การดัดแปลงวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดส สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา

Modification of Indirect Immunoperoxidase for Leptospiral IgM Antibody Detection

ศราวุธ สุทธิรัตน์

ทวีพร พันธุ์พาณิชย์

อิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ

สุรศักดิ์ หมื่นพล

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีการศึกษา 2550

ชื่อเรื่อง การดัดแปลงวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดส สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา

ผู้วิจัย ศราวุธ สุทธิรัตน์ ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ อิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ สุรศักดิ์ หมื่นพล

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2552

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้างานวิจัย 41

คำสำคัญ เลปโตสไปโรซิส อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ อิมมูโนเพอร์ออกซิเดส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

ทำการดัดแปลงวิธีอินไดเร็คอิมมูโนเพอร์ออกซิเดส (IIP) สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา แล้วนำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมจำนวน 111 ตัวอย่าง ประกอบด้วยซีรัมของผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส 65 ตัวอย่าง ตัวอย่างซีรัมควบคุมผลลบ 46 ตัวอย่าง จำแนกเป็นผู้มีสุขภาพดี 10 ตัวอย่าง ผู้ที่อยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค 20 ตัวอย่าง และผู้ป่วยด้วยโรคอื่นๆ 16 ตัวอย่าง พบว่าวิธี IIP มีความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของการทดสอบเป็น 100%, 95.6% และ 98.2% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับวิธี IFA พบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($K = 0.93$, $P < 0.05$) การทดสอบในกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับทั้งสองวิธีจำนวน 66 ตัวอย่าง พบว่าวิธี IIP ให้ผลบวกในระดับไตเตอร์สูงกว่าวิธี IFA 34 จาก 66 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.6 ในระดับเท่ากัน 23 จาก 66 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 34.8 และให้ผลบวกในระดับต่ำกว่า IFA 9 จาก 66 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13.6 โดยมีผลบวกปลอมเกิดขึ้น 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคซิฟิลิส และผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่การระบาด ส่วนผลลบปลอมพบเฉพาะในวิธี IFA จำนวน 3 ตัวอย่างแต่ไม่พบในวิธี IIP อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษานำร่องซึ่งแสดงถึงความเป็นไปได้ที่จะนำวิธีอิมมูโนเพอร์ออกซิเดสมาใช้ตรวจกรองผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสและใช้แทนวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ โดยวิธี IIP มีข้อดีเหนือกว่าคือใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาในการอ่านผลและการประยุกต์ใช้ในภาคสนาม ทั้งนี้จะต้องเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างในการศึกษา จึงจะสามารถสรุปประสิทธิภาพของวิธี IIP ในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสได้

Research Title Modification of Indirect Immunoperoxidase for Leptospiral IgM Antibody Detection

Researchers Sarawut Suttirat, Taweeporn Phunpanich, Issariya Ieamsuwan, Surasak Muenphon

Institution Huachiew Chalermprakiet University

Year of Publication 2009

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Sources Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages 41

Keywords Leptospirosis, Immunofluorescence, Immunoperoxidase

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

A modification of indirect immunoperoxidase (IIP) for leptospiral IgM antibody detection was performed and tested with 111 samples of serum collected from 65 leptospirosis patients and 46 negative controls consisting of 10 healthy controls, 20 individuals in endemic areas and 16 non-leptospirosis. Sensitivity, specificity and efficacy of modified IIP were 100, 95.6 and 98.2% respectively. The agreement rate when this method and IFA were compared, was 0.93 by Kappa analysis. This value demonstrated a very good agreement. Antibody titer of 66 positive resulting from both methods was compared. IIP gave more titer than IFA in 34 from 66 (51.6%), equivalent titer in 23 from 66 (34.8%) and less titer than IFA in 9 from 66 (13.6%). False positive was found in two samples, one sample of VDRL and TPHA positive case and another from individual in endemic area. False negative was found in three samples only when tested by IFA. This preliminary study showed that IIP might be used as screening test and alternative method to IFA for antibody detection. The benefit of IIP over than IFA was light microscope use and application for field trial study. However, more sera should be tested before its effectiveness for serodiagnosis of leptospirosis can be concluded.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์อิสยา จันทร์วิทยานุชิต คณบดีคณะเทคนิคการแพทย์ ที่ได้กรุณาให้โอกาสและสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณคุณบุญนิภา สุวรรณกาล รวมถึงเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จังหวัดอุดรธานี ที่ได้ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำวิจัย และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ศราวุธ สุทธิรัตน์
ทวีพร พันธุ์พาณิชย์
อิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ
สุรศักดิ์ หมื่นพล

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญรูป		ช
สารบัญแผนภูมิ		ซ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	สมมติฐานของงานวิจัย	3
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	ประวัติ	5
	การติดเชื้อและพยาธิสภาพ	6
	การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส	7
	การรักษาผู้ป่วย	16
	แหล่งรังโรค	17
	วิธีการควบคุมโรค	18
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	20
	แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา	20
	ตัวอย่างซีรัมทดสอบ	20
	วิธีการทดสอบ	22
	การศึกษาประสิทธิภาพและความสอดคล้องของวิธี IIP และ IFA	23
	การแปลผล	23
	สถิติที่ใช้ในการวิจัย	23

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	ผลการวิจัย	25
บทที่ 5	สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	32
	สรุปผลการวิจัย	32
	อภิปรายผล	33
	ข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม		36
ภาคผนวก		
	ประวัติย่อผู้วิจัย	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ผลิตภัณฑ์น้ำยาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีโรคเลปโตสไปโรซิส ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย	11
2.	จำแนกชนิดของกลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบของผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด	21
3.	จำแนกชนิดของกลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบของผู้ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบอื่นๆ นอกจากโรคเลปโตสไปโรซิส	22
4.	ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* โดยวิธี IIP ที่ดัดแปลงขึ้น	23
5.	ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธี IgM Immunoperoxidase	25
6.	เปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี IIP และ IFA กับวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน	26
7.	ผลการทดสอบแสดงเป็นระดับ titer ของตัวอย่างผลบวกที่ทดสอบด้วยวิธี IIP, IFA และ MAT จำนวน 15 ตัวอย่าง	27
8.	แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี IFA และ IIP ในกลุ่มตัวอย่างประเภทต่างๆทั้งหมด	28
9.	แสดงผลการทดสอบโดยวิธี IFA เมื่อเทียบกับผลการวินิจฉัยของกลุ่มตัวอย่าง ผลบวกและผลลบ	29
10.	แสดงผลการทดสอบโดยวิธี IIP เมื่อเทียบกับผลการวินิจฉัยของกลุ่มตัวอย่าง ผลบวกและผลลบ	29
11.	ความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจ 111 ตัวอย่าง โดยวิธี IIP และ IFA	30
12.	ผลของการทดสอบโดยวิธี IIP และ IFA ที่มีไตเตอร์เท่ากันจำนวน 23 ตัวอย่าง	31
13.	เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP มากกว่า วิธี IFA จำนวน 34 ตัวอย่าง	31
14.	เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP น้อยกว่า วิธี IFA จำนวน 9 ตัวอย่าง	31

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ผลการตรวจโดยวิธี IIP (ก) ผลบวก (ข) ผลลบ	26
2. ผลการตรวจโดยวิธี IFA (ก) ผลบวก (ข) ผลลบ	26

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

สารบัญแผนภูมิ

รูปที่		หน้า
1.	กราฟแสดงระดับไตเตอร์ของตัวอย่างทดสอบทั้ง 15 ตัวอย่าง เปรียบเทียบระหว่างสามวิธี	28

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคไข้ฉี่หนู (Leptospirosis) เป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่งของประเทศไทยในปัจจุบัน จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของสำนักระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข พบว่า อัตราป่วยด้วยโรคนี้ของประชากรไทยเพิ่มขึ้นอย่างมากตั้งแต่ปี 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 (กองระบาดวิทยา. 2542) ตราบจนถึงปี พ.ศ. 2548 อัตราป่วยตายยังคงไม่แตกต่างไปจากเดิมคือร้อยละ 4.4 (Tangkanakul, W. 2005) จะเห็นได้ว่าผู้ที่เสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวมีมากถึงครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยทั้งหมด ดังนั้นการตรวจกรองผู้ป่วยด้วยวิธีการที่ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วจะช่วยให้สามารถรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงทีซึ่งจะทำให้อัตราการเสียชีวิตด้วยโรคดังกล่าวลดน้อยลงได้

สำหรับวิธีการตรวจกรองผู้ป่วยโรคดังกล่าวจะใช้การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการโดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธีการตรวจกรอง (screening test) โดยทั่วไปจะใช้หลักการการเกาะกลุ่ม (agglutination) ได้แก่ latex agglutination (Ramadass, P. 1999), microcapsule agglutination (Suputtamongkol, Y. 1998) หรือหลักการอื่นๆ ได้แก่ ELISA (Terpsta, WJ. 1985), dot ELISA (ศันสนีย์ ตันติ์จธัม. 2550), chemiluminescent (Waitkins, SA. 1986) และ immunchromatography (Hatta, M. 2000) เป็นต้น แต่วิธีดังกล่าวยังมีความไวและความจำเพาะที่ไม่สูงมากนัก ต้องส่งตรวจซ้ำเพื่อป้องกันผลลบปลอม (false negative) ซึ่งตามรูปแบบแนวทางการตรวจวินิจฉัยที่จัดทำโดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543) ได้กำหนดให้ส่งตรวจซ้ำด้วยวิธี immunofluorescence assay (IFA) ทั้งนี้เพราะเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งมีราคาและค่าบำรุงรักษาค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องอาศัยความชำนาญในการอ่านผล การตรวจโดยวิธีนี้จึงมีเฉพาะในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เช่นโรงพยาบาลประจำจังหวัด โรงพยาบาลศูนย์หรือที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เท่านั้น

ดังนั้น เมื่อมีการระบาดของโรคไข้ฉี่หนูในพื้นที่ทุรกันดาร ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องตรวจกรองการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกเพื่อการรักษาในเบื้องต้น ก่อนที่จะได้ผลการตรวจยืนยันอีกครั้งหนึ่ง วิธีการตรวจกรองที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในภาคสนามจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยและการรักษาของแพทย์ โดยต้องพิจารณาถึงความสะดวก รวดเร็ว รวมถึงต้องเป็นวิธีที่มีความไวสูง ได้มีผู้นำหลักการต่างๆมาใช้ในการตรวจกรองสำหรับภาคสนาม ได้แก่ หลักการการเกาะกลุ่ม (agglutination) แต่พบว่าหลักการดังกล่าวถึงแม้ว่าจะสะดวก รวดเร็วและอ่านผลได้ง่าย แต่มีปัญหาในเรื่องของความไวในการตรวจซึ่งเป็นหัวใจของหลักการที่ใช้เพื่อการตรวจกรอง หลักการ immunochromatography ซึ่งเป็นหลักการที่มีการพัฒนาในระดับสูง สามารถผลิตเป็น test kit เพื่อจำหน่าย แต่ยังมีปัญหาในเรื่องความไวและราคาที่ค่อนข้างสูง ในขณะที่มีผู้พัฒนาวิธี ELISA ซึ่งเป็นหลักการที่มีความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูงมาประยุกต์ใช้ในภาคสนามในลักษณะของ immunoblot หรือ dot-ELISA (Petchclai, B. 1991) ซึ่งมีการพัฒนาความไวและความจำเพาะในการตรวจให้สูงมากขึ้นมาโดยตลอด เช่นในปี ค.ศ. 1995 Ribeiro และคณะ ได้พัฒนาวิธี dot-ELISA ได้ความไวและความจำเพาะเป็น 92.1 และ 97.5% ตามลำดับ (Ribeiro, MA. 1995) ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 Bajani และคณะ ได้ศึกษาวิธีดังกล่าวโดยเปรียบเทียบกับหลักการอื่นได้แก่ IHA, ELISA และ IgM dipstick assay พบว่าความไวและความจำเพาะของวิธี dot-ELISA เป็น 95.5 และ 98.8% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าหลักการอื่น (Bajani, MD. 2003) ใน ปี ค.ศ. 2006 ศราวุธ และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG โดยหลักการดังกล่าว แต่ก็พบว่ายังมีความไวเพียง 52.9% เท่านั้น (ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2549) ต่อมาในปี ค.ศ. 2007 ศันสนีย์และคณะ ได้พัฒนาวิธี IgM dot ELISA ซึ่งพบว่าความไวของวิธีการทดสอบสูงขึ้นโดยมีความสอดคล้องในระดับดีกับวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีในการตรวจซ้ำกรณีผลบวกปลอม (ศันสนีย์ ตันติ์จธัม. 2550) อย่างไรก็ตาม ยังมีปัญหาในเรื่องของการอ่านผลจากผลึกสีที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาทดสอบ

จากสภาพปัญหาดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเลปโตสไปราโดยหลักการ immunoperoxidase สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ทั้งนี้เนื่องจาก IgM จะปรากฏให้ตรวจพบได้ในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อและช่วยให้สามารถแยกผู้ป่วยออกจากกลุ่มผู้ที่เคยติดเชื้อแต่หายแล้ว โดยเฉพาะผู้ที่อยู่ในเขตชุกชุมโรค (endemic area) รวมถึงหลักการนี้อาศัยปฏิกิริยาติดฉลากด้วยเอนไซม์ ดังนั้นความไวของการทดสอบ (sensitivity of detection) จึงสูงกว่าหลักการการเกาะกลุ่มที่ใช้ในการตรวจกรองอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน และหลักการดังกล่าวยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ง่ายในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษที่มีราคาแพง เพราะใช้เพียงสไลด์ทดสอบและกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป(light microscope) จึงนำมาเพื่อใช้เพื่อตรวจกรองในภาคสนามได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังไม่ต้องอาศัย

