่าง และ positive control serum จำนวน 5 ตัวอย่าง

Wilcoxon Signed Ranks Test P value = .083

ตารางที่ 8 ความสอดคล้องของผลการตรวจซีรัมสดระหว่างวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก

		วิธี IFA ของศูนย์วิทย์		รวม
		Negative	Positive	
วิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น	Negative	5	3	8
	Positive	0	67	67
รวม		5	70	75

McNemar's χ^2 P = 0.25 df = 1

K = 0.75 $p < 0.05$

จากผลการทดลองแสดงว่าวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราได้โดยให้ผลไม่แตกต่างทั้งในด้านคุณภาพและกึ่งปริมาณเมื่อเทียบกับวิธี IFA จากศูนย์วิทยาศาสตร์พิษณุโลก ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

4.2 ผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราจากซีรัมที่ชะจากกระดาษซับเปรียบเทียบกับซีรัมสด โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

จากตัวอย่างทดสอบ 65 ตัวอย่างและตัวอย่างควบคุมผลบวกและลบอย่างละ 5 ตัวอย่าง รวม 75 ตัวอย่าง นำมาทดสอบโดยหยดบนกระดาษซับ Whatman No.1 ตัวอย่างละ 5 แผ่น แผ่นละ 10 µl เพื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องสำหรับนำมาชะซีรัมออกในวันที่ 0, 4, 7, 14 และ 21 รวม 5 วัน วันละ 1 แผ่น ชะซีรัมออกโดยใช้ PBS 990 µl จากนั้นนำซีรัมที่ชะออกมาซึ่งมีระดับความเจือจาง 1:100 มาทำ 2 fold dilution ถึง 1:1,600 แล้วนำมาตรวจโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น โดยทำตัวอย่าง ควบคุมผลบวกและลบอย่างละ 5 ตัวอย่างร่วมไปด้วย นำผลที่ได้จากการตรวจซีรัมที่ชะจากกระดาษซับในวันต่างๆมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจตัวอย่างซีรัมสดเชิงกึ่งปริมาณ ซึ่งแสดงเป็นค่าไตเตอร์ และคำนวณค่าความสอดคล้องเมื่อเปรียบเทียบผลในเชิงคุณภาพด้วยสถิติวิเคราะห์ Kappa ผลดังแสดงในตารางที่ 9 ถึง 18

ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 0

		ผล IFA (ซีรัมสด)						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผล IFA (ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ วันที่ 0)	(-)	5*						5
	(+) 1:100		23**					23
	(+) 1:200			12				12
	(+) 1:400				15			15
	(+) 1:800					10	1	11
	(+) 1:1,600						9	9
รวม		5	23	12	15	10	10	75

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 ตรงกัน จำนวน 18 ตัวอย่าง และ positive control serum 5 ตัวอย่าง

Wilcoxon Signed Ranks Test p value = .317

ตารางที่ 10 ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 0 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

		ซีรัมสด		รวม
		Negative	Positive	
ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 0	Negative	5	0	5
	Positive	0	70	70
รวม		5	70	75

McNemar's χ^2 P = 1.00 df = 1

K = 1.0 $p < 0.05$

ผลจากตารางที่ 9 และ 10 แสดงให้เห็นว่าผลการตรวจซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ ให้ผลทั้งในเชิงกึ่งปริมาณและคุณภาพไม่แตกต่างจากการตรวจซีรัมสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ส่วนความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณและความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพของซีรัมที่ชะจากกระดาษซับในวันที่ 4, 7, 14 และ 21 เมื่อเทียบกับซีรัมสด แสดงในตารางที่ 11-18

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 4

		ผล IFA (ซีรัมสด)						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผล IFA (ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ วันที่ 4)	(-)	5*						5
	(+) 1:100		23**					23
	(+) 1:200			12				12
	(+) 1:400				15			15
	(+) 1:800					10	1	10
	(+) 1:1,600						9	10
รวม		5	23	12	15	10	10	75

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 ตรงกัน จำนวน 18 ตัวอย่าง และ positive control serum 5 ตัวอย่าง

Wilcoxon Signed Ranks Test p value = .317

ตารางที่ 12 ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 4 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

		ซีรัมสด		รวม
		Negative	Positive	
ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 4	Negative	5	0	5
	Positive	0	70	70
รวม		5	70	75

