

การศึกษาเชื้อเลปโตสไปรา สายพันธุ์ที่พบในโคและสุกรในประเทศไทย

A Study of *Leptospira* Serovar Specific in Cattle and Pigs in Thailand

ดวงใจ สุวรรณเจริญ* บุษรา สิทธิวิเชียรวงศ์ ฉัตรสุดา สุระภี วรี สุขไม้ ชัชระพี สอนไวย
กนกวรรณ คงเฉลิม ชลพิชา ติวเส้ง ประไพ บุญล้ำ

Duangjai Suwanchaoen* Busara Sittiwicheanwong Chatsuda Suraphi Waree Sookmai
Chatrapee Sornwai Kanokwan Khongsharoem Chonpicha Tiwsang Prapai Bunlum

Abstract

Background: The genetic information of *Leptospira* in livestock of Thailand is limited. This study aims to identify the *Leptospira* strain specific to cattle and pigs in different regions of Thailand. The information obtained will be helpful in epidemiology, disease surveillance, and the development of diagnostic kits and vaccines.

Method: A total of 553 urine and sera of animals were collected between 2017-2019 from nine livestock administrative regions. The antibodies against *Leptospira* were examined using a microscopic agglutination test (MAT). Detection of leptospiral DNA was obtained by real-time PCR. Besides, *Leptospira* was also isolated from urine samples to classify the *Leptospira* strains both serogrouping (SG) and molecular typing (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE, Multilocus sequence typing; MLST and 16S rRNA sequencing).

Result: The seroreactivity of cattle and pigs was 83.68% and 17.01%, respectively. The two most common serovars were Shermani and Ranarum. The uroprevalence of cattle and pigs was 20.53% (39/190) and 12.02% (41/341) respectively, with cattle was highest at region 7, 76.47% (13/17), and pigs found highest at region 4, 53.33% (16/30). This study was able to identify *Leptospira* from cattle as *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Hardjobovis (ST 152), *L. interrogans* and *L. licerasiae* (intermediate group). Unfortunately, the isolates of pigs could not be purified. Therefore, the 16S rRNA sequencing was analyzed and found *L. santarosai*, *L. borgpetersenii* and *L. interrogans*.

Conclusion: In this study, both pathogenic and intermediate *Leptospira* are found *L. borgpetersenii* serogroup Sejroe serovar Hardjobovis is mainly found in cattle of Thailand. At the same time, the *Leptospira* spp. in pigs is more diverse. This study indicates the distribution of *Leptospira* in cattle and pigs in Thailand, which are reservoir hosts and shed contaminated urine to the environment. This finding provides valuable data for epidemiological study and disease surveillance in humans, animals, and the environment.

Keywords: *Leptospira*, cattle, pig, serovar

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* ผู้รับผิดชอบบทความ: 02 579 8908-14 ต่อ 154 โทรสาร 0 2579 8919 อีเมล: dj90705@hotmail.com

National Institute of Animal Health Kasetklang Ladyao Chatuchak Bangkok 10900

* Corresponding author: Tel. 0 2579 8908-14 ext.154 Fax. 0 2579 8919 E-mail: dj90705@hotmail.com

บทคัดย่อ

ที่มาของการศึกษา: การศึกษาข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในปศุสัตว์ของประเทศไทยมีอย่างจำกัด ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่จำเพาะในโค และสุกรในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในด้านระบาดวิทยา การเฝ้าระวังโรค ตลอดจนการผลิตชุดตรวจโรคและการพัฒนาวัคซีนต่อไป

วิธีการ: เก็บตัวอย่างซีรัม และปัสสาวะจำนวนทั้งสิ้น 553 ตัวอย่าง จากสัตว์ที่ทำการศึกษา ระหว่าง พ.ศ. 2560-2562 โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 ถึง 9 ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราด้วยวิธี Microscopic agglutination test (MAT) ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี real-time PCR นอกจากนี้ยังทำการเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราจากตัวอย่างปัสสาวะ เพื่อจำแนกสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราทั้งวิธีทาง serotyping (SG) และวิธีทาง molecular typing (Pulsed-field gel electrophoresis; PFGE, Multilocus sequence typing; MLST และ 16S rRNA sequencing)