ความชำนาญพิเศษในการอ่านผลมากเท่ากับหลักการ IFA ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับนักเทคนิคการแพทย์ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลทั่วไปที่ต้องการนำวิธีการตรวจดังกล่าวไปใช้ในการตรวจกรองโรคเลปโตสไปโรซิส

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อดัดแปลงวิธี immunoperoxidase สำหรับตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา ให้เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจกรองผู้ป่วย
2. ศึกษาความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี immunoperoxidase ที่ดัดแปลงแล้ว จากตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและซีรัมควบคุม

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้จะเป็นการดัดแปลงวิธี immunoperoxidase แล้วนำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัม 4 กลุ่ม ได้แก่

1. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการตรวจ Leptospiral antibodies โดยวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา
2. ซีรัมที่ให้ผลบวกต่อการตรวจในโรคอื่นๆ ที่ไม่ใช่โรคฉี่หนู เช่น กลุ่มอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ โรคไข้เลือดออก โรคซิฟิลิส เป็นต้น
3. ซีรัมจากผู้ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาดและไม่มีอาการของโรค
4. ซีรัมจากผู้ที่มีสุขภาพดี และไม่ได้อาศัยอยู่ในพื้นที่ที่มีการระบาด รวมทั้งไม่มีประวัติของการเป็นโรคฉี่หนูมาก่อน

นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของวิธีทดสอบที่ดัดแปลงขึ้น

สมมติฐานของงานวิจัย

การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี immunoperoxidase ที่ดัดแปลงขึ้นให้ผลการทดสอบไม่แตกต่างจากผลของวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานของการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะเริ่มแรก โดยหลักการ immunoperoxidase

2. สามารถนำวิธีดังกล่าวไปใช้สำหรับการตรวจกรองผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการทั่วไป

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติ

โรคฉี่หนู หรือ เลปโตสไปโรซิส (Leptospirosis) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Leptospira interrogans* เป็นโรคติดต่อจากสัตว์ไปสู่คน (zoonosis) ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั่วโลกทั้งในเมืองและชนบท เป็นโรคที่มีอาการไม่แน่นอนและหลากหลาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (serovars) และปริมาณเชื้อที่ได้รับ โดยอาจไม่ปรากฏอาการหรือมีอาการรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ พบมากในหลายกลุ่มอาชีพ เช่น ชาวนา เกษตรกร คนทำงานเกี่ยวกับสัตว์ เช่น คนเลี้ยงสัตว์ คนงานฆ่าสัตว์ ในประเทศไทยพบได้ทุกภูมิภาคโดยมีสัตว์พาหะนำโรคที่สำคัญ ได้แก่ หนู สุนัข โค สุกร ม้า เป็นต้น สัตว์พวกนี้จะเก็บเชื้อไว้ในไตและขับออกมากับปัสสาวะ ซึ่งอาจปนเปื้อนกับอาหาร น้ำดื่ม คนอาจติดโรคโดยสัมผัสกับน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยเชื้อเข้าทางผิวหนัง หรือโดยการกินอาหารและน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อนั้น พบได้ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย

Dr. Adolf Weil แพทย์ชาวเยอรมัน เป็นผู้ที่พบผู้ป่วยด้วยโรคนี้เป็นคนแรก เมื่อ พ.ศ. 2429 ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ ตัวเหลืองและมีจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง ตับและม้ามขยายใหญ่ พร้อมกับมีอาการของโรคไตผิดปกติ และเรียกโรคนี้ว่า Weil's disease แต่การค้นพบเชื้อสาเหตุของโรคเกิดขึ้นในปี พ.ศ.2475 โดย Inada R. และคณะ ที่ประเทศญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อจากผู้ป่วยไข้ตัวเหลืองและเรียกชื่อเชื้อที่แยกได้นี้ว่า *Spirocheta icterohemorrhagia* (Ido, Y. 1967 : 341) และในปี พ.ศ. 2460 Noguchi H. พบว่าเชื้อนี้มีความแตกต่างจากสไปโรขีตที่รู้จักกันเป็นส่วนใหญ่จึงตั้งสกุลใหม่ให้เชื้อตัวนี้ว่า *Leptospira* (กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2541) สำหรับการระบาดในประเทศไทยมีรายงานโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2486 โดยนายแพทย์ใช้ ยูนิพันธ์ ได้รายงานผู้ป่วย 4 คน ที่รับไว้ในโรงพยาบาล ศิริราช ขณะนั้นมีอุทกภัยครั้งใหญ่ คนไข้มีประวัติลุยหรือยืนแช่น้ำมาก่อน เมื่อเข้ามาอยู่ในโรงพยาบาลก็มีอาการตามลักษณะของโรค (ใช้ ยูนิพันธ์. 2486 : 86)

พบว่าโรคนี้ระบาดได้ในแทบทุกจังหวัดของไทย สำหรับเชื้อเลปโตสไปราที่พบในประเทศไทยทั้งในคนและสัตว์มีประมาณ 18 ชนิด โดยเชื้อที่พบว่าทำให้เกิดโรคได้บ่อยในกรุงเทพฯ คือ serotype bataviae และ javanica ส่วนในส่วนภูมิภาคพบ serotype icterohemorrhagia และ bataviae เป็นส่วนใหญ่ (นิภา จรูญเวสม์. 2534)

การติดเชื้อและพยาธิสภาพ

ในคน จะมีระยะฟักตัวของโรคประมาณ 10-12 วัน โดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 2-30 วัน การดำเนินของโรคพบได้ตั้งแต่ไม่แสดงอาการ มีอาการเพียงเล็กน้อย ไม่มีลักษณะตัวเหลือง (jaundice) จนถึงอาการรุนแรงเฉียบพลัน ภาวะตับและไตล้มเหลวและตายได้ โดยทั่วไปลักษณะอาการไม่แน่นอนและคล้ายคลึงกับโรคอื่นมาก เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายคนโดยผ่านทางผิวหนังหรือบาดแผล หรือเข้าทางเยื่อบุของจมูก ปาก ตา จะเข้าสู่กระแสเลือดภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อจะเข้าไปแบ่งตัวเป็นจำนวนมากในกระแสโลหิต เกิดภาวะ bacteremia โดยจะเพิ่มจำนวนได้สูงสุดภายใน 2-4 วัน (เป็นช่วงที่มีไข้สูง) แล้วกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ เช่น ลำไส้ เยื่อหุ้มสมอง ปอด หัวใจ โดยเฉพาะที่ตับ ไต สมองและระบบประสาทส่วนกลาง เกิดการอักเสบของอวัยวะดังกล่าว เช่น ตับโต อาการตัวเหลืองจะปรากฏในวันที่ 2-5 หลังจากมีไข้ และตัวเหลืองขณะอาการเลวลง (ต่างจากตัวเหลืองเพราะเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งจะตัวเหลืองขณะอาการดีขึ้นถ้าไม่มีภาวะแทรกซ้อน) บางรายพบตับมีการบวมเล็กน้อย ซึ่งเกิดจากการคั่งของเลือดภายในตับ พยาธิสภาพที่พบในไต คือ interstitial nephritis และอาจเกิด necrosis ได้ ร่างกายจะเริ่มสร้างภูมิต้านทานโรคในระยะ 1-2 สัปดาห์หลังมีอาการ ทำให้เชื้อถูกกำจัดออกไป แต่เชื้อส่วนหนึ่งจะหลบเข้าไปอยู่ในไตแล้วเพิ่มจำนวนมากขึ้น แล้วถูกขับออกมากับปัสสาวะ เป็นครั้งคราวหรือต่อเนื่องกัน ซึ่งจำนวนและระยะเวลาที่เชื้อถูกขับออกมากน้อยเท่าใด จะสัมพันธ์กับชนิดของสัตว์และชนิดของเชื้อ (serovars) ปริมาณของเชื้อที่ถูกขับออกมาอาจมากถึง 100 ล้านตัวต่อปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร ลักษณะอาการแสดงของ Leptospirosis ชนิดรุนแรงเรียกว่า Weil's disease ซึ่งจะพบเลือดออกได้ในอวัยวะต่างๆ ตัวเหลือง ตับ และไตล้มเหลว และทำให้ถึงตาย เชื่อว่าการมีเลือดออกมากนั้นเกิดจากผนังหลอดเลือดฝอยถูกทำลาย

กลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรคนี้นั้น แม้ว่าไม่สามารถจะแยกจากผลที่เกิดจาก toxin ของเชื้อได้ แต่มีหลักฐานทั้งทางคลินิกและทางจุลกายวิภาคที่สนับสนุนว่าน่าจะเกิดจาก toxin ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการสลายของเชื้อ เพราะหลังจากเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้วประมาณ 3 วัน แม้ว่าจะให้ยาที่ทำให้จำนวนเชื้อลดลงแล้ว ก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพและการดำเนินโรคได้

เนื่องจากอาการทางคลินิกของโรค มีลักษณะที่ไม่จำเพาะมากนัก ซึ่งการวินิจฉัยของแพทย์ต้องอาศัยความชำนาญในการแยกผู้ป่วยจากกลุ่มของอาการไข้ไม่ทราบสาเหตุ (febrile disease) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาแอนติบอดีต่อเชื้อชนิดนี้ จึงมีความสำคัญในการช่วยแพทย์วินิจฉัยและทำการรักษา ซึ่งการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาของการทดสอบนี้ประกอบด้วยการตรวจกรอง (screening test) สำหรับการเฝ้าระวังโรคและค้นหาผู้ป่วยซึ่งใช้ในงานระบาดวิทยา และการตรวจวินิจฉัยเบื้องต้น กับการตรวจยืนยันผลซึ่งเป็นการตรวจหาซีโรวาร์ของเชื้อซึ่งจะมีความจำเพาะยิ่งขึ้น

สำหรับในปัจจุบันจากรายงานของการเฝ้าระวังโรคของกองระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุขพบผู้ป่วยประปรายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในรอบปี พ.ศ. 2528-2538 มีอัตราป่วยอยู่ในระหว่าง 0.17-0.50 ต่อแสนประชากร ในปี พ.ศ. 2539 พบว่ามีรายงานผู้ป่วยสูงขึ้น ต่อมาในปี พ.ศ. 2540-2541 พบว่ามีการระบาดมากขึ้นเกือบ 7 เท่า โดยมีอัตราป่วยต่อแสนประชากรเพิ่มขึ้นเป็น 3.84 และ 3.57 ตามลำดับ (ดุจดาว บุญยอด. 2544 : 508-15) และรายงานล่าสุดของสำนักระบาดวิทยาพบว่า ในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 3,199 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 5.12 ต่อประชากรแสนคน โดยมีอัตราป่วยตายถึงร้อยละ 1.4 (สำนักระบาดวิทยา. 2548)

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

1. การวินิจฉัยทางคลินิก

โดยตรวจวินิจฉัยจากอาการแสดง ประวัติการสัมผัสโรค การทำงาน แต่อาการจะไม่แน่นอน ยากต่อการวินิจฉัย เพราะบางครั้งผู้ป่วยก็อาจจะไม่มีอาการตัวเหลือง ดังนั้นโรคนี้เป็นโรคหนึ่งซึ่งควรคำนึงถึงเมื่อผู้ป่วยเกิดเป็นไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ

การวินิจฉัยแยกโรคทางคลินิก

ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ร่วมกับอาการที่ไม่บ่งเฉพาะ จำเป็นต้องแยกจากไข้หวัดใหญ่,ไข้จากการติดเชื้อไวรัส,ไข้ไม่ทราบสาเหตุ,ตับอักเสบ,ไข้ไทฟอยด์,มาลาเรีย,ไตอักเสบ,ไข้เลือดออก, สครับทัยฟัส, ไข้ร่วมกับอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบหรือสมองอักเสบ ต้องแยกโรคจากเยื่อหุ้มสมองอักเสบชนิดที่เกิดจากแบคทีเรีย และ ไวรัสไข้สมองอักเสบ หรือโปลิโอ บางครั้งอาการทางคลินิกแยกยากจากการติดเชื้อเยื่อหุ้มสมองอักเสบจากไวรัส การพบเลือดออกที่ตาหรือประวัติสัมผัสสัตว์อาจจะทำให้คิดถึงการติดเชื้อเลปโตสไปรามากกว่า การตรวจน้ำไขสันหลังและส่งตรวจทางซีโรโลยี จะสามารถแยกโรคได้

ไข้ร่วมกับอาการดีซ่าน ต้องแยกจากตับอักเสบจากเชื้อไวรัส มาลาเรีย หรือภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดอย่างรุนแรง โรคตับอักเสบจากไวรัสมักจะแยกยากที่สุดแต่การติดเชื้อเลปโตสไปรามักจะเริ่มเป็นไข้อย่างเฉียบพลัน ปวดศีรษะและปวดกล้ามเนื้อมาก เยื่อบุตาบวมแดง การตรวจพบไข่ขาวในปัสสาวะจะทำให้คิดถึงโรคเลปโตสไปโรซิสมากกว่า นอกจากนี้อาการไข้มักจะไม่พบหลังจากเหลืองแล้วในตับอักเสบจากไวรัส

ไข้ร่วมกับอาการเลือดออก ต้องแยกจากการติดเชื้อฮันตาไวรัส เนื่องจากลักษณะอาการทางคลินิกและระบาดวิทยาของโรคมีความคล้ายคลึงกันมาก อีกทั้งยังพบมีการติดเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน การแยกต้องอาศัยการส่งตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อฮันตาไวรัส ซึ่งมีรายงานการตรวจพบ

ปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในโรคดังกล่าว (Appassakij, H. 1995) นอกจากนี้ยังต้องแยกจากไข้เลือดออกเด็งกี่ อย่างไรก็ดีส่วนมากไข้เลือดออกเด็งกี่จะพบในเด็กและในภาวะที่ไข้ลดมักมีอาการช็อคตามมา

ไข้ร่วมกับอาการนำทางระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปราทำให้เกิดอาการอักเสบของหลอดเลือดในอวัยวะต่างๆ รวมทั้งระบบทางเดินอาหาร จึงอาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการคล้ายระบบทางเดินอาหารอักเสบ และ acute abdominal emergency ได้

2. วิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส

มีหลักการตรวจ 2 ลักษณะ ได้แก่

2.1 การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากตัวอย่างส่งตรวจ ได้แก่

- การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่าง เช่น เลือด ปัสสาวะและน้ำไขสันหลังโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope) หรือย้อมสีด้วย Giemsa หรือ silver staining การตรวจวิธีนี้มีข้อผิดพลาดสูง เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่ไม่จำเพาะและไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อเลปโตสไปรากับสิ่งปลอมปนอื่น ๆ โดยเฉพาะในปัสสาวะ
- การเพาะแยกเชื้อจากเลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง หรืออวัยวะต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษสำหรับเชื้อเลปโตสไปรา คือ EMJH medium (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris)(Difco) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสำคัญ สามารถแสดงเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้โดยตรงและควรทำควบคู่ไปกับการวินิจฉัยโดยวิธีอื่นๆ ด้วยทุกครั้ง
- การฉีดเข้าสัตว์ทดลอง โดยการนำเลือดผู้ป่วยหรือตะกอนปัสสาวะฉีดเข้าช่องท้องสัตว์ทดลองประเภทหนูแฮมสเตอร์หรือหนูตะเภาที่เพิ่งหย่านม สัตว์ทดลองจะป่วย ดูดน้ำในช่องท้องหรือเจาะเลือดสัตว์เพื่อตรวจดูเชื้อโดยตรงหรือนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าสัตว์ตายนำชิ้นเนื้อจากตับและไตมาเพาะเชื้อ
- การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา โดยอาศัยเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอหรือเทคนิคที่เรียกว่า PCR (polymerase chain reaction) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาเชื้อได้ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของโรค แต่เป็นวิธีที่ต้องอาศัยเทคนิคเฉพาะ ราคาแพง และต้องการความชำนาญสูง ส่วนใหญ่วิธีนี้ยังจำกัดอยู่เฉพาะในงานวิจัยมากกว่าการวินิจฉัยโรค

2.2 การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเลปโตสไปราในซีรัม ซึ่งเป็นการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา

โดยปกติแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากเริ่มแสดงอาการไปแล้ว 1 สัปดาห์และมีระดับสูงสุดภายใน 4 สัปดาห์ ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีจึงควรตรวจจากซีรัมคู่ ที่เก็บห่างกันอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อหา four-fold rising titer ซึ่งแสดงถึงการเป็นโรคการตรวจหาแอนติบอดีมีอยู่ด้วยกัน

หลายวิธี เช่น Microscopic agglutination test (MAT), Indirect hemagglutination test (IHA), Macroscopic slide agglutination test (MSAT), Indirect fluorescent antibody technique (IFA), Microcapsule agglutination test (MCAT), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นต้น

2.2.1 Microscopic agglutination test (MAT) (ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล. 2543)

หลักการนี้เป็นวิธีมาตรฐาน สำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสโดยจะใช้เชื้อ Leptospira 26 ซีโรวาร์ (serovars) เป็นแอนติเจน ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อ Leptospira ในซีรัมของผู้ป่วย เกิดปฏิกิริยา agglutination เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สนามมืด (darkfield microscope) ผลบวกจะเกิดการจับกลุ่มของเชื้อ Leptospira การตรวจทุกครั้งจะทำ positive และ negative control อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่ ยุ่งยากต้องใช้เชื้อหลาย ซีโรวาร์ และเป็น live antigen ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการหลายแห่งได้จึงมีการตรวจเฉพาะในระดับโรงพยาบาลขนาดใหญ่ หรือ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์

2.2.2 Indirect hemagglutination test (IHA) (สำนักงานควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส. 2544)

เป็นวิธีตรวจคัดกรองอย่างง่าย หลักการนี้จะนำแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรามาเคลือบบนเม็ดเลือดแดงคนกรุป "O" แล้วทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของคน เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) ในกรณีที่ให้ผลบวก จะเจือจางซีรัม two-fold serial dilution โดยเริ่มจาก dilution 1:50 ไปเรื่อยๆ เพื่อดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงที่ปฏิกิริยาสูงสุดเป็นไตเตอร์(titration procedure) IHA ให้ผล ความไว ความจำเพาะ และความถูกต้อง เท่ากับ 83, 97.5 และ92.7% ตามลำดับ ผลจากงานวิจัยสรุปได้ว่าวิธี IHA เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก ตรวจวินิจฉัยตัวอย่างจำนวนมากได้ โดยสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์พิเศษในการตรวจวินิจฉัย (สิริพรรณ แสงอรุณ. 2542)

2.2.3 วิธี Macroscopic slide agglutination test (MSAT) (ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล. 2543)

หลักการนี้ใช้แอนติเจนความเข้มข้นสูงโดยทำให้เชื้อตายด้วยความร้อนหรือฟอร์มาลิน (heat or formalin killed concentrated antigen) ผสมกับซีรัมบนสไลด์ ในปริมาณที่เท่าๆกัน ซีรัมที่ให้ผลบวกจะทำปฏิกิริยา agglutination กับแอนติเจนบนสไลด์ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่ำกว่า MAT และมักเกิดผลบวกปลอมได้ง่ายถ้าขาดการควบคุมคุณภาพในการเตรียมแอนติเจน แต่เป็นวิธีที่เตรียมได้ง่าย ขั้นตอนสะดวกไม่ยุ่งยาก รวดเร็วและให้ผลดีสำหรับการตรวจในระยะเริ่มแรกของโรค

2.2.4 วิธี Indirect immunofluorescent antibody (IFA) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

หลักการนี้ แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของเชื้อที่เคลือบบนสไลด์หลุม ตรวจวัดปฏิกิริยาด้วยสารเรืองแสง fluorescein labeled anti-human IgM หรือ IgG ดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง

2.2.5 วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

หลักการนี้ แอนติเจนของเชื้อ Leptospira ถูก coat บน ELISA plate เมื่อเติมซีรัมของผู้ป่วยที่ถูกทำให้เจือจาง นำไป incubate หลังจากนั้นเติม peroxidase conjugated anti-human IgG หรือ IgM วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader (ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล. 2543) นอกจากนี้ได้มีผู้พัฒนาวิธีดังกล่าวให้สะดวกในการใช้งานภาคสนามโดยเปลี่ยนมาใช้ insoluble substrate แทน soluble substrate ในวิธี ELISA แบบเดิมเป็น dot ELISA โดยสกัดแอนติเจนด้วยเอธานอล แล้วนำมาทดสอบกับซีรัมที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT พบว่าให้ผลการทดสอบดี ซึ่งผู้วิจัยได้ให้ข้อเสนอแนะว่า ควรตรวจหา IgM ซึ่งจะมีความจำเพาะและความไวสูงสำหรับการวินิจฉัยในช่วง acute phase ซึ่งศันสนีย์ และคณะ ได้ทำการตรวจหา IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยใช้แอนติเจนที่สกัดอย่างหยาบจากเชื้อซีโรวาร์ biflexa ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่ก่อโรคแต่ให้ผลการทดสอบข้ามกลุ่มกับสายพันธุ์ก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของการอ่านผลด้วยตาเปล่า (subjective reading) ซึ่งควรจะต้องมีการพัฒนาวิธีการทดสอบที่เหมาะสมเพิ่มเติมต่อไป (ศันสนีย์ ตันติ์จธัม. 2550)

2.2.6 วิธี Immunochromatography (Lepto-Dipstick test) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

หลักการนี้ แอนติเจนของเชื้อ Leptospira จะถูกเคลือบบนแผ่น nitrocellulose ร่วมกับ antihuman IgM dye conjugated ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วย จะเกิดสีชมพูซึ่งมองเห็นได้ชัด

2.2.7 วิธี Microcapsule agglutination test (MCAT) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

หลักการนี้ แอนติเจนของเชื้อ Leptospira ได้แก่ *L.autumnalis, L.hebdomadis, L.australis, L.icterohaemorrhagiae, L. canicola* และ *L. pyrogenes* จะถูกเคลือบบน microcapsule (MC) particle จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมของผู้ป่วยเกิด passive agglutination reaction

3. ชุดตรวจสำเร็จสำหรับโรคเลปโตสไปโรซิส (Commercial test kits) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. 2543)

ชุดตรวจสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ในปัจจุบันมีหลายชนิดหลายวิธีการตรวจ และหลายประเทศผู้ผลิต ซึ่งฝ่ายพยาธิวิทยาคลินิก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ทำการทดสอบและประเมินผลการนำมาใช้กับตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศไทยแล้ว มีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 : ผลิตภัณฑ์น้ำยาชุดสำเร็จสำหรับการตรวจหาแอนติบอดีโรคเลปโตสไปโรซิส ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย (ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล. 2543)

ชื่อผลิตภัณฑ์	บริษัท ผู้ผลิต/ประเทศ	ระยะเวลา ในการตรวจ	ราคาต่อเทสต์	บริษัทผู้นำเข้าผลิตภัณฑ์
H.S. Leptospira Antigen(MSAT)	Sanofi/France	4 นาที	40 บาท	ซาโนฟี ไทยแลนด์ โทร. 2488300
Leptospirosis IHA	MRL Diagnostics/USA	2 ชั่วโมง	200 บาท	บ. วอร์ดเมดิก โทร. 3198000-2
IgG/IgM LEPTOELISA	-	2-3 ชั่วโมง	160 บาท	บ.ไทยแคนไบโอเทค โทร 6830120-3
Leptospira IgM ELISA	Panbio/Australia	2-3 ชั่วโมง	180 บาท	บ. ไวเกอร์ชายน์ โทร. 6830121-3
Dip-Stick Leptospira	Integrated Diagnostics/USA	½-1 ชั่วโมง	200 บาท	-
Lepto Dipstick	Oganon/Belgium	3 ชั่วโมง	110 บาท	บ. ออกานอน ไทยแลนด์ โทร. 6533133-44

ในการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการตรวจและการเปรียบเทียบระหว่างวิธีการตรวจพบว่า

ในปี ค.ศ.1995 คณะวิจัยของ Appassakij H และคณะ (Appassakij, H. 1995) ทำการทดลองตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี IFA เทียบกับวิธี microscopic agglutination test (MAT) โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส 175 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 58 รายต่อ MAT ในระยะเริ่มต้นโดยวิธี IFA มีค่า titer$\geq$1:100 ค่าความจำเพาะ = 0.97 และค่าความไวสูงกว่าระยะสุดท้ายโดยวิธี MA ค่าความไว = 0.48 117 ตัวอย่างให้ผลลบโดย MAT

101 คนที่มีสุขภาพดี 93 รายที่เป็นโรค 5 โรคที่พบได้บ่อยให้ผลไม่ชัดเจน ในคนไข้โรคเลปโตสไปโรซิส ให้ผลบวกโดยมีค่า titer ≥1:400 แต่สามารถพบปฏิกิริยา cross–reaction ได้กับโรค syphilis โดยการตรวจจะให้ผลตั้งแต่อาทิตย์แรกของการป่วย และมีระดับสูงสุดในช่วง 4 สัปดาห์ของการป่วย โดยทั่วไปค่า titer จะลดลงจาก 1:400 หลังจากสี่เดือน จากการทดลองพบว่าค่าความไวและค่าความจำเพาะ อยู่ในระดับปานกลาง

ในปี พ.ศ. 2541 คณะวิจัยของ วินิตา บริราช และคณะ (วินิตา บริราช. 2541) ทำการวิจัยตรวจหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปรา ด้วยวิธี IFA เทียบกับวิธี MAT โดยทำการแบ่งกลุ่ม ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส 54 ราย พบว่าให้ผลบวกต่อวิธี IFA และ MAT เหมือนกัน กลุ่มผู้สงสัยว่าจะเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส 103 ราย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นไข้โดยไม่ทราบสาเหตุ 52 ราย และกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบบี 51 ราย พบว่าให้ผลบวกว่ามีแอนติบอดีต่อเลปโตสไปรา 22 ราย และ 14 ราย ตามลำดับด้วยวิธี IFA ซึ่งให้ผลบวกมากกว่าMAT 5 รายทั้ง 2 กลุ่ม จากกลุ่มของคนปกติทั้งหมด 100 ราย ให้ผลบวกต่อ IFA 10 ราย ให้ผลบวกต่อ MAT 6 ราย จากการวินิจฉัยพบว่าวิธี IFA และ MAT ให้ผลใกล้เคียงกัน วิธี IFA ให้ค่าความไว = 100% ความจำเพาะ = 90% และค่าความถูกต้อง = 94% วิธี MAT ให้ค่าความไว = 100% ค่าความจำเพาะ = 94% และค่าความถูกต้อง = 96% จากการศึกษาพบว่าเป็นวิธีที่มีความไว วิธีการทำไม่ยุ่งยาก เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองโรคเลปโตสไปโรซิส แต่วิธี MAT เป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจยืนยันเพื่อประโยชน์ในการเฝ้าระวังโรค เพราะสามารถตรวจได้ว่าเกิดจาก serotype ใด