McNemar's χ^2 P = 1.00 df = 1

K = 1.0 $p < 0.05$

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 7

		ผล IFA (ซีรัมสด)						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผล IFA (ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ วันที่ 7)	(-)	5*						5
	(+) 1:100		23**	2				25
	(+) 1:200			10				10
	(+) 1:400				15			15
	(+) 1:800					10	2	12
	(+) 1:1,600						8	8
รวม		5	23	12	15	10	10	75

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 จำนวนตรงกัน 18 ตัวอย่าง และ positive control serum 5 ตัวอย่าง

Wilcoxon Signed Ranks Test p value = .083

ตารางที่ 14 ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 7 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

		วิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น		รวม
		Negative	Positive	
ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 7	Negative	5	0	5
	Positive	0	70	70
รวม		5	70	75

McNemar's χ^2 P = 1.00 df = 1

K = 1.0 $p < 0.05$

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 14

		ผล IFA (ซีรัมสด)						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผล IFA (ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ วันที่ 14)	(-)	5*	4	1				10
	(+) 1:100		19**	6	1			26
	(+) 1:200			5	6			11
	(+) 1:400				8	1	1	10
	(+) 1:800					9	3	12
	(+) 1:1,600						6	6
รวม		5	23	12	15	10	10	75

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 ตรงกันจำนวน 14 ตัวอย่าง และ positive control serum 5 ตัวอย่าง

Wilcoxon Signed Ranks Test p value = .001

ตารางที่ 16 ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 14 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

		ซีรัมสด		รวม
		Negative	Positive	
ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 14	Negative	5	4	9
	Positive	0	66	66
รวม		5	70	75

McNemar's χ^2 P = 0.125 df = 1

K = 0.69 $p < 0.05$

ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์ของผลการตรวจเชิงกึ่งปริมาณระหว่างไตเตอร์ของซีรัมที่ตรวจโดยวิธี IFA จากตัวอย่างซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 21

		ผล IFA (ซีรัมสด)						รวม
		(-)	(+) 1:100	(+) 1:200	(+) 1:400	(+) 1:800	(+) 1:1,600	
ผล IFA (ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับ วันที่ 21)	(-)	5*	5	3				13
	(+) 1:100		18**	4	2			24
	(+) 1:200			5	5	1		11
	(+) 1:400				7	3	3	13
	(+) 1:800					6	2	8
	(+) 1:1,600						5	5
รวม		5	23	12	14	10	10	74***

* จำนวน negative control serum 5 ตัวอย่าง

** จำนวนรวมของตัวอย่างที่ให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100 ตรงกันจำนวน 13 ตัวอย่าง และ positive control serum 5 ตัวอย่าง

*** ขาด 1 ตัวอย่างเนื่องจากปริมาณซีรัมไม่พอสำหรับทดสอบ

Wilcoxon Signed Ranks Test p value = .001

ตารางที่ 18 ความสอดคล้องของผลการตรวจเชิงคุณภาพจากซีรัมสดและซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 21 โดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้น

		ซีรัมสด		รวม
		Negative	Positive	
ซีรัมที่ชะจากกระดาษซับวันที่ 21	Negative	5	5	10
	Positive	0	64	64
รวม		5	69	74

McNemar's χ^2 P = 0.063 df = 1

K = 0.63 $p < 0.05$

จากผลที่แสดงในตารางที่ 11-18 พบว่าสำหรับผลการตรวจในเชิงกึ่งปริมาณ ระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ตรวจจากซีรัมที่ชะจากกระดาษซับให้ผลไม่แตกต่างจากการตรวจจากซีรัมสดในระยะเวลา 7 วัน ($p < 0.05$) ส่วนผลการตรวจในเชิงคุณภาพนั้นผลการตรวจจากซีรัมที่ชะจากกระดาษซับและจากซีรัมสดไม่แตกต่างกันในระยะเวลา 21 วัน ($p < 0.05$) โดยมีค่าความสอดคล้องอยู่ระหว่าง K เท่ากับ 0.6-1.0 ซึ่งจัดอยู่ในเกณฑ์ความสอดคล้องระดับดี แสดงให้เห็นว่าสามารถนำกระดาษซับมาใช้เป็นวัสดุนำส่งซีรัมได้