ผล: พบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในโคเนื้อ และสุกร คือ 83.68% (159/190) และ 17.01% (58/341) ตามลำดับ ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดสองอันดับแรก ได้แก่ ซีโรวาร์ Shermani และ Ranarum ตามลำดับ ความชุกของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ (uroprevalence) โคเนื้อ และสุกร คือ 20.53% (39/190) และ 12.02% (41/341) ตามลำดับ โดยโคเนื้อพบสูงสุดที่เขต 7 คิดเป็น 76.47% (13/17) ส่วนสุกรพบสูงสุดที่เขต 4 คิดเป็น 53.33% (16/30) การศึกษานี้สามารถจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะโคเนื้อได้เป็นเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรกรุ๊ป Sejroe ซีโรวาร์ Hardjobovis (ST 152), *L. interrogans* และ *L. licerasiae* (intermediate group) สำหรับสุกรไม่สามารถเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ จึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA พบว่าเป็นเชื้อ *L. santarosai*, *L. borgpetersenii* และ *L. interrogans*

สรุป: การศึกษานี้พบเชื้อเลปโตสไปราทั้งกลุ่ม pathogenic และกลุ่ม intermediate โดยเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรกรุ๊ป Sejroe ซีโรวาร์ Hardjobovis

เป็นสายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่ในโคเนื้อของประเทศไทย แต่ในสุกรพบว่าเชื้อมีความหลากหลายในระดับสปีชีส์ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงการกระจายตัวของเชื้อที่มีอยู่ในโคและสุกรในประเทศไทยซึ่งเป็นสัตว์รังโรคที่มีโอกาสขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม อีกทั้งได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาและการเฝ้าระวังโรคทั้งในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: เลปโตสไปรา, โค, สุกร, ซีโรวาร์

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบ ลักษณะเป็นเกลียว ที่เรียกว่า เลปโตสไปราชนิดก่อโรค (pathogenic leptospires) โดยเฉพาะกลุ่ม *Leptospira interrogans* โรคนี้พบได้ทั่วโลก (Farr, 1995) เป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทย (อุไร และกำพล, 2513; Bunnag *et al.*, 1983) และเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุข โดยระหว่าง พ.ศ. 2549-2558 พบอัตราป่วย 3.38–8.57 และอัตราการเสียชีวิต 0.04–0.12 ต่อประชากรแสนคน (MOPH, 2016) เชื้อเลปโตสไปราจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับปัสสาวะของสัตว์รังโรค (reservoir host) เช่น หนู โค กระบือ สุกร สุนัข ซึ่งสัตว์เหล่านี้ นอกจากจะเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อไปสู่คนและสัตว์อื่น ๆ แล้ว การติดเชื้อของปศุสัตว์ เช่น โค กระบือ ยังส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ เช่น ทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง เกิดการแท้งลูกในสัตว์ทำให้ผลผลิตน้อยลง (Alston and Broom, 1958) รวมถึงการไม่สามารถส่งออกสัตว์เพื่อการบริโภคได้

การตรวจวินิจฉัยสถานะการติดเชื้อเลปโตสไปราทางห้องปฏิบัติการ สามารถทำได้ทั้งการตรวจหาเชื้อโดยตรงและการตรวจทางซีรัมวิทยา ซึ่งวิธีการเพาะเชื้อและวิธี Microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐาน (WHO, 2003) โดยแต่ละวิธีล้วนแล้วแต่มีข้อจำกัด เช่น การเพาะเชื้อต้องใช้เวลาานาน หรือตัวอย่างปัสสาวะที่รองเก็บโดยตรงจากตัวสัตว์มักมีจุลชีพประจำถิ่น (normal flora) ปะปนอยู่ ซึ่งส่วนใหญ่เจริญได้