ในปี ค.ศ. 2000 คณะวิจัยของ Wagenaar J, Zuerner RL, Alt D, Bolin CA. (Wagenaar, J. 2000) ของประเทศ เนเธอร์แลนด์ ได้ศึกษาเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะ ของวิธี IFA เทียบกับวิธี PCR โดยหาแอนติบอดีต่อ *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo ในปัสสาวะหมู และเปรียบเทียบผลของวิธี PCR กับผลของวิธี IFA วิธี nucleic acid hybridization และวิธี bacteriologic culture ผลการทดลองพบว่าวิธี PCR ให้ค่าความจำเพาะเท่ากับ 100% ค่าความไวเท่ากับ 91% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ค่าความไวของวิธี nucleic acid hybridization เท่ากับ 55% ในทางตรงกันข้าม ค่าความไวของวิธี bacteriologic culture เท่ากับ 83% และวิธี IFA เท่ากับ 93% จากการศึกษานี้พบว่าค่าความไวว่าวิธี PCR และ IFA มีความไวสูงในการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

ในปี ค.ศ.2000 คณะวิจัยของ Hatta M (Hatta, M. 2000) ศึกษาการใช้ Lepto-dipstick specific IgM ทำการทดลองโดยใช้ผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลทั้งหมด 403 ราย ที่มีอาการไข้ และมีผู้ป่วยที่มีอาการไข้และอาการทางคลินิกของโรคเลปโตสไปโรซิส 35 ราย และเมื่อทำการตรวจยืนยัน

โดยวิธี MAT แล้วพบว่ามี 24 ราย ที่ให้ผลบวกที่ตรงกัน และมีอีก 8 รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT หรือ dipstick เมื่อนำมาคำนวณหาค่าความไวได้เท่ากับ 91.6% และค่าความจำเพาะได้เท่ากับ 93.6%

ข้อดี คือ เป็นวิธีทำที่ง่าย รวดเร็ว แถบสีที่เกิดขึ้นชัดเจน อ่านผลได้ง่าย เหมาะสำหรับตรวจผู้ที่อยู่ในแหล่งระบาดของโรค แต่ข้อจำกัดของวิธีดังกล่าวคือ ราคาต่อหน่วยที่ค่อนข้างสูง

ในปี ค.ศ. 1998 คณะวิจัยของ Suputtamongkol Y, Sarawish S, Silopasakorn S, Potha U, Silpapojakul K, Naigowit P (Suputtamongkol, Y . 1998) ทำการทดสอบวิธี MCAT โดยใช้ซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่ได้รับการตรวจยืนยันโดยวิธี MAT หรือ IFA ทั้งหมด 82 ตัวอย่าง พบว่าให้ค่าความไวเท่ากับ 90.2% ค่าความจำเพาะเท่ากับ 96.3% มีข้อดี คือ ทำได้ง่ายไม่ต้องอาศัยผู้ชำนาญงาน เหมาะสำหรับตรวจกรอง อ่านผลได้ภายใน 3 ชั่วโมง

ในปี ค.ศ.1992 คณะวิจัยของ Silva MV, Dias Camargo E, Vaz AJ, Batista L ที่ Sao Paulo, Brazil (Silva, MV. 1992) ทำการทดลองโดยใช้ paired saliva และ paired sera ของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ทำการตรวจหา IgM antibody โดยวิธี ELISA พบว่าในน้ำลายให้ผลบวก 87.5% ส่วนในซีรัมให้ผลบวก 100% จากการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้ทดลองพบว่าประสบความสำเร็จมาก เพราะสามารถใช้น้ำลายในการตรวจหาแอนติบอดีได้อีกวิธีหนึ่ง

ในปี ค.ศ.1997 คณะวิจัยของ Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, Brandao AP. ที่ Sao Paulo, Brazil ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับวิธี dot–ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM, IgG และ IgA โดยทำการศึกษาจากซีรัมของผู้ป่วยที่เป็นโรคเลปโตสไปโรซิสทั้งหมด 63 ราย พบว่าซีรัมที่เก็บในระยะที่เริ่มมีอาการของโรค (ประมาณ 7 วัน) โดยตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM พบว่ามีความไว 98% โดยถ้าเป็น IgG จะมีความไว 70% ส่วน IgA เป็น 76% ส่วนซีรัมที่เก็บในระยะหลังของการเป็นโรค (หลังจากเป็นโรคแล้ว 6 เดือน) พบว่าระดับของ IgM ยังคงสูงอยู่ แต่หลังจากนั้น 10 เดือนพบว่าความไวของ IgM ลดลงเหลือ 57% IgG ก็ยังคงตรวจพบหลังจากโรค 4 เดือนจนถึงระยะสุดท้ายของการติดตามโรค ส่วน IgA สามารถตรวจพบได้ในคนไข้ทุกคนตั้งแต่ 1 เดือน จนถึง 6 เดือนของโรค จากการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยพบว่า วิธี dot–ELISA เหมาะเป็นการตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการ และวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ซึ่งมีข้อดี คือ ให้ผลชัดเจน รวดเร็ว และราคาไม่แพง อย่างไรก็ตามพบว่า การอ่านผลของวิธี dot ELISA เป็นลักษณะของ subjective คือไม่มีค่า cut off เป็นจุดตัด แต่อาศัยการอ่านสีจากสายตา ซึ่งมีปัญหาในการแปลผลสำหรับกลุ่มที่ผลการตรวจเป็น weak (Silva, MV. 1997)

ในปี ค.ศ.1999 คณะผู้วิจัยของ Ramadass P, Samuel B, Nachimuthu K (Ramadass, P. 1999) ได้ทดลองหาแอนติบอดีต่อโรคเลปโตสไปโรซิส โดยวิธี latex agglutination เทียบกับวิธี ELISA เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรองโรค ในการทดลองนี้ได้ใช้ซีรัมของคน 276 ตัวอย่าง พบว่าให้

ผลบวกโดยวิธี LA 84.8% และให้ผลบวกโดยวิธี ELISA 85.9% และซีรัมสัตว์ 65 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวกโดยวิธี LA 63.1% และให้ผลบวกโดยวิธี ELISA 69.2% พบว่าค่าความไวของทั้งสองวิธี ELISA สูงกว่าวิธี LA เล็กน้อย จากศึกษาของคณะผู้ทำวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จเพราะว่าวิธี LA เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและราคาไม่แพง เหมาะแก่การนำไปตรวจกรองโรคนี้

ในปี ค.ศ. 2000 คณะผู้วิจัยของ Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. ได้ทดลองน้ำยา latex agglutination ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในการหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปร่า โดยใช้ซีรัมกับน้ำยาในปริมาณที่เท่าๆ กัน สามารถอ่านผลได้ใน 2 นาที โดยใช้ซีรัมจาก Hawaii, Thailand และ Netherlands พบว่ามีค่าความไว 82.3% ค่าความจำเพาะ 94.6% พบว่าวิธีนี้เหมาะสำหรับการตรวจในการใช้เป็นการตรวจกรองโรค (Smits, HL. 2000)

สำหรับวิธี immunoperoxidase ซึ่งเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจโดยอาศัยปฏิกิริยาการติดฉลากด้วยเอนไซม์โดยใช้พื้นผิวยึดเกาะเป็นสไลด์แก้วและอ่านผลจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา วิธีนี้มีผู้นำมาพัฒนาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อทาง serodiagnosis หลายชนิดด้วยกัน เช่น Kelly DJ และคณะได้พัฒนาวิธีการดังกล่าวเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคสครับไทฟัส (Kelly, DJ et all. 1988) การวินิจฉัยการติดเชื้อ herpesvirus จากน้ำเหลืองโดยวิธี indirect immunoperoxidase (IIP) และจากชิ้นเนื้อ โดยวิธี direct immunoperoxidase (Origgi, FC. 2003) ในขณะที่ Chimsumang S และคณะได้พัฒนาวิธีดังกล่าวเพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส โดยใช้แอนติเจนจากเชื้อ *leptospira biflexa* aerovar patoc และใช้คอนจูเกตชนิด Anti human IgG, IgA และ IgM แต่พบว่ายังมีผลจากปฏิกิริยาข้ามกลุ่มในโรคมาลาเรีย ไข้ไทฟอยด์ และ สครับไทฟัสในระดับไตเตอร์ ตั้งแต่ 1:400 ลงมาโดยมีความจำเพาะในระดับ 76.8% (Chimsumang, S. 2005)

อย่างไรก็ตามการแปลผลการตรวจทาง serology ในประเทศที่มีโรคอยู่ประจำถิ่น มักจะทำได้ค่อนข้างยุ่งยาก จึงควรพิจารณาปัจจัยดังต่อไปนี้ประกอบไปด้วย ได้แก่

- คนไข้อาจเคยติดเชื้อนี้มาก่อน ซึ่งระดับแอนติบอดียังอาจหลงเหลืออยู่ที่ระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 10 จนถึงมากกว่าหรือเท่ากับ 1,000 ในการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อใหม่จึงต้องตรวจซีรัม 2 ครั้ง ซึ่งจะพบการเพิ่มของไตเตอร์อย่างน้อย 4 เท่า

- การที่คนไข้ได้รับยาปฏิชีวนะเร็ว อาจทำให้แอนติบอดีปรากฏล่าช้าไปหลายสัปดาห์หรือไม่ปรากฏขึ้นเลย (กรณีนี้การเพาะแยกเชื้อจะช่วยวินิจฉัยแยกโรคได้)

- เชื้อแต่ละชนิดอาจมีลักษณะเฉพาะที่สัมพันธ์กับระดับไตเตอร์ที่ตรวจพบ เช่น *L.hardjo* มักพบ ไตเตอร์ต่ำที่ 800-3,200 ขณะที่ *L.copenhageni* มักพบไตเตอร์สูงที่ $\geq$ 1,000-10,000

- เชื้อบางตัวอาจมีปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อชนิดอื่นๆ ด้วย

- การพบไตเตอร์ต่ำๆ หรือแม้แต่ไตเตอร์สูงๆ จากการตรวจโดยวิธี MAT อาจไม่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Leptospira* ในปัจจุบัน

- การตรวจโดยวิธี MAT ควรใช้แอนติเจนซีโรวาร์ที่เป็นตัวแทนของทั้ง 23 serogroup และควรใช้ isolates ที่เตรียมจากคนไข้ในท้องถิ่น

- ในกรณีที่การทดสอบทาง serology มี cross reaction ระหว่างเชื้อหลายชนิด การเพาะแยกเชื้อจะช่วยการแปลผลได้

ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* ยังมีความสำคัญอยู่มาก เพราะโรคนี้เป็นหนึ่งในโรคที่อยู่ในการเฝ้าระวังของกระทรวงสาธารณสุข จึงมีการศึกษาวิจัยและพยายามที่จะพัฒนาวิธีการตรวจทาง serology เพื่อให้มีความไวและความถูกต้องมากที่สุด

การตรวจวินิจฉัยในด้านอื่นๆ

การตรวจร่างกายจะช่วยในการพิจารณาให้การรักษาที่เหมาะสม ได้แก่ การทดสอบ blood count, serum electrolytes, liver function test, urinalysis, bleeding time และ prothrombin time ร่วมกับการทำ chest X- ray และ electrocardiogram

นอกจากนี้ควรตรวจ blood pressure, temperature, pulse และ respiratory rates ทุกชั่วโมงในระยะแรก ต่อมาทุก 4 ชั่วโมง และวัด urine volume อย่างสม่ำเสมอ

ตัวอย่างผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นๆที่ไม่ใช่การตรวจทางซีรัม

1. ในรายที่ไม่มีเลือดออก จำนวนเม็ดเลือดแดง และระดับฮีโมโกลบินจะปกติ

2. ผู้ป่วยที่มีอาการเหลือง จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้นอยู่ระหว่าง 11,000-20,000 ($11\text{-}20\times10^{9}$/liter)

3. จำนวนเกล็ดเลือดมักต่ำกว่า 100,000/mm^3

4. ESR เพิ่มขึ้น

5. ค่า BUN และ creatinine เพิ่มขึ้นแม้ผู้ป่วยจะมีอาการไม่รุนแรง

6. ระดับ bilirubin สูง serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) มักปกติหรือสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย (เป็นประโยชน์ในการวินิจฉัยแยกจากโรคตับอักเสบ ซึ่งมักจะพบระดับ SGPT สูงขึ้นชัดเจนมาก

7. พบไข่ขาวในปัสสาวะทุกระยะของโรค นอกจากนี้ยังอาจตรวจพบ pyuria, hematuria, hyaline casts , granular casts แต่ไม่พบ red cell casts อาจตรวจพบน้ำดีในปัสสาวะ

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

การรักษาผู้ป่วย

1. การให้ยาปฏิชีวนะ

การเลือกใช้ยาขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคและสภาวะของผู้ป่วย สามารถแบ่งการให้ยาปฏิชีวนะเป็นสองกลุ่มใหญ่คือ

1.1 ผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรง

Penicillin G เป็นยาที่ให้ผลดีที่สุด ขนาดของ Penicillin G ที่ใช้ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ใช้ในขนาดสูงคือ 6 ล้านยูนิต/วัน โดยแบ่งให้ 1.5 ล้านยูนิต ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

Ampicillin ชนิดฉีดเข้าหลอดเลือดดำ ขนาดที่ใช้ 4 กรัมต่อวันโดยแบ่งให้ 1 กรัม ทุก 6 ชั่วโมง ติดต่อกัน 7 วัน