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ตามแนวทางการชันสูตรโรคเลปโตสไปโรซิส ของกระทรวงสาธารณสุข กรณีผลการตรวจกรองให้ผลลบแต่ผู้ป่วยมีลักษณะอาการที่น่าสงสัยว่าจะเป็นโรค การตรวจยืนยันผลซ้ำอีกครั้งโดยวิธี IFA เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมที่สุด แต่ปัญหาสำคัญคือการนำส่งสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นซีรัมจากท้องที่ที่มีการระบาด โดยเฉพาะจากถิ่นทุรกันดารมายังห้องปฏิบัติการเฉพาะซึ่งมีอยู่ในแต่ละภูมิภาค เนื่องจากปัญหาของการนำส่งและการเน่าเสียของซีรัมทำให้เกิดปัญหาการตรวจวินิจฉัยที่ผิดพลาด ในงานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการ IFA ขึ้น โดยการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดสอบรวมทั้งหาค่าความไว ความจำเพาะและประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อเป็นเครื่องมือสำหรับการตรวจวินิจฉัยให้ได้ผลที่มีความเที่ยงตรงและแม่นยำสูงสุด และได้นำวิธีดังกล่าวมาใช้ศึกษาระยะเวลาที่สามารถเก็บซีรัมบนกระดาษซับได้โดยระดับแอนติบอดีไม่เปลี่ยนแปลง ทั้งในระดับคุณภาพและระดับกึ่งปริมาณ เพื่อให้สามารถนำวิธีการเก็บซีรัมในลักษณะนี้ไปใช้ประโยชน์ในการนำส่งซีรัมเพื่อนำผลการตรวจไปใช้ในการติดตามผลการรักษา การตรวจยืนยันผล และการตรวจกรองผู้ป่วยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การนำส่งซีรัมโดยการหยดบนกระดาษซับสำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA ที่ได้พัฒนาขึ้น ให้ผลไม่แตกต่างจากการตรวจจากซีรัมโดยตรงทั้งการตรวจในเชิงคุณภาพ ซึ่งผลบวกจะคงอยู่ได้ถึง 3 สัปดาห์ และการตรวจในเชิงกึ่งปริมาณโดยการหาระดับไตเตอร์พบว่าจะไม่เปลี่ยนแปลงใน 1 สัปดาห์ ดังนั้นการนำส่งซีรัมโดยวิธีดังกล่าวจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในแหล่งระบาดของโรค ซึ่งอยู่ในท้องที่ห่างไกล ทุรกันดาร เพื่อความสะดวกประหยัด และมั่นใจในคุณภาพของสิ่งส่งตรวจที่จะผ่านการนำส่งมาถึงห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลอันจะเป็นประโยชน์สูงสุดในการรักษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสต่อไป

อภิปรายผล

โรคเลปโตสไปโรซิสยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน โดยเฉพาะในท้องถิ่นทุรกันดารที่อยู่ห่างไกล การตรวจวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำ

เท่านั้นจึงจะนำมาซึ่งการรักษาได้อย่างทันท่วงที วิธีการตรวจวินิจฉัยที่เหมาะสมจึงต้องมีความไวและความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังต้องเป็นวิธีที่สามารถตรวจแยกผู้ป่วยจากผู้ที่ไม่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสมที่จะใช้งานในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ อีกทั้งต้องราคาไม่สูงมาก การตรวจที่เป็นวิธีมาตรฐานได้แก่วิธี microscopic agglutination test (MAT) แม้ว่าจะเป็นวิธีเดียวที่มีความจำเพาะสูง สามารถตรวจแยกการติดเชื้อได้ถึงระดับซีโรวาร์ แต่ก็ยังมีปัญหาในด้านของค่าใช้จ่ายที่สูงและอันตรายที่มีแก่ผู้ทดสอบเพราะต้องใช้เชื้อที่มีชีวิตเป็นแอนติเจน การตรวจวินิจฉัยต้องใช้ paired sera เพื่อติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย ซึ่งต้องใช้เวลานาน (Pappas MG et al. 1985. 346-354)