ดีกว่าเชื้อเลปโตสไปรา ผลการตรวจจึงอาจเป็นลบแบบเท็จ (false negative) และไม่สามารถเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปรา ให้บริสุทธิ์ได้ (กรมควบคุมโรค, 2557) ส่วนวิธี MAT มีข้อจำกัดคือ การตรวจหาระดับแอนติบอดีในสัตว์รังโรค โดยบอกได้เพียงว่าสัตว์เคยสัมผัสเชื้อมาก่อนและมีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเลปโตสไปราซีโรวารีใดบ้าง แต่ไม่สามารถระบุสถานะการติดเชื้อในปัจจุบันได้ และผลการวิเคราะห์ซีโรวารี จากซีรัมไม่สอดคล้องกับผลการเพาะเชื้อที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามระหว่างซีโรวารี (cross reaction) หรืออาจเกิด paradoxical reaction (Levett, 2001; WHO, 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจจากซีรัมที่เก็บเพียงครั้งเดียว อาจเป็นอุปสรรคต่อการแปลผลและอาจไม่สะท้อนถึง การติดเชื้อในปัจจุบัน ดังนั้นการรายงานซีโรวารีเชื้อ เลปโตสไปราจากการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะโดยวิธี MAT จึงให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยาใน ภาพรวมของซีโรวารีที่พบในภูมิภาคนั้น ๆ แต่ไม่สามารถ ให้ข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราที่อยู่ใน สัตว์ได้

การศึกษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมของเชื้อ เลปโตสไปรา สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา (molecular typing) ซึ่งต้องศึกษาจากเชื้อเลปโตสไปรา บริสุทธิ์ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้แก่ เลือด ไต ดิน น้ำ เป็นต้น โดยเทคนิคที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) และ Multilocus sequence typing (MLST) ยังไม่มีวิธีทาง molecular typing ใดที่ยอมรับว่าเป็น gold standard จึงจำเป็นต้องใช้หลายวิธีประกอบกัน และฐานข้อมูลทาง พันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในแต่ละวิธีก็มีอยู่อย่าง จำกัด โดยเฉพาะข้อมูลทางปศุสัตว์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการ รายงานซีโรวารีจากการตรวจหาแอนติบอดีเท่านั้น

ดังนั้นเพื่อให้ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ เลปโตสไปราในปศุสัตว์สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อหาความ เชื่อมโยงถึงการระบาดได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาสายพันธุ์ ของเชื้อเลปโตสไปราในปศุสัตว์โดยเก็บตัวอย่างซีรัมและ ปัสสาวะจากโคเนื้อ สุกรจากโรงฆ่าสัตว์ แล้วจำแนกเชื้อ โดยวิธีทาง molecular typing ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ทางระบาดวิทยา การสอบสวนโรค

ตลอดจนเป็นแนวทางในการวางแผนเฝ้าระวังและการ ป้องกันโรค นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ในการพัฒนา ต่อยอดสำหรับการผลิตชุดตรวจโรค และผลิตวัคซีนที่ จำเพาะต่อซีโรวารี ที่เป็นสาเหตุของโรคในแต่ละพื้นที่ สำหรับปศุสัตว์ในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรและการสุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างโคและสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ ในพื้นที่ ปศุสัตว์เขต 1 ถึง 9 ระหว่างปี พ.ศ. 2560-2562 โดย คำนวณขนาดตัวอย่างจากกลุ่มประชากรจำนวนมาก (infinite size) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Yamane, 1967) จำนวนทั้งสิ้น 531 ตัวอย่าง เป็นโคเนื้อ 190 ตัวอย่าง และสุกร 341 ตัวอย่าง สุ่มเก็บตัวอย่างแบบ simple random sampling แต่ละชุดตัวอย่างประกอบด้วยซีรัม และปัสสาวะ จากสัตว์ตัวเดียวกัน นอกจากนี้เก็บ ตัวอย่างกระป๋อง 22 ตัวอย่างในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 เพิ่มเติม ด้วยวิธี convenience sampling เนื่องจากงานวิจัยใน ครั้งนี้ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อจากโคเนื้อจากพื้นที่เขต 8 ได้

การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างทางซีรัมวิทยา โดย วิธี Microscopic agglutination test (MAT)

ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา 24 ซีโรวารี ได้แก่ Bratislava, Autumnalis, Ballum, Bataviae, Canicola, Celledoni, Cynopteri, Djasiman, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Louisiana, Manhao, Mini, Panama, Pomona, Pyrogenes, Ranarum, Sarmin, Sejroe, Shermani, Tarassovi และ Patoc ดำเนินการทดสอบใน 96 wells microplate เจือจางซีรัม 1:25 และเริ่มต้น dilution ที่ 1:50 ถึง 1:3200 แบบ 2-fold dilution แล้วเติมแอนติเจนซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปราความเข้มข้น $1-2 \times 10^8$ cells/ml ปริมาตร 25 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 1 °C เป็นเวลา 90-120 นาที อ่านผลการเกิดปฏิกิริยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นมืด รายงานผลไตเตอร์ สูงสุดของซีโรวารีที่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มตกตะกอน