1.2 ผู้ป่วยอาการอ่อนถึงปานกลาง

Doxycycline กิน 11 mg วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน

Amoxycilline กิน 500 mg ทุก 6 ชั่วโมง นาน 5-7 วัน

Ampicillin กิน 500-750 mg ทุก 6 ชั่วโมง นาน 5-7 วัน

2. การรักษาตามอาการ

-การให้ยาลดไข้

- การให้ยาแก้ปวด ในต่างประเทศพบว่าบางรายต้องใช้ยาที่มีฤทธิ์ เช่น pethidine แต่ในประเทศไทยยังไม่พบว่ามีอาการปวดกล้ามเนื้อมากจนต้องใช้ยาแก้ปวดประเภทฤทธิ์สูง

- การให้ diazepam เข้าหลอดเลือด เพื่อควบคุมอาการชัก

- รายที่มีอาการทางประสาท เช่น หูแว่ว ประสาทหลอน ไม่ควรให้ largactil เพราะทำให้ไม่ทราบการตอบสนองต่อการรักษาของคนไข้และมีผลต่อตับ ถ้าจำเป็นอาจฉีด hadol 5 mg เข้ากล้ามเนื้อ

- การให้ยาแก้อาเจียน (anti-emetics) ในรายที่มีอาเจียนมาก

- การให้สารละลายและเกลือแร่ (fluid and electrolytes) หรือให้ isotonic saline

3. การรักษาภาวะแทรกซ้อน

- การแก้ไขภาวะเลือด กรณีมีภาวะโลหิตจาง ควรให้เลือด(blood transfusion) หรือให้ plasma และถ้าพบเกล็ดเลือดต่ำรุนแรง การให้เกล็ดเลือดจะดีกว่าการให้สเตียรอยด์ ซึ่งไม่มีผลดีในการรักษา

- การแก้อาการแทรกซ้อนที่ระบบหายใจ ใช้การเฝ้าสังเกตอาการผู้ป่วยและแก้ไขตามอาการอย่างใกล้ชิด

- การแก้สภาวะการทำงานของหัวใจผิดปกติ โดยการสังเกตอาการผู้ป่วยใกล้ชิด ซึ่งโดยทั่วไปอาการหัวใจเต้นผิดปกติอย่างอ่อน มักจะเกิดขึ้นชั่วคราว และหายได้เองโดยไม่ต้องรักษา จึงไม่ควรให้ cardiotonic เพราะอาจจะกระตุ้นให้เกิด fatal arrhythmia ได้

- การแก้ปัญหาตับวาย ทำโดยงดอาหารโปรตีน การรักษาสมดุลของ electrolytes และหลีกเลี่ยงการใช้ยาที่มีผลต่อตับ

- โดยทั่วไป ไตวายเฉียบพลันในโรคเลปโตสไปโรซิส เป็น non-oliguric renal failure ซึ่งอาจไม่ต้องล้างไตก็ได้ แต่ถ้าผู้ป่วยมีภาวะไตวายที่ยืดเยื้อ และมีปัสสาวะน้อย ซึ่งมักเกิดจาก acute tubular necrosis ต้องพิจารณาทำ dialysis ซึ่งควรเลือกทำ peritoneal dialysis มากกว่าที่จะทำ haemodialysis เพราะง่ายและรวดเร็วกว่า ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงรวมทั้งบุคลากรที่ฝึกฝนมาอย่างดี สำหรับในรายที่มีภาวะเลือดออกควรทำ hemodialysis ก่อน ถ้าไม่สามารถทำได้ จึงพิจารณาทำ peritoneal dialysis แต่ต้องแก้ไขภาวะเลือดออกก่อนและต้องทำด้วยความระมัดระวัง ทั้งนี้เนื่องจากในการทำ peritoneal dialysis ส่วนใหญ่จำเป็นต้องให้ heparin เพื่อป้องกัน fibrin clot ที่ Trocath (สุจิตรา นิมมานนิตย์. 2527 : 69-78)

ความไวและความต้านทานต่อการรับเชื้อ

คนมีความไวต่อโรคนี้ ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อ หรือการฉีดวัคซีนจะมีผลต้านทาน serovar นั้นๆ แต่อาจไม่สามารถป้องกันการติดโรคจาก serovar อื่นๆ ได้ (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ. 2527 : 50)

แหล่งรังโรค

ทั้งสัตว์ป่าและสัตว์เลี้ยงเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญ ซึ่งแตกต่างตามชนิดของเชื้อ (serovar) ได้แก่ หนู (*L.icterohemorrhagiae*), สุกร (*L.pomona*), โค กระบือ (*L.hardijo*), สุนัข (*L.canicola*) และแรคคูน (*L.autumnalis*) เชื้อที่พบในสัตว์เลื้อยคลานและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น กบ ไม่เคยมีรายงานแพร่โรคมาสู่คน สัตว์ที่เป็นพาหะอาจไม่แสดงอาการแต่มีการติดเชื้อที่ท่อไต (renal tubule) ทำให้มีการปล่อยเชื้อออกมากับปัสสาวะได้เป็นเวลานาน (บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ. 2527 : 50)

วิธีการป้องกันและหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อ

1. ดื่มน้ำต้มสุกและบริโภคอาหารที่ปรุงสุกใหม่ด้วยความร้อน
2. หมั่นล้างมือภายหลังจับต้องเนื้อซากสัตว์และสัตว์ทุกชนิด

3. ในพื้นที่เสี่ยง ควรหลีกเลี่ยงการแช่ หรือลุยน้ำที่อาจปนเปื้อนเชื้อจากปัสสาวะสัตว์นำโรค ถ้าจำเป็น ควรสวมรองเท้าบู๊ตและเมื่อขึ้นจากน้ำแล้ว ต้องรีบอาบน้ำชำระร่างกายให้สะอาดทันที

4. ปกปิดอาหารและน้ำไม่ให้หนูมาปัสสาวะรดได้

5. ใช้เครื่องนุ่งห่มป้องกัน เช่น สวมรองเท้าบู๊ตยาง สวมเสื้อแขนยาว กางเกงขายาว

6. การฉีดวัคซีนป้องกันแก่ผู้ที่ประกอบอาชีพเสี่ยงต่อโรค

7. ให้ยา doxycycline ป้องกันโรคโดยให้รับประทานยา 200 มิลลิกรัม สัปดาห์ละครั้ง

8. บุคลากรที่ดูแลผู้ป่วย ควรระมัดระวังการสัมผัสเลือดและสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยและสิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อนปัสสาวะของผู้ป่วย ต้องนำไปฆ่าเชื้อ

วิธีการควบคุมโรค

ก. มาตรการป้องกันโรค

1. ให้สุขศึกษาแก่ประชาชนถึงวิธีการติดต่อของโรค หลีกเลี่ยงการว่ายน้ำ แช่หรือลุยในน้ำที่อาจปนเปื้อนเชื้อจากปัสสาวะสัตว์นำโรค หรือถ้าจำเป็นควรสวมรองเท้าบู๊ต

2. ให้การป้องกันโรคแก่ผู้ที่ทำงานเสี่ยงต่อโรค เช่น ใช้ถุงมือยาง รองเท้าบู๊ต ฯลฯ

3. ตรวจแหล่งน้ำ ดินทรายที่อาจปนเปื้อนเชื้อ ถ้าเป็นน้ำในท่อระบาย ควรล้างระบายน้ำที่ปนเปื้อนออกไป

4. ถ้าพบสัตว์ติดเชื้อต้องแยกออกเพื่อป้องกันไม่ให้แพร่เชื้อไปยังสัตว์ตัวอื่น ๆ หรือเกิดการปนเปื้อนเชื้อบริเวณที่อยู่อาศัย สถานที่ทำงาน แหล่งพักผ่อนท่องเที่ยว ฯลฯ

5. ควบคุมกำจัดหนูในบริเวณที่อยู่อาศัยของคน โดยเฉพาะในเขตชนบท บริเวณที่อยู่อาศัย สถานที่ทำงาน แหล่งพักผ่อนท่องเที่ยว ฯลฯ

6. ฉีดวัคซีนป้องกันโรคแก่ปศุสัตว์ (เช่น โค กระบือ) และสัตว์เลี้ยง (เช่น สุนัข) จะช่วยป้องกันโรคได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อและการขับเชื้อทางปัสสาวะได้ วัคซีนที่ใช้ต้องมีซีโรวาร์ ที่พบมากในท้องถิ่นนั้น

7. การฉีดวัคซีนป้องกันแก่คนงานและผู้ที่ประกอบอาชีพเสี่ยงต่อโรค เป็นวิธีที่ใช้ในญี่ปุ่น จีน อิตาลี สเปน ฝรั่งเศส และอิสราเอล

8. การใช้ยา doxycycline ในประเทศปานามา พบว่าได้ผลป้องกันโรคได้ดี โดยให้รับประทาน 200 มก. สัปดาห์ละครั้ง ในระหว่างที่อยู่ในพื้นที่เสี่ยงโรคสูง

ข. การควบคุมผู้ป่วย ผู้สัมผัส และสิ่งแวดล้อม

1. การรายงานโรค : เมื่อพบผู้ป่วยต้องแจ้งโรคไปยังเจ้าหน้าที่สาธารณสุขในท้องถิ่น

2. การแยกผู้ป่วย : ระมัดระวังการสัมผัสเลือดและสารคัดหลั่งจากผู้ป่วย

3. การทำลายเชื้อ : สิ่งของเครื่องใช้ที่ปนเปื้อนปัสสาวะ ต้องนำไปฆ่าเชื้อ

4. การกักกัน: ไม่จำเป็น

5. การให้ภูมิคุ้มกันแก่ผู้สัมผัส : ไม่จำเป็น

6. การสอบสวนผู้สัมผัสและแหล่งโรค : ค้นหาแหล่งที่มาของสัตว์หรือแหล่งน้ำที่ปนเปื้อน

7. การรักษา : penicillins, cephalosporins, lincomycin, และ erythromycin ฆ่าเชื้อได้ในห้องทดลอง และการศึกษาในผู้ป่วยพบว่าการใช้ doxycycline, penicillin G และ amoxycillin ได้ผลดี แม้จะให้ช้าถึง 7 วันหลังเริ่มป่วย

ค. มาตรการเมื่อเกิดการระบาด : ค้นหาแหล่งที่มาของการติดเชื้อ เช่น แหล่งน้ำ ฟาร์ม และโรงงาน รวมทั้งสัตว์ที่ติดเชื้อ แล้วแก้ไขการปนเปื้อนเชื้อหรือห้ามการใช้ชั่วคราว

ง. ความเสียหายที่อาจจะเกิด : อาจเกิดโรคระบาดในขณะเกิดน้ำท่วมในพื้นที่ที่มีระดับน้ำสูงและขังอยู่นาน

จ. มาตรการควบคุมโรคระหว่างประเทศ : ประสานความร่วมมือกับองค์การอนามัยโลก (สุจิตรา นิมมานนิตย์. 2527 : 69-78)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษา

ใช้เชื้อ *Leptospira interogan* serovar sejroe, bratislarva, louisiana และ autumnalis ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จังหวัดอุดรธานี สำหรับเตรียมเป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

การเตรียมแอนติเจนจากเชื้อ *Leptospira* ดังกล่าว ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน EMJH (Ellinghausen and McCullough, Modified by Johnson and Harris) medium ที่อุณหภูมิ 28-30^{o}C ในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และนำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ปริมาณ 10^{7} organism/ml (สำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส. 2544) และนำเชื้อที่ได้จากแต่ละซีโรวาร์มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากนั้นเติม 20% yolk sac 30 µl ต่อส่วนผสมเชื้อ 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาหยดลงบนสไลด์หลุมจำนวน 10 µl/ หลุม ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปแช่อะซีโตนที่อุณหภูมิ 4^{o}C เพื่อให้แอนติเจนที่เตรียมได้ติดอยู่บนสไลด์ ก่อนจะนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70^{o}C สำหรับนำมาทดสอบกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย

2. ตัวอย่างซีรัมทดสอบ

ตัวอย่างซีรัมเพื่อใช้ในการศึกษารวมทั้งสิ้น 111 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

2.1 กลุ่มตัวอย่างผู้ป่วย (case) ซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่ไม่ได้ระบุว่าเก็บในระยะใดของโรค (single serum) จำนวน 65 ตัวอย่าง ซึ่งทั้ง 65 ตัวอย่างนี้มีผลการวินิจฉัยอาการทางคลินิก และผลการตรวจด้วยวิธี IFA แต่มีเพียง 15 ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี MAT แล้วให้ผลบวก

2.2 กลุ่มควบคุม (control) จำนวน 46 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

2.2.1 ผู้มีสุขภาพดี 10 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างซีรัมที่ได้จากประชาชนในจังหวัดสมุทรปราการที่มารับการตรวจสุขภาพกับแพทย์และเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยบริการชุมชนของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติและให้ผลการตรวจเป็นปกติ ไม่ป่วยเป็นโรคใดๆ

2.2.2 ผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด 20 ตัวอย่าง ที่มาตรวจร่างกายประจำปีในโรงพยาบาลประจำจังหวัดและให้ผลการตรวจสุขภาพทั่วไปเป็นปกติ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

2.2.3 ผู้ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบอื่นๆ 16 ตัวอย่าง ได้แก่ VDRL โดยหลักการ flocculation และเมื่อให้ผล reactive ก็ตรวจยืนยันผลด้วยหลักการ agglutination หรือ immunofluorescent โดยการตรวจ TPHA และ FTA-ABS ตามลำดับ, Weil-Felix test หลักการ direct agglutination โดยใช้ค่า cut off ที่ 1:160, ASO และ RF ใช้หลักการ latex agglutination, Widal test ใช้หลักการ direct agglutination โดยใช้ค่า cut off ที่ 1:80, Heterophile Ab test ใช้หลักการ agglutination ที่ระดับนัยสำคัญ 1:56, Dengue IgM ใช้หลักการ ELISA และ Melioidosis ใช้หลักการ indirect agglutination ซึ่งรายละเอียดทั้งหมดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 จำแนกชนิดของกลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบของผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด

กลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบของผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด จำนวน 20 ตัวอย่าง	
จังหวัด	จำนวน (ตัวอย่าง)
จังหวัดอุดรธานี	1
จังหวัดสกลนคร	1
จังหวัดมหาสารคาม	2
จังหวัดอุบลราชธานี	3
จังหวัดอำนาจเจริญ	1
จังหวัดสกลนคร	2
จังหวัดชัยภูมิ	1
จังหวัดขอนแก่น	1
จังหวัดร้อยเอ็ด	3
จังหวัดนครพนม	2
จังหวัดบุรีรัมย์	1
จังหวัดเลย	2

ตารางที่ 3 จำแนกชนิดของกลุ่มตัวอย่างควบคุมผลลบของผู้ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบอื่นๆ นอกจากโรคเลปโตสไปโรซิส

กลุ่มตัวอย่างผลลบของผู้ที่ให้ผลบวกกับการทดสอบอื่นๆ จำนวน 16 ตัวอย่าง	
การทดสอบ	จำนวน (ตัวอย่าง)
VDRL/TPHA	6
VDRL/FTA-ABS	1
Scrub typhus (IFA)	2
Weil-Felix test	1
ASO test	1
RF	1
Widal test	1
Dengue IgM	1
Heterophile Ab	1
Melioidosis	1

3. วิธีการทดสอบ

3.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยหลักการ IFA

ใช้วิธีการศึกษาของศราวุธและคณะ (ศราวุธ สุทธิรัตน์. 2545) ดังนี้

ใช้แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปราเคลือบบนสไลด์หลุมที่เตรียมขึ้นตามข้อ 1 นำมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยดตัวอย่างทดสอบ ซึ่งเจือจางที่ระดับ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 และ 1:3200 จำนวน 10 µl/หลุม นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37^{o}C นาน 30 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นเติม anti human IgG, IgA, IgM conjugated FITC ที่เจือจางเป็น 1:20 incubate ที่อุณหภูมิ 37^{o}C นาน 30 นาที ล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS แล้วอ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

3.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราโดยหลักการ IIP

ดัดแปลงจากการศึกษาของ Chimsumang S และคณะ (Chimsumang S. 2005) แสดงตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *Leptospira* โดยวิธี IIP ที่ดัดแปลงขึ้น

ขั้นตอน	สภาวะที่ใช้ทดสอบ
1. นำสไลด์หลุมที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง	
2. หยด 3% H_2O_2 ปริมาณ 10 µl/หลุม	15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
3. ล้างด้วย PBS – T pH 7.4	
4. เติมซีรัม	เจือจาง 1:100 จำนวน 10 µl, 30 นาที ที่ 37°C
5. ล้างด้วย PBS –T pH 7.4	3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
6. ผึ่งสไลด์ให้แห้ง	
7. เติม Goat anti-human IgM, peroxidase conjugated	1:1,000 จำนวน 10 µl, 30 นาที ที่ 37°C
8. ล้างด้วย PBS -T	3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
9. ผึ่งสไลด์ให้แห้ง	
10. เติม AEC substrate	10 µl, 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
11. ย้อมทับด้วย hematoxylin	10 µl, 10 นาที แล้วล้างออก
12. นำไปปิดด้วย mounting fluid	อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

4. การศึกษาประสิทธิภาพและความสอดคล้องของวิธี IIP และ IFA

4.1 ทดสอบกับซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 65 ตัวอย่าง

4.2 ทดสอบกับซีรัมผู้ที่ไม่ใช่ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 46 ตัวอย่าง

นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) ค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) และประสิทธิผลของวิธีทดสอบ (efficacy) โดยเปรียบเทียบผลการทดสอบที่ได้กับชนิดของกลุ่มตัวอย่างผลบวกและกลุ่มตัวอย่างผลลบ

4.3 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างวิธี IIP และ IFA

4.4 เปรียบเทียบผลการทดสอบของวิธี IIP และ IFA ในเชิงกึ่งปริมาณ เพื่อประเมินความไวของการทดสอบทั้งสองวิธี

5. การแปลผลข้อมูล

วิธี IFA ผลบวก : เห็นการเรืองแสงสีเขียวของตัวเชื้อปรากฏบนพื้นสีดำ

ผลลบ : ไม่เห็นการเรืองแสงของตัวเชื้อปรากฏ

วิธี IIP ผลบวก : เห็นตัวเชื้อติดสีแดงปรากฏบนพื้นสไลด์

ผลลบ : ไม่เห็นตัวเชื้อติดสีแดงปรากฏ

เกณฑ์การตัดสินระดับแอนติบอดีที่มีความสำคัญทางคลินิก

วิธี IFA titer $\geq$ 1:100 (จากคู่มือวิชาการในหัวข้อ การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ (สำนักงานควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส. 2544))

วิธี IIP titer $\geq$ 1:100 (เลือกใช้ 1:100 จากงานวิจัยของ Chimsumang S และคณะ (Chimsumang S. 2005))

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ใช้สถิติเชิงพรรณนาและวิเคราะห์หาความสอดคล้องระหว่างวิธีทดสอบโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS version 9.0

บทที่ 4
ผลการศึกษา

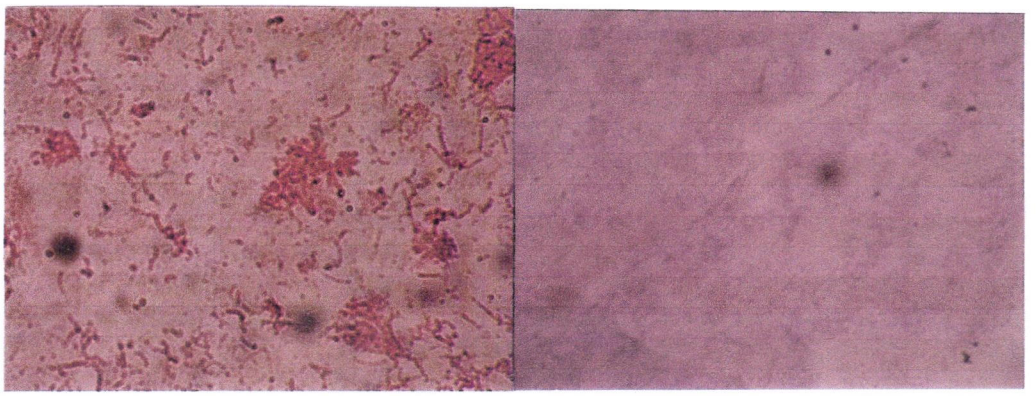
จากจำนวนตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 111 ตัวอย่าง จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จ. อุดรธานี และบริษัทศูนย์แล็บธนบุรีจำกัด แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างผลบวก จำนวน 65 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างผลลบ จำนวน 46 ตัวอย่าง

นำมาทดสอบโดยวิธี IIP ที่ได้ดัดแปลงขึ้น ตามขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ขั้นตอนการทดสอบโดยวิธี IgM Immunoperoxidase

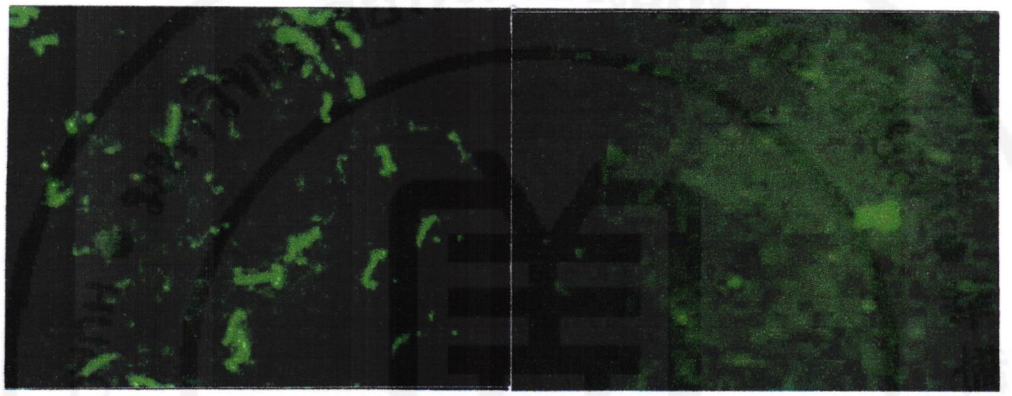
ขั้นตอน	วิธีการ
1	นำสไลด์ที่เคลือบด้วยแอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรามาวางที่อุณหภูมิห้อง
2	หยด 3% H_2O_2 ลงในหลุมๆละ 10 µl 15 นาที แล้วล้าง เพื่อเป็นการกำจัด endogeneous peroxidase
3	เจือจางน้ำเหลืองในอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 และ 1:1600 หยดลงในหลุมแอนติเจนจำนวน 10 µl/หลุม incubate 37^{o}C 30 นาที
4	ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST แล้วผึ่งให้แห้ง
5	เติม Goat Anti human IgM, peroxidase conjugated ในอัตราส่วน 1:1000 ลงในแต่ละหลุม 10 µl/หลุม incubate 37^{o}C 30 นาที
6	ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST แล้วผึ่งให้แห้ง
7	หยด AEC substrate 10 µl/หลุม incubate ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ในที่มืด
8	ล้าง 3 ครั้งด้วย PBST แล้วผึ่งให้แห้ง
9	นำมาย้อมทับด้วย hematoxylin 10 µl/หลุม ทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วล้างออก นำมาปิดด้วย coverslip
10	อ่านผลด้วย light microscope (กรณีให้ผลบวกจะเป็นตัวเชื้อติดสีแดงของ AEC substrate)

ในจำนวนตัวอย่างผลบวกทั้งหมด 65 ตัวอย่างมี 15 ตัวอย่างที่มีผลการตรวจยืนยันโดยวิธี MAT เมื่อนำตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่างมาทดสอบกับวิธี IFA และวิธี IIP ที่ดัดแปลงขึ้น โดยใช้ระดับ cut off ที่ไตเตอร์ 1 : 100 แสดงผลดังรูปที่ 1 รูปที่ 2 และตารางที่ 6



(ก) (ข)

รูปที่ 1 ผลการตรวจโดยวิธี IIP (ก) ผลบวก (ข) ผลลบ



(ก) (ข)

รูปที่ 2 ผลการตรวจโดยวิธี IFA (ก) ผลบวก (ข) ผลลบ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลการตรวจโดยวิธี IIP และ IFA กับวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

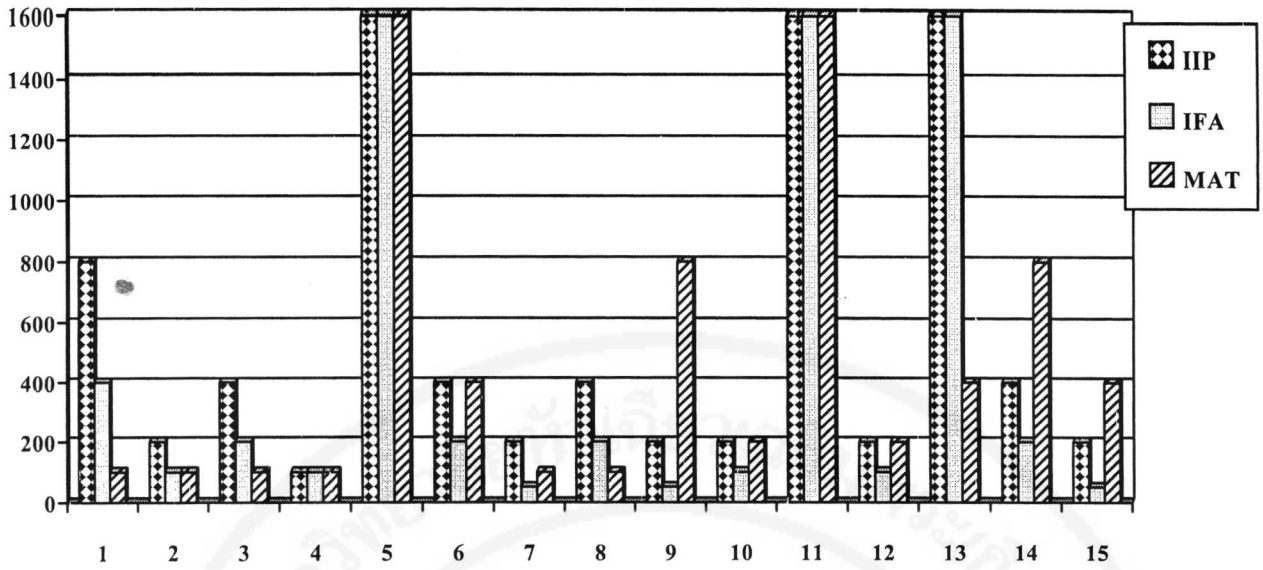
	MAT	**IIP**	**IFA**
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก	15	15	12
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลลบ	0	0	3
รวม	15	15	15

ความไว (Sensitivity) ของวิธี IIP = 100% ความไว (Sensitivity) ของวิธี IFA = 80%

ผลการทดสอบระหว่างสามวิธี เมื่อพิจารณาในระดับคุณภาพ (qualitative) จะมีส่วนใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาจากระดับกึ่งปริมาณในรูปไตเตอร์ (semi quantitative) จะเห็นความแตกต่างระหว่างสามวิธีชัดเจนขึ้น ซึ่งแสดงดังตารางที่ 7 และ กราฟในแผนภูมิที่ 1