ได้มีผู้พัฒนาเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยาในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราหลายวิธี เพื่อการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยให้ได้ในระยะแรกของการติดเชื้อให้ได้ผลอย่างรวดเร็วและถูกต้อง เช่นงานวิจัยของ Silva และคณะ ได้พัฒนาวิธี dot ELISA พบว่าสามารถตรวจผู้ป่วยที่อยู่ในระยะการติดเชื้อเฉียบพลัน (acute phase) ภายใน 14 วันของการป่วย โดยสามารถตรวจหาระดับ IgM, IgG และ IgA ได้ถึง 98%, 70% และ 76% ตามลำดับ (Silva MV et al. 1997 650-655) ส่วน Cumberland และคณะ (Cumberland P et al. 1999 : 731-734) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธี IgM ELISA และ MAT ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสของผู้ป่วยระยะเฉียบพลัน พบว่าให้ความไวของการทดสอบเป็น 52% ในตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยระยะแรก และเพิ่มเป็น 89% และ 93% ในระยะเวลาต่อมา โดยวิธี MAT จะให้ความไวในการตรวจระยะแรกต่ำ แต่มีความจำเพาะสูงกว่า 97% จากตัวอย่างส่งตรวจทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Petchclai และคณะ (Petchclai B et al. 1992. 203-8) ซึ่งศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี MAT และ IHA และให้ข้อเสนอแนะว่าการตรวจโดยวิธี MAT ในระยะแรกของการติดเชื้อให้ผลการตรวจที่ผิดพลาดได้สูงเนื่องจากความไวต่ำ Appassakij และคณะ (Appassakij H et al. 1995. 340-3) ได้ศึกษาวิธี IFA เปรียบเทียบกับวิธี MAT พบว่าเมื่อใช้ค่าจุดตัดผลบวกที่ระดับความเจือจางซีรัม 1:100 จะให้ค่าความจำเพาะของการทดสอบถึง 97% และมีความไวสูงกว่าวิธี MAT

สำหรับการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ พบว่าความไวและความจำเพาะของวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกเป็นวิธีมาตรฐานได้ค่าความไวและความจำเพาะเป็น 95.38% และ 99.28% ตามลำดับ ซึ่งนับว่าสูง โดยมีผลลบปลอม 3 ตัวอย่าง และผลบวกปลอม 1 ตัวอย่าง

ในกรณีผลลบปลอม 3 ตัวอย่าง (ผลการศึกษาระดับความเจือจางของซีรัมจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลกพบว่าทั้ง 3 ตัวอย่างให้ผลบวกที่ระดับไตเตอร์ 1:100) น่าจะเป็นผล

มาจากการเสื่อมสภาพของซีรัมจากการเก็บรักษาหรือการนำส่งซีรัมมาจากพิษณุโลก ซึ่งใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ถึงแม้จะแช่น้ำแข็งมาก็ตามแต่การละลายของน้ำแข็งก็อาจทำให้แอนติบอดีในซีรัมซึ่งมีระดับค่อนข้างต่ำอยู่แล้วเสียสภาพไปทำให้ผลกลายเป็นลบได้ นอกจากนี้การส่งซีรัมสดในปริมาณมากนอกจากความไม่สะดวกในการนำส่งแล้ว การเน่าเสียซึ่งเกิดขึ้นได้ง่ายก็เป็นปัจจัยให้แอนติบอดีเสื่อมสภาพได้ ในขณะที่การเก็บซีรัมใส่กระดาษซับในปริมาณน้อยมากและแห้ง ทำให้โอกาสที่จะเน่าเสียเกิดขึ้นได้ยากกว่า ผลที่ได้นี้น่าจะแสดงให้เห็นถึงข้อด้อยของการนำส่งสิ่งส่งตรวจในรูปซีรัมสด