$\geq 50\%$ โดยกำหนดค่าตัดสินที่ไตเตอร์ $\geq 1:100$ ตัวควบคุมลบ และตัวควบคุมบวก คือ phosphate buffer saline (PBS) และ rabbit-antiserum ที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 24 ซีโรวาร์ตามลำดับ

2. การตรวจสอบสารพันธุกรรมโดยวิธี Real time PCR สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปัสสาวะ โดยใช้ QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณยีน *LipL32* ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ปฏิบัติการประกอบด้วย 2X FastStart DNA probe master (Roche, Switzerland) ปริมาตร 10 μ l, forward และ reverse primers (45F: 5'-AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3', 286R: 5'-GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3') อย่างละ 0.4 μ M, probe (189P: FAM-5'AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-3'-BHQ1) 0.1 μ M (Stoddard, 2013) ดีเอ็นเอตั้งต้น 50 ng และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 20 μ l นำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง LightCycler[®]480 (Roche, Switzerland) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ pre-amplification 95 °C เวลา 10 นาที, 2-step amplification จำนวน 45 รอบ ที่ 95 °C 10 วินาที และ 55 °C เวลา 30 วินาที และ post-amplification 40 °C เวลา 30 วินาที โดยกำหนดค่าผลบวกที่ $C_t \leq 40$ ตัวควบคุมลบ และตัวควบคุมบวก คือน้ำกลั่น และดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ซีโรวาร์ Cellidoni ตามลำดับ

3. การเพาะเชื้อเลปโตสไปรา

เก็บตัวอย่างปัสสาวะจากกระเพาะปัสสาวะโดยวิธีปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 ml ใส่ใน transport media (1% bovine serum albumin) ปริมาตร 9 ml เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลาย transport media ปริมาตร 100-200 μ l เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ semi-solid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) นำไปบ่มเชื้อที่ 30 ± 1 °C (Ellinghausen, 1973) ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พื้นมีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 12-16 สัปดาห์ เพื่อสังเกตหาเชื้อเลปโตสไปราที่มีลักษณะเป็นสปirochete เมื่อเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราได้ จะทำให้บริสุทธิ์โดยการกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.2 μ m ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH broth บ่มเชื้อที่ 30 ± 1 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา

1. Serogrouping (SG)

นำเชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์ที่เพาะแยกได้ มาทำปฏิกิริยากับ rabbit-antiserum ที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 24 ซีโรวาร์ โดยแต่ละซีโรวาร์เป็นตัวแทนของแต่ละซีโรกรู๊ป ทำการเจือจาง rabbit-antiserum แบบ 2-fold dilution รายงานผลการทดสอบของค่าสูงสุดของไตเตอร์ที่ทำปฏิกิริยาการตกตะกอนกับเชื้อเลปโตสไปรา

2. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

เตรียมเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์อ้างอิงและเชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์ที่เพาะแยกได้ ความเข้มข้น 1×10^8 cells/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMJH broth และเตรียมดีเอ็นเอเชื้อเลปโตสไปรา ตามคู่มือของ CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad Laboratories, UK) ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Not I* (New England Biolabs, USA) (Romero, 2009) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ทั้งไว้ข้ามคืน แยกดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ สลับทิศทางเป็นจังหวะ ทำมุม +60 และ -60 องศา โดยใช้เครื่อง CHEF MAPPER (Bio-Rad Laboratories, UK) ใน 0.5X TBE ควบคุมอุณหภูมิที่ 14 °C initial และ final switch time เท่ากับ 5.5 และ 63.5 วินาที ตามลำดับวิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการเพาะแยกตัวอย่างเทียบกับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์อ้างอิงโดยแสดงผลเป็นค่า % similarity โดยใช้โปรแกรม Gel compare II version 4.6 (Applied Maths, USA) เลือกใช้ cluster analysis แบบ dice band-based coefficient dendrogram UPGMA