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบแสดงเป็นระดับ titer ของตัวอย่างผลบวกที่ทดสอบด้วยวิธี IIP, IFA และ MAT จำนวน 15 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	IIP	IFA	MAT
1	1:800	1:400	1:100
2	1:200	1:100	1:100
3	1:400	1:200	1:100
4	1:100	1:100	1:100
5	>1:1600	>1:1600	1:3200
6	1:400	1:200	1:400
7	1:200	Negative	1:100
8	1:400	1:200	1:100
9	1:200	Negative	1:800
10	1:200	1:100	1:200
11	>1:1600	>1:1600	1:1600
12	1:200	1:100	1:200
13	>1:1600	>1:1600	1:400
14	1:400	1:200	1:800
15	1:200	Negative	1:400



แผนภูมิที่ 1 กราฟแสดงระดับไตเตอร์ของตัวอย่างทดสอบทั้ง 15 ตัวอย่าง เปรียบเทียบระหว่างสามวิธี

และเมื่อนำตัวอย่างทดสอบทั้งหมด 111 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยวิธี IFA และ IIP แสดงผลตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบด้วยวิธี IFA และ IIP ในกลุ่มตัวอย่างประเภทต่างๆทั้งหมด

กลุ่มตัวอย่าง/ จำนวนตัวอย่าง	รายละเอียด/จำนวนตัวอย่าง	วิธี IFA		วิธี IIP	
		+	-	+	-
1. กลุ่มตัวอย่างผลบวก (65)	- ซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลการทดสอบ โดยวิธี IFA เป็นบวกแล้วได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส (มี 15 ราย ที่ผลการทดสอบโดยวิธีมาตรฐาน (MAT) เป็นบวก)	62	3	65	0
2. กลุ่มตัวอย่างผลลบ (46)	- ซีรัมผู้ที่มีสุขภาพดี (10)	0	10	0	10
	- ซีรัมผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาด (20)	1	19	1	19
	- ซีรัมผู้ที่ให้ผลการตรวจเป็นบวกด้วยโรคอื่นๆ (16)	0	16	1	15
	รวมทั้งสิ้น 111 ตัวอย่าง	63	48	67	44

ศูนย์บรรณสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

เมื่อนำผลที่ได้จากวิธี IFA และวิธี IIP มาเปรียบเทียบเพื่อคำนวณค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพของแต่ละวิธีเทียบกับชนิดของกลุ่มตัวอย่างทดสอบ แสดงดังตารางที่ 9 และ 10

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี IFA เมื่อเทียบกับผลการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสของกลุ่มตัวอย่างผลบวกและผลลบ

		กลุ่มตัวอย่าง		รวม
		ผลบวก	ผลลบ	
วิธี IFA	ผลบวก	62	1	63
	ผลลบ	3	45	48
รวม		65	46	111

ความไว = 95.4%
ความจำเพาะ = 97.8%
ค่าทำนายผลบวก = 98.4%
ค่าทำนายผลลบ = 93.7%
ประสิทธิภาพ = 96.4%

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดสอบโดยวิธี IIP เมื่อเทียบกับผลการวินิจฉัยของกลุ่มตัวอย่างผลบวกและผลลบ

		กลุ่มตัวอย่าง		รวม
		ผลบวก	ผลลบ	
วิธี IIP	ผลบวก	65	2	67
	ผลลบ	0	44	44
รวม		65	46	111

ความไว = 100%
ความจำเพาะ = 95.6%
ค่าทำนายผลบวก = 97.0%
ค่าทำนายผลลบ = 100%
ประสิทธิภาพ = 98.2%

ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพของวิธี IFA และ IIP ที่ดัดแปลงขึ้นจะพบว่า วิธี IIP มีความไว ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพ สูงกว่าวิธี IFA ในขณะที่วิธี IFA จะมีความจำเพาะและค่าทำนายผลบวกที่สูงกว่าวิธี IIP

นำผลการตรวจ 111 ตัวอย่างโดยวิธี IFA และ IIP มาหาค่าความสอดคล้องด้วยสถิติทดสอบ Kappa analysis พบว่า ทั้งวิธี IFA และ IIP มีความสอดคล้องกันในระดับสูง (κ = 0.926) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ความสอดคล้องระหว่างผลการตรวจ 111 ตัวอย่าง โดยวิธี IIP และ IFA

		วิธี IIP		**รวม**
		ผลบวก	ผลลบ	
วิธี IFA	ผลบวก	63	1	64
	ผลลบ	3	44	47
รวม		66	45	111

Kappa = 0.926 P value < 0.05

McNemar's = 1 df = 1

เมื่อนำผลการศึกษาระดับไตเตอร์ของกลุ่มตัวอย่างผลบวกทั้ง 65 ตัวอย่าง และตัวอย่างผลลบ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบทั้งวิธี IIP และ IFA เป็นบวก (รวม 66 ตัวอย่าง) มาเปรียบเทียบในเชิงกึ่งปริมาณ (semi quantitative) เพื่อประเมินความไวของการทดสอบ (sensitivity of detection) ระหว่างสองวิธี จำแนกได้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบของวิธี IIP เท่ากับ IFA จำนวน 23 ตัวอย่าง วิธี IIP > IFA จำนวน 34 ตัวอย่าง และวิธี IIP < IFA จำนวน 9 ตัวอย่าง ผลที่ได้ แสดงดังตารางที่ 12-14

ตารางที่ 12 ผลของการทดสอบโดยวิธี IIP และ IFA ที่มีไตเตอร์เท่ากันจำนวน 23 ตัวอย่าง

ระดับไตเตอร์	จำนวน (ตัวอย่าง)
1:100	3
1:200	8
1:400	2
1:800	4
1:1600	3
> 1:1600	3

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP มากกว่าวิธี IFA จำนวน 34 ตัวอย่าง

IIP	IFA	จำนวน (ตัวอย่าง)
1:200	1:50	3
1:200	1:100	15
1:400	1:100	1
1:400	1:200	8
1:800	1:400	4
1:1600	1:800	3

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบผลของการทดสอบระหว่างวิธี IIP และ IFA ที่ไตเตอร์ของวิธี IIP น้อยกว่าวิธี IFA จำนวน 9 ตัวอย่าง

IIP	IFA	จำนวน (ตัวอย่าง)
1:100	1:200	3
1:100	1:400	1
1:400	1:1600	1
1:800	>1:1600	1
1:1600	>1:1600	3

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

โรคเลปโตสไปโรซิสยังคงเป็นโรคที่พบมากและเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน และเป็นหนึ่งในห้าสิบแปดโรคติดเชื้อในประเทศไทยที่ต้องรายงานต่อกระทรวงสาธารณสุข (Sejvar, J. 2005) ดังนั้นการตรวจทางห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวินิจฉัยแยกโรคนี้ออกจากไข้ไม่ทราบสาเหตุ (febrile disease) อื่นๆ ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกัน ไม่ว่าจะเป็นไข้เลือดออก ไวรัสตับอักเสบ ไข้หวัดใหญ่ (Influenza) หรือกลุ่มไข้รากสาด เป็นต้น (Tappero, J. 1998)

การพัฒนาวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการในรูปแบบต่างๆเพื่อให้มีความไว และความจำเพาะสูง สำหรับตรวจกรองโรคทั้งในห้องปฏิบัติการและในภาคสนามจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งในปัจจุบันแม้ว่าจะสามารถพัฒนาวิธีการตรวจจนถึงระดับชีวโมเลกุลที่สามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเครื่องมืออัตโนมัติสำหรับการตรวจหาเชื้อทั้งในสิ่งแวดล้อม (Tansuphasiri, U. 2006) และในตัวอย่างส่งตรวจจากผู้ป่วย (Tansuphasiri, U. 2006) ซึ่งได้แก่วิธี PCR แต่อย่างไรก็ตามการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อก็ยังเป็นวิธีการที่มีความเหมาะสมทั้งในด้านความสะดวกของการนำไปใช้ ราคา และการใช้เครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปในทุกห้องปฏิบัติการ ในงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงได้ดัดแปลงวิธี immunoperoxidase เพื่อใช้ในการตรวจหา IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปราในน้ำเหลืองผู้ป่วยสำหรับการตรวจกรองโรคเลปโตสไปโรซิส

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาพบว่าวิธี IgM peroxidase ที่ดัดแปลงขึ้น เมื่อนำไปตรวจกับตัวอย่างทั้งหมด 111 ตัวอย่างพบว่ามีความไว ความจำเพาะ ค่าทำนายผลบวก ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพของวิธีการทดสอบเป็น 100, 95.6, 97.0, 100 และ 98.2% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี IFA แล้วพบว่าวิธีที่ดัดแปลงขึ้นนี้มีความไว ค่าทำนายผลลบ และประสิทธิภาพสูงกว่า

เมื่อศึกษาในเชิงกึ่งปริมาณในรูปแบบไตเตอร์ พบว่าวิธี IIP มีความไวของการทดสอบ (sensitivity of detection) สูงกว่าวิธี IFA เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งดูจากผลการทดสอบที่แสดงเป็นระดับไตเตอร์ของตัวอย่างผลบวก(ที่มีผลการตรวจด้วยวิธี MAT) 15 ตัวอย่าง พบว่าผลการทดสอบด้วยวิธี IIP ให้ค่าไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับวิธี IFA ไม่มีรายใดเลยที่ให้ไตเตอร์น้อยกว่า ส่วนเมื่อตรวจใน

ตัวอย่างผลบวกทั้งหมด 65 ตัวอย่าง และตัวอย่างผลลบ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบ IIP และ IFA เป็นบวก ก็พบว่า IIP ให้ค่าไตเตอร์มากกว่าหรือเท่ากับ IFA ถึง 57 ราย จาก 66 ราย คิดเป็น 86.4% มีเพียง 9 ตัวอย่างเท่านั้นที่ไตเตอร์น้อยกว่า คิดเป็น 13.6%

สำหรับในด้านความสอดคล้องระหว่างสองวิธีพบว่าทั้งสองวิธีสามารถใช้แทนกันได้ โดยมีความสอดคล้องในระดับสูงมากที่ $\kappa = 0.926$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $P < 0.05$

ดังนั้นวิธี IgM IIP ที่ดัดแปลงขึ้นจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการตรวจกรองผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิสในระยะเริ่มแรก และการนำไปใช้เพื่อการตรวจกรองในภาคสนาม

อภิปรายผล

วิธี IgM Immunoperoxidase ดัดแปลงขึ้นจากวิธี Immunoperoxidase ของ Chimsumang S และคณะ ซึ่งใช้ตรวจหาแอนติบอดีชนิดรวมต่อเชื้อเลปโตสไปรา (IgM+IgA+IgG) โดยผู้วิจัยได้เพิ่มขั้นตอนการบล็อค endogenous peroxidase activity เข้าไปก่อนการเติมซีรัมผู้ป่วย ตามรายงานของ Bourn JA เพื่อป้องกันผลบวกปลอมจากเอนไซม์ peroxidase ในตัวอย่างเชื้อที่ใช้เคลือบเป็นแอนติเจนทดสอบ (Bourne, JA. 2000) พบว่าวิธี IgM Immunoperoxidase ที่ดัดแปลงขึ้นมีค่าความจำเพาะของการทดสอบเป็น 95.6% ในขณะที่วิธี IIP เดิม มีค่าความจำเพาะเป็น 94.9% (Chimsumang, S. 2005)

เมื่อนำวิธี IgM Immunoperoxidase ที่ดัดแปลงขึ้น มาทดสอบกับตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานจำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าวิธี IgM Immunoperoxidase มีค่าความไวของการวินิจฉัยเป็น 100% ในขณะที่วิธี IFA ให้ผลลบปลอมเกิดขึ้น 3 ตัวอย่าง โดยมีความไวของการวินิจฉัยเป็น 80% อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลในระดับไตเตอร์ของการทดสอบแล้ว พบว่าตัวอย่างซีรัมซึ่งวิธี IFA ให้ผลลบปลอมมีระดับไตเตอร์ที่ 1:50 แต่เนื่องจาก cut off ที่ใช้เป็น 1:100 ดังนั้นทั้งสามตัวอย่างจึงแปลผลการทดสอบเป็นลบ

เมื่อประเมินความไวของวิธี IFA เปรียบเทียบกับวิธี IIP โดยพิจารณาจากระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีที่ตรวจ จากตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสจำนวน 65 ตัวอย่าง พบว่าวิธี IIP สามารถตรวจได้ระดับไตเตอร์สูงกว่าวิธี IFA ถึง 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 52.3 ส่วนวิธี IFA มีความไวของการทดสอบสูงกว่าวิธี IIP เพียง 9 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 13.8

เนื่องจากการศึกษานี้ทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากวิธี IIP ที่ดัดแปลงขึ้นกับวิธี MAT ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน แต่ตัวอย่างที่มีผลการทดสอบ MAT มีเพียง 15 ตัวอย่างเท่านั้น เนื่องจากในปัจจุบันที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จ. อุดรธานี แทบจะไม่มีการส่งตรวจโดยหลักการ

MAT เพื่อยืนยันผลอีกต่อไป เพราะวิธีการเตรียมแอนติเจนที่ค่อนข้างยุ่งยากและต้องใช้ความชำนาญในการอ่านผลรวมถึงใช้ระยะเวลานานในการทดสอบ ผู้วิจัยจึงได้นำตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ผ่านการวินิจฉัยจากแพทย์และมีผลการตรวจด้วยวิธี IFA ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงจำนวน 65 ตัวอย่าง (รวมตัวอย่างที่มีผล MAT 15 ตัวอย่าง) มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธี IIP โดยอาศัยรายงานการวิจัยของ Sejvar J และคณะ ซึ่งเสนอว่าสามารถใช้หลักการ IFA ทดแทน MAT เพื่อการตรวจยืนยัน (confirmatory method)ได้ในกรณีมีตัวอย่างที่น่าสงสัย (Sejvar, J. 2005) ผู้วิจัยจึงได้นำหลักการ IFA มาเปรียบเทียบและหาความสอดคล้องกับวิธี IIP โดยพบว่าให้ผลความสอดคล้องกันในระดับสูงมากที่ Kappa analysis = 0.926 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงว่าวิธี IIP ที่ดัดแปลงขึ้นสามารถนำมาใช้แทนวิธี IFA ได้