ผลบวกปลอมที่เกิดขึ้น 1 ตัวอย่างมาจากกลุ่มผู้ที่ไม่มีอาการของโรคและอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด (endemic area) และให้ผลลบต่อการตรวจโดยวิธี LA เนื่องจากวิธี IFA ที่ใช้ในการทดสอบใช้ rabbit anti-human IgG, IgA, IgM FITC conjugated ซึ่งสามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อได้ถึงสามคลาส ในกลุ่มคนที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและมีการติดเชื้อมาก่อนจะมีระดับแอนติบอดีสูงในระดับหนึ่งซึ่งอาจเกินค่า significant titer (1:100) ของวิธีการตรวจนี้จึงทำให้เกิดผลบวกปลอมขึ้นหรืออาจจะเป็นกลุ่มของพาหะคือผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ (asymptomatic infection) ซึ่งจะมีแอนติบอดีในระดับต่ำๆจนถึงระดับที่ใกล้เคียงกับค่าจุดตัดผลบวกของการตรวจ ซึ่งมีรายงานของ Tangkanakul และคณะ เกี่ยวกับความชุกของผู้ที่เป็นพาหะของโรคในประเทศไทยอยู่ในระหว่าง 8.4-11% (วราลักษณ์ ตังคณะกุลและคณะ. 2543 : 56-62) และเป็นที่น่าสังเกตว่าผู้ป่วยโรคอื่น ไม่พบว่าให้ผลบวกปลอมเลย ทั้งที่ในการศึกษาความจำเพาะของวิธีการโดยนักวิจัยท่านอื่นมีรายงานผลบวกปลอมเกิดขึ้นในกลุ่มโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อที่มีโครงสร้างคล้ายกันได้แก่ซิฟิลิส (Appassakij H et al. 1995 : 340-343) ผู้วิจัยได้เลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ VDRL จำนวน 4 ตัวอย่าง และที่ให้ผลบวกจาก TPHA และ FTA-ABS จำนวน 3 ตัวอย่าง มาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี IFA ก็ให้ผลลบต่อการทดสอบทั้งหมด อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่เป็นตัวแทนในกลุ่มโรคดังกล่าวอาจจะมีจำนวนน้อยเกินไปทำให้ผลสรุปที่ได้ยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Petchclai (Petchclai B et al. 1991. 672-5) และ Pappas (Pappas MG et al. 1985. 346-354) โดยใช้หลักการ ELISA และ immunoblot ซึ่งก็ไม่พบผลบวกปลอมเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรซิส จัดอยู่ในกลุ่มของโรคที่มีอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (febrile disease) ลักษณะอาการของโรคไม่จำเพาะชัดเจน ต้องอาศัยผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในการตัดสินใจสำหรับการรักษาและติดตามผล การตรวจกรองโรคจึงเป็นหัวใจหลักสำคัญสำหรับการตรวจแยกผู้ป่วยเพื่อการรักษาและการวางแผนการควบคุมโรค ตามแนวทางการชันสูตรโรคของกระทรวงสาธารณสุข เสนอให้ใช้วิธีการที่มีความไวสูง และควรจะเป็นวิธีการที่สะดวกสำหรับ

การนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีการระบาดซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ทุรกันดาร ไม่ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์พิเศษราคาแพง อีกทั้งไม่ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญสูงอีกด้วย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสโดยวิธี latex agglutination (LA) สำหรับให้หน่วยงานในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขนำไปใช้ในการตรวจภาคสนาม ซึ่งจากการศึกษาของ ศราวุธ และคณะ (ศราวุธ สุทธิรัตน์และคณะ. 2545. 893-7) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธี LA กับวิธี IFA พบว่า วิธี LA ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็น 82.2 และ 91.4 ตามลำดับ ในขณะที่วิธี IFA ให้ค่าความไวและความจำเพาะเป็น 97.7 และ 91.4 ตามลำดับ และเมื่อคำนวณหาค่าความสอดคล้องของสองวิธี พบว่าสามารถใช้แทนกันได้ในการตรวจกรอง ผู้ป่วยเบื้องต้น ($K = 0.75$, $p < 0.01$) แต่วิธี LA มีข้อได้เปรียบวิธี IFA ตรงที่เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษรวมถึงความชำนาญในการอ่านผลด้วย

แต่ในบางกรณีที่ผู้ป่วยมีลักษณะอาการที่ค่อนข้างบ่งชี้ชัดเจนถึงการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามร่างกายโดยเฉพาะบริเวณกล้ามเนื้อ ตาแดง เป็นต้น) แต่ผลการตรวจโดยวิธีตรวจกรองครั้งแรกเป็นลบ ตามแนวทางชันสูตรโรคของกระทรวงสาธารณสุข (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543) แนะนำให้ส่งตรวจโดยวิธี IFA ซึ่งมีความจำเพาะค่อนข้างสูง และหน่วยงานของกระทรวงสาธารณสุขในระดับจังหวัดก็มีศักยภาพเพียงพอสำหรับการตรวจโดยวิธีดังกล่าวได้ อีกทั้งราคาก็ไม่สูงเท่ากับวิธี MAT การนำส่งสิ่งส่งตรวจจากท้องถิ่นที่มีการระบาดเพื่อตรวจยืนยันผลโดยวิธี IFA ยังห้องปฏิบัติการจึงเป็นแนวทางที่เกิดขึ้นเป็นปกติ ปัญหาที่พบคือการเน่าเสียของสิ่งส่งตรวจในระหว่างการนำส่งซีรัม เนื่องจากสภาพอากาศบ้านเราร้อนชื้น อุณหภูมิสูงเกือบตลอดปี ทำให้แอนติบอดีที่อยู่ในซีรัมเสียสภาพ และในขณะเดียวกันการส่งสิ่งส่งตรวจในรูปของเหลวต้องมีภาชนะส่งตรวจที่มิดชิดเพื่อป้องกันการกระแทกและหลุดรั่วของสิ่งส่งตรวจ การวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการนำส่งในรูปของซีรัมแห้งบนกระดาษซับสำหรับการนำส่ง เพื่อนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบระดับแอนติบอดีกับการตรวจซีรัมสด ซึ่งทั้งในเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative analysis) คือการตรวจหาระดับไตเตอร์ในวันต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการติดตามผลการรักษา และการศึกษาในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) คือผลบวกหรือลบ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจกรองผู้ป่วย

จากการศึกษาพบว่า การเก็บซีรัมบนกระดาษซับให้ผลของระดับแอนติบอดีไม่แตกต่างจากซีรัมสด แสดงว่าสามารถนำกระดาษซับมาใช้เป็นวัสดุสำหรับดูดซับซีรัมเพื่อนำส่งแทนการส่งซีรัมสดโดยตรงได้ ($K = 1.00$, $p < 0.05$) เมื่อทำการตรวจหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีที่เก็บบนกระดาษซับระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าสามารถนำส่งซีรัมโดยการเก็บบนกระดาษซับ เพื่อตรวจหาระดับไตเตอร์สำหรับการติดตามผล

QW
575.5 .L4
ศ168ก
2547
ฉ.2

77079

ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การรักษาได้ โดยให้ผลไม่แตกต่างจากการส่งซีรัมสดภายใน 1 สัปดาห์ และเมื่อศึกษาในเชิงคุณภาพ พบว่า ไม่พบมีการเปลี่ยนแปลงผลการตรวจจากผลบวก (positive) ไปเป็นผลลบ (negative) ในกลุ่มผู้ป่วยโดยการส่งตรวจจากซีรัมที่เก็บบนกระดาษซับภายในเวลา 3 สัปดาห์ (21 วัน) โดยให้ผลสอดคล้องกับการตรวจจากซีรัมสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

มีผู้ศึกษาเรื่องการนำส่งสิ่งส่งตรวจทางระบบไปรษณีย์หลายคนด้วยกัน สำหรับการนำส่งเพื่อวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสนั้น บุนธรรมและคณะ ได้ศึกษาการนำส่งตัวอย่างเลือดรวม (whole blood) บนกระดาษกรอง (บุนธรรม สุนทรเกียรติและคณะ. 2513 : 17-20) แต่การส่งตัวอย่างเลือดรวมจะมีปัญหาจาก การแตกของเม็ดเลือดแดง (hemolysis) รวมถึงการคำนวณระดับความเจือจางซีรัมของผู้ป่วยที่มาจากการตรวจจากซีรัมโดยตรงเทียบกับจากชะจากกระดาษกรอง ซึ่งจากการศึกษาเพิ่มเติมของศราวุธ และคณะ (ศราวุธ สุทธิรัตน์และคณะ. 2546 . 30-37) ได้ทดลองสุ่มตัวอย่างซีรัมจำนวน 21 ตัวอย่าง และนำส่งโดยระบบไปรษณีย์ในสถานการณ์จริงจาก 20 จังหวัดทั่วประเทศ เพื่อคำนวณระยะเวลาในการส่งของระบบไปรษณีย์และสภาพสิ่งส่งตรวจที่ได้รับ โดยแบ่งระยะเวลาการนำส่งเป็นสองช่วง คือช่วงเวลาปกติ และช่วงเทศกาลสำคัญที่มีวันหยุดติดต่อกันหลายวัน พบว่า ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการนำส่งประมาณ 1 สัปดาห์ และสภาพสิ่งส่งตรวจทุกตัวอย่างอยู่ในสภาพปกติ และเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี IFA ทั้ง 21 ตัวอย่างให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจจากตัวอย่างซีรัมสด และให้ค่าการลดลงของระดับไตเตอร์ไม่แตกต่างจากตัวอย่างซีรัมสดภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