เมื่อใช้ทั้งสองวิธี(IIP และ IFA) ทดสอบกลุ่มตัวอย่างผลบวกและลบ พบว่ากลุ่มตัวอย่างผลบวกจำนวน 65 ตัวอย่าง ไม่เกิดผลลบปลอมขึ้นเลยเมื่อทดสอบด้วยวิธี IIP ในขณะที่วิธี IFA มีผลลบปลอม 3 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี MAT และมีระดับไตเตอร์ที่ 1 : 50 ซึ่งแสดงว่า ความไวของวิธี IFA ต่ำกว่าวิธี IIP เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kemapunmanus M และคณะที่เปรียบเทียบกับเกณฑ์การวินิจฉัยผู้ป่วย พบว่าความไวของวิธี IFA เป็น 91.9% (Kemapunmanus, M. 2004) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับหลักการอื่นๆ ได้แก่ MAT, Immunochromatography (Lepto Dipstick) และ Latex Agglutination ก็ยังให้ค่าความไวและความจำเพาะสูงกว่า

สำหรับผลบวกปลอมพบว่าวิธี IIP ให้ผลบวกปลอมมากกว่าวิธี IFA โดย 1 ตัวอย่างจาก 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม เป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคซิฟิลิส ซึ่งจากการศึกษาของ Appassakij H และคณะ (Appassakij, H. 1995) รายงานว่าเกิดผลบวกข้ามกลุ่มระหว่างผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสกับผู้ป่วยซิฟิลิสเมื่อทดสอบด้วยวิธีทางซีโรโลยีได้ เนื่องจากโครงสร้างของเชื้อมีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างผู้ป่วยที่ให้ผลการตรวจวินิจฉัยซิฟิลิสเป็นบวกถึงเจ็ดตัวอย่างประกอบด้วยตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากทั้งการทดสอบ VDRL และ TPHA 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากทั้งการทดสอบ VDRL และ FTA-ABS 1 ตัวอย่าง แต่ก็ให้ผลบวกปลอมเกิดขึ้นเพียงหนึ่งตัวอย่างเท่านั้น ในขณะที่งานวิจัยของ Chimsumang S และคณะ (Chimsumang, S.2005) ก็พบผลบวกปลอมเกิดขึ้นจากโรคซิฟิลิสเช่นเดียวกันจำนวน 2 ตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่าง และพบว่าเกิดผลบวกปลอมขึ้นกับตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคสครับไทฟัส มาลาเรีย และไทฟอยด์ด้วย ส่วนอีก 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม เป็นตัวอย่างจากผู้ที่ไม่มีอาการของโรคเลปโตสไปโรซิส จากข้อมูลประวัติพบว่ามีอาชีพเกษตรกรและอาศัยอยู่ในจังหวัดมหาสารคามซึ่งเป็นพื้นที่การระบาด โดยให้ผลบวกปลอมทั้งวิธี IFA และ IIP และเป็นผลบวกที่ระดับไตเตอร์ต่ำ (weak positive) ทั้งสอง

วิธีคือ 1:100 ซึ่งในกรณีนี้อาจจะเป็นผู้ที่เคยสัมผัสเชื้อและสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อในระดับต่ำๆ จึงทำให้ผลการตรวจเป็นบวกเมื่อใช้ค่าจุดตัด (cut off) ของการทดสอบเป็น 1 :100

จากการศึกษาของ Chimsumang S และคณะ (Chimsumang, S.2005) ซึ่งใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ *Leptospira biflexa* serovar Patoc ในการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgG IgM และ IgA ด้วยวิธี IFA และ IIP โดยใช้ค่าจุดตัดที่ระดับ 1:100, 1:200 และ 1:400 พบว่าเมื่อเลือกใช้ค่าจุดตัดที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าความจำเพาะของการทดสอบสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันความไวของการทดสอบก็ลดต่ำลงด้วย สำหรับวิธี IIP พบว่าค่าความไว ความจำเพาะ และประสิทธิภาพ ต่ำกว่าวิธี IFA เล็กน้อย โดยสัมประสิทธิ์ความสอดคล้อง (Kappa coefficient) ของวิธี IIP และ IFA เมื่อเทียบกับวิธี MAT มีค่าเท่ากับ 0.77 และ 0.76 ตามลำดับ ในขณะที่วิธีดัดแปลงของผู้วิจัยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสอดคล้องสูงถึง 0.926

ข้อเสนอแนะ

วิธี immunoperoxidase (IIP) เป็นวิธีที่มีความสะดวกและมีความไวในการวินิจฉัย (sensitivity of diagnosis) สูงถึง 100% ในขณะที่ความไวของการทดสอบ (sensitivity of detection) ก็สูงกว่าวิธี immunofluorescent (IFA) ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ง่ายกว่าวิธี IFA ซึ่งมีข้อจำกัดหลายประการ ทั้งในด้านการใช้อุปกรณ์พิเศษซึ่งมีราคาแพงและต้องใช้ความชำนาญของผู้ทดสอบในการอ่านผล อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าความจำเพาะของวิธีดังกล่าวยังไม่สูงมากนัก สามารถให้ผลบวกปลอมได้ถึงสองตัวอย่างจากผู้ป่วยโรคซิฟิลิสและผู้ที่อยู่ในพื้นที่การระบาดของโรค ดังนั้นการนำวิธีดังกล่าวมาใช้ จึงควรจะต้องมีการตรวจสอบประวัติและข้อมูลต่างๆของผู้ป่วยเพื่อนำมาประกอบการวินิจฉัยด้วย

บรรณานุกรม

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. (2541) โรคติดเชื้อ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

กระทรวงสาธารณสุข. กรมควบคุมโรคติดต่อ. สำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิส. (2544) คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข.

กระทรวงสาธารณสุข. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. (2543) การฝึกอบรมการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: กระทรวง.

กระทรวงสาธารณสุข. กองระบาดวิทยา. สำนักงานปลัดกระทรวง. (2542) สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2542. กรุงเทพมหานคร: กระทรวง.

กระทรวงสาธารณสุข. สำนักปลัดกระทรวง. กองระบาดวิทยา. (2548) สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2547. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข.

ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล. (2543) คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด.

ใช้ ยูนิพันธ์. (2486) "รายงานการพบโรคไวล์ครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อคราวอุทกภัยใหญ่ พ.ศ. 2485" จดหมายเหตุทางแพทย์. 26 หน้า 86.

ดุจดาว บุญยอด และคนอื่นๆ. (2544) Wเชื้อเลปโตสไปร่าในผู้ป่วยบริเวณภาคเหนือตอนล่าง" วารสารวิชาการสาธารณสุข. 10 หน้า 508-515.

นิภา จรูญเวสม์. (2534)โรคเขตร้อน. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล.

บุญเยี่ยม เกียรติวุฒิ, องุ่น เกียรติวุฒิ และศุภกิจ อังศุภกร. (2527) โรคติดต่อระหว่างสัตว์และคน. กรุงเทพมหานคร: บัณฑิตการพิมพ์.

วินิตา บริราช และคนอื่นๆ. (2541) "การใช้เทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสให้ได้ผลรวดเร็ว". วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 40(1) หน้า 57-65.

ศันสนีย์ ตันติ์จธัม, ทวีพร พันธุ์พาณิชย์ และ ศราวุธ สุทธิรัตน์. (2550) Wการพัฒนาวิธี dot-ELISA สำหรับการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อเลปโตสไปรา" วารสารเทคนิคการแพทย์. 35(2) หน้า 1955-1967.

ศราวุธ สุทธิรัตน์ และคนอื่นๆ. (2549) "การพัฒนาวิธี Dot ELISA สำหรับตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส" วารสารวิชาการสาธารณสุข. 15(2) หน้า 225-231.

ศราวุธ สุทธิรัตน์ และคนอื่นๆ. (2545) "การเปรียบเทียบวิธี อินไดเร็คอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ และลาเทกซ์แอกกลูติเนชั่น สำหรับตรวจหาแอนติบอดีย์ต่อเชื้อเลปโตสไปรา" วารสารวิชาการสาธารณสุข. 11(6) หน้า 893-897.

สิริพรรณ แสงอรุณ, จิราภรณ์ พูลเพิ่ม และ จุรีภรณ์ บุญยวงศ์วิโรจน์. (2542) "การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธีฮีแมกกูลติเนชั่น" วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 41 หน้า 335-341.

สุจิตรา นิมมานนิตย์, อุษา ทิสยากร และจุรี นิสานนท์. (2527) "โรคเลปโตสไปโรซิสในเด็ก" วารสารการแพทย์. 3 หน้า 67-78.

Appassakij, H. et al. (1995) "Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis" Am J Trop Med Hyg. 52(4) page 340-343.

Bajani, MD. et al. (February 2003) "Evaluation of four commercially available rapid serogic tests for diagnosis of leptospirosis" J Clin Microbiol. 41(2) page 803-809.

Bourne, JA. (2000) Handbook of Immunoperoxidase staining methods. Santa Barbara: DAKO Corporation.

Chimsumang, S. et al. (March 2005) "Indirect Immunoperoxidase test for the diagnosis of leptospirosis" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36(2) page 296-301.

Hatta, M. et al. (September 2000) "Introduction of a rapid dipstick assay for the detection of Leptospira-specific immunoglobulin m antibodies in the laboratory diagnosis of leptospirosis in a hospital in Makassar, Indonesia" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 31(3) page 515-520.

Ido, Y. et al. (1967) "The rat as a carrier of spirochaete icterohaemoragiae, the causative agent of Weil'disease (Spirochaetosis icterohaemorragiae)" J Expt Med. 26 page 341.

Kelly, DJ. et al. (March 1988) "Comparative evaluation of the indirect immunoperoxidase test for the serodiagnosis of rickettsial disease" Am J Trop Med Hyg. 38 page 400-406.

Kemapunmanus, M. et al. (December 2004) "A prospective evaluation of four immunodiagnostic assays for human leptospirosis" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 35(4) page 863-867.

Origgi, FC. et al. (March 2003) "Application of immunoperoxidase-based techniques to detect herpesvirus infection in tortoises" J Vet Diagn Invest. 15(2) page 133-140.

Pappas, MG. Hajkowski, R. and Hockmeyer, WT. (1984) "Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis" Am J Trop Med Hyg. 33 page 1105-1111.

Petchclai, B. Hiranras, S. and Potha, U. (December 1991) "Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis" Am J Trop Med Hyg. 45(6) page 672-675.

Ramadass, P. Samuel, B. and Nachimuthu, K. (October 1999) "A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies" *Vet Microbiol.* 70(1-2) page 137-40.

Ribeiro, MA. Souza, CC. and Almeida, SH. (1995) "Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen" J Tropmed Hyg. 98 page 452-456.

Sejvar, J. et al. (March 2005) "An outbreak of leptospirosis, Thailand the importance of the laboratory" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36(2) page 289-295.

Silva, MV. and Camargo ED. (May-June 1992) "An immunoenzyme test (ELISA) for the detection of circulating class-IgA antibodies in human leptospirosis" Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 34(3) page 239-242.

Silva, MV. et al. (June 1997) "Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies" Am J Trop Med Hyg. 56(6) page 650-655.

Smits, HL. et al. (March 2000) "Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis" J Clin Microbiol. 38(3) page 1272-1275.

Suputtamongkol, Y. et al. (October 1998) "Microcapsule agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in Thailand" *Ann Trop Med Parasitol.* 92(7) page 797-801.

Tangkanakul, W.et al. (March 2005) "Leptospirosis: An emerging health problem in Thailand" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 36(2) page 281-288.

Tansuphasiri, U. et al. (Marach 2006) "Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic leptospira" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37(2) page 297-308.

Tansuphasiri, U. et al. (July 2006) "Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic leptospira in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand" Southeast Asian J Trop Med Public Health. 37(4) page 729-741.

Tappero, J. Ashford, D. and Perkins, B. (1998). Leptospirosis. 5th ed. New York: Churchill Livingstone: 2405-2592.

Terpstra, WJ. Ligthart, GS. And Schoone, GJ. (Febuary 1985) "ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis" J Gen Microbiol. 131 (Pt 2) page 377-385.

Wagenaar, J. et al. (March 2000) "Comparison of polymerase chain reaction assays with bacteriologic culture, immunofluorescence, and nucleic acid hybridization for detection of Leptospira borgpetersenii serovar hardjo in urine of cattle" Am J Vet Res. 61(3) page 316-320.

Waitkins, SA. and Hookey, JV. (June 1986) "The detection of leptospires by a chemiluminescent immunoassay" J Med Microbiol. 21(4) page 353-356.

ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศราวุธ สุทธิรัตน์

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวทวีพร พันธุ์พาณิชย์

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท.ม. (จุลชีววิทยาทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวอิสสริยา เอี่ยมสุวรรณ

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน) มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ติดต่อ กลุ่มวิชาภูมิคุ้มกันวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1436

คณะผู้วิจัย (ต่อ)

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล นายสุรศักดิ์ หมื่นพล

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สถานที่ติดต่อ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์อุดรธานี จ. อุดรธานี

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學