1. การนำผลที่ได้จากการวิจัยไปใช้

จากผลการศึกษาการนำส่งสิ่งส่งตรวจสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในครั้งนี้ พบว่าไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการตรวจซีรัมที่นำส่งโดยการหยดบนกระดาษซับในระยะเวลา 1 สัปดาห์ ให้ผลไม่ต่างจากการตรวจน้ำเหลืองโดยตรงสำหรับการตรวจเชิงกึ่งปริมาณ และ 3 สัปดาห์สำหรับการตรวจเชิงคุณภาพ ทั้งในสถานการณ์จำลองและสถานการณ์จริง ดังนั้นการนำส่งซีรัมโดยวิธีนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนำส่งซีรัมจากถิ่นทุรกันดารมายังห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีความถูกต้องแม่นยำอันจะนำมาสู่การรักษาผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเนื่องจากวิธีการนำส่งดังกล่าวเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและประหยัด จึงน่าจะเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาการนำส่งสิ่งส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยโรคอื่นๆ ที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศที่จำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันผลโดยวิธีพิเศษที่ไม่สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

จากการศึกษาของผู้วิจัยเกี่ยวกับวิธี latex agglutination ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจกรองในปัจจุบันและวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีตรวจยืนยันผล พบว่ายังมีปัญหาสำคัญอยู่ที่การอ่านผลโดยเฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกอ่อนๆ (weakly positive) เนื่องจากการอ่านผลของทั้งสองวิธีเป็นลักษณะการตัดสินใจด้วยความรู้สึก (subjective reading) ดังนั้น น่าจะมีการพัฒนาวิธีการที่อาศัยการอ่านผลในลักษณะที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน (objective reading) ขึ้นมาทดแทน โดยที่จะต้องพัฒนาความไวและความจำเพาะที่เหมาะสมสำหรับวัตถุประสงค์ของการใช้งานแต่ละประเภท เช่น วิธี ELISA ซึ่งอ่านผลด้วยเครื่อง ELISA reader สามารถพัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะสูงพอที่จะนำมาใช้ทดแทนวิธี IFA เป็นต้น

บรรณานุกรม

ดาริกา กิ่งเนคร. (2544). "ธรรมชาติของโรคเลปโตสไปโรซิส" ใน คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. หน้า 7-23. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.

ดุสิต สุจิรารัตน์. (2539). การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS for Windows เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.

บุนธรรม สุนทรเกียรติ และ อุไร โพธา. (2513). "การศึกษาเกี่ยวกับความเสื่อมของแอนติบอดีจากเชื้อเลปโตสไปราที่ถูกเก็บอยู่ในสภาพของเลือดแห้งบนกระดาษกรอง". วชิรเวชสาร 14 (มกราคม 2513) : 17-20.

พิมพ์ใจ นัยโกวิท และ ดวงพร พูลสุขสมบัติ. (2544). "การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ" ใน คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส หน้า 42-56. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.

ยุพิน ศุพุทธมงคล. (2544). "รายงานการสัมมนา วิชาการโรคติดเชื้ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ" คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. วันที่ 3-5 เมษายน 2544 : 203-211.

วินิตา บริราช, สุชีพ ขำสวัสดิ์, วิมล เพชรกาญจนาพงศ์, ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ และ พิมพ์ใจ นัยโกวิท. (2541) "การใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปราให้ได้ผลรวดเร็ว". วารสารกรมวิทยาศาสตร์ 40(มกราคม-มีนาคม 2541) : 57-85.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล. (2544). "อาการและอาการแสดงของโรคเลปโตสไปโรซิส" ใน คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส หน้า 24-32. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.

วราลักษณ์ ตังคณะกุล และคณะ. (2543). "ความชุกของการติดเชื้อเลปโตสไปโรซีสโดยไม่มีอาการในประชากรกลุ่มเสี่ยง พ.ศ. 2541". วารสารวิชาการสาธารณสุข 9(มกราคม-มีนาคม 2543) : 56-62.

ศราวุธ สุทธิรัตน์ และคณะ. (2545.) "การเปรียบเทียบวิธีอินไดเร็คอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์และลาเทกซ์แอกกลูติเนชั่นสำหรับตรวจหาแอนติบอดีย์ต่อเชื้อเลปโตสไปรา". วารสารวิชาการสาธารณสุข 11(พฤศจิกายน-ธันวาคม 2545) : 893-898.

ศราวุธ สุทธิรัตน์ และคณะ. (2546.) "ความคงสภาพของแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราที่เก็บบนกระดาษกรอง". วารสารกรมการแพทย์ 28(มกราคม-เมษายน 2546) : 30-37.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. (2543). เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่องการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ. 28 สิงหาคม 2543; โรงแรมแกรนด์ แปซิฟิค. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข.

สิริพรรณ แสงอรุณ, จิราภรณ์ พูลเพิ่มและ จุรีภรณ์ บุญยวงศ์วิโรจน์. (2542). "การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีฮีแมกกลูติเนชั่น". วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 41(กรกฎาคม-กันยายน 2542) :335-341.

สุกัญญา ดีประดิษฐ์. (2545). การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางอิมมูโนวิทยาอย่างง่ายโดยใช้แอนติเจนจากเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อการระบาด. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์). กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยมหิดล.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2542). สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2542. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์. 200-209.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2544) สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2544. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์. 186-187.

อมร ลีลารัศมี. (2532). "วิธีทดสอบด้านห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยโรค : ความรู้พื้นฐาน การแปลผล และการประเมินคุณค่า". วารสารโรคติดเชื้อและยาต้านจุลชีพ 6(มกราคม-มีนาคม 2532) :31-50.

Appassakij H, Slipapojakul K, *et al.* (1995) "Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis". Am. J. Trop.Med. Hyg 52(April 1995) : 340-343.

Cumberland P, Everard COR, and Levett PN. (1999). "Assessment of the efficacy of and IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis". Am Trop Med Hyg 65(November 1999) : 731-734.

Hatta M, Smits HL, Gussenhoven GC, and Gooskens J. (2000). "Introduction of a rapid dipstick assay for the detection of leptospira-specific immunoglobulin M antibody in the laboratory diagnosis of leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia". Southeast Asian J Trop Med Public Health 31(September 2000): 515-520.

Pappas MG *et al.* (1985). "Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM specific dot-ELISA comparison with the microscopic agglutination test". Am J Trop Med Hyg 34 (March 1985) : 346-354.

Petchclai B, Hiranras S, and Potha U. (1991). "Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis". Am J Trop Med Hyg 45(December 1991) :672-675.

Petchclai B, Kunakorn M, Hiranras S, Potha U and Liemsuwan C. (1992). "Enzyme –linked immunosorbent assay for leptospirosis immunoglobulin M specific antibody using surface antigen from a pathogenic leptospira : a comparison with indirect hemagglutination and microagglutination test". J Med Assoc Thai 75(Suppl): 203-208.

Ramadass P, Samuel B, and Nachimuthu K. (1990). "A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies". Vet Microbiol 70(October 1990) : 137-140.

Silva MV, Dias Camargo E, Vaz AJ, and Batista L. (1992). "Immuodiagnosis of human leptospirosis using saliva". Trans R Soc Trop Med Hyg 86(Sep-Oct 1992): 560-561.

Silva MV *et al.* (1994). "Dot-ELISA –IgM in saliva for the diagnosis of human leptospirosis using polyester fabric-resin as support (preliminary report)". Rev Inst Med Trop Sao Paulo 36(September-October) : 475-478.

Silva MV *et al.* . (1997). "Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM , IgG and IgA antibodies". Am J Trop Med Hyp 56(Jun 1997) : 650-655.

Smits HL *et al.* (2000). "Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis". J Clin Microbiol 38(March 2000) :1272-1275.

Suputtamongkol Y *et al.* (1998). "Microcapsule agglutination test for the diagnosis of leptotospirosis in Thailand". Ann Trop Med Parasitol 92(October 1998) : 797-801.

Terpstra WJ, Ligthart GS, and Schoone GJ.(1985). "ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis". J Gen Microbiol 131(February 1985) : 377-385.

Wagenaar J, Zuerner RL, Alt D, and Bolin CA. (2000). "Comparison of polymerase chain reaction assay with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo in urine of cattle". Am J Vet Res 61(March 2000) : 316-320.

Waitkins SA, and Hookey JV. (1986). "The detection of leptospires by a chemiluminescent immunoassay". J Med Microbiol 21(June 1986) : 353-356.

ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นายศราวุธ สุทธิรัตน์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
	หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวทวีพร พันธุ์พาณิชย์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	วท.ม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ	กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัย
	หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศันสนีย์ ตันติ์จธัม
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
	วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก อ. เมือง จ. พิษณุโลก