3. Multilocus sequence typing (MLST)

เชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์ที่เพาะแยกได้ความเข้มข้น 1×10^6 cells/ml นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany) ตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี PCR โดยยีนเป้าหมาย คือ housekeeping gene จำนวน 7 ยีน ได้แก่ *tipA*, *sucA*, *caiB*, *pntA*, *pfkB*, *glmU* และ *mreA* เตรียม master mix ประกอบด้วย 2X GoTaq green master mix (Promega, USA) 25 μ l, $MgCl_2$ 0.05 mM – 0.075 mM, forward และ reverse primer อย่างละ 0.2 μ M ดีเอ็นเอตั้งต้น 50 ng และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ให้ครบ 50 µl จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง ThermoCycler (HVD life science, Austria) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ pre-amplification 95 °C เวลา 2 นาที, amplification ที่ 95 °C เวลา 10 วินาที, 46 °C เวลา 15 วินาที และ 72 °C เวลา 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) และ post-amplification 72 °C เวลา 7 นาที (Boonsilp *et al.*, 2013) จากนั้นนำ PCR product มาวิเคราะห์ผลบน 1.5% agarose gel ย้อมแผ่นเจลด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีโดยใช้เครื่อง Gel Documentation (Alpha Innotech, USA) นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสในโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) จากนั้นจำแนกเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคโดยนำไปเปรียบเทียบ sequence type (ST) กับเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงในฐานข้อมูลในเว็บไซต์ Public databases for molecular typing: PubMLST (<http://pubmlst.org/leptospira/>)

4. 16S rRNA sequencing

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยทำ single tube nested PCR ของยีน 16S rRNA ของเชื้อเลปโตสไปรา จะได้ขนาด PCR product เท่ากับ 547 และ 443 bp ตามลำดับ ปฏิบัติประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 µl, MgCl₂ 4.5 mM, dNTPs 200 µM, Betaine 1M, Taq DNA polymerase 1.25 unit, outer primer F (5' CTCAGAACTAACGCTGGCGGCGCG 3') และ outer primer R (5' GGTTCGTTACTGAG GGTATAAACCCCC 3') อย่างละ 0.15 µM, inner F primer (5' CTGGCGGCGCTCTTA 3') ปริมาตร 1.25 µM, inner R primer (5' GTTTTCACACCTGACTTACA 3') ปริมาตร 5 µM ดีเอ็นเอตั้งต้น 50 ng และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 µl นำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้เครื่อง thermocycler (HVD life science, Austria) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ ดังนี้ pre-amplification 95 °C เวลา 2 นาที amplification รอบแรก ที่ 95 °C เวลา 10 วินาที, 67 °C เวลา 15 วินาที และ 72 °C เวลา 30 วินาที (จำนวน 40 รอบ) และ amplification รอบสอง ที่ 95 °C เวลา 10 วินาที, 55 °C เวลา 15 วินาที และ 72 °C เวลา 30 วินาที (จำนวน 40 รอบ) post-amplification

72 °C เวลา 7 นาที (Boonsilp *et al.*, 2011) จากนั้นนำ PCR product มาวิเคราะห์ผลบนแผ่นเจล 1.5% agarose gel ย้อมแผ่นเจลด้วย 0.5 µg/ml ethidium bromide ถ่ายภาพภายใต้แสงยูวีโดยใช้เครื่อง Gel Documentation (Alpha Innotech, USA) นำ PCR product ที่ได้ไปหาลำดับเบสของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสในโปรแกรม MEGA 7 โดยนำไปเปรียบเทียบในระดับสปีชีส์กับเชื้อเลปโตสไปราอ้างอิงในฐานข้อมูลในเว็บไซต์ NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

ผลและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่สุสัตว์เขต 1 ถึง 9 จำนวนทั้งสิ้น 553 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่าง โคเนื้อ 190 ตัวอย่าง สุกร 341 ตัวอย่าง และกระบือ 22 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

การเกิดปฏิกิริยาทางภูมิคุ้มกัน และความชุกของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ

พบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา (seroreactivity) ในซีรัมโคเนื้อทุกเขตปศุสัตว์ โดยมีค่า 83.68% (159/190) ซีโรวาร์ที่พบมากที่สุดสองอันดับแรก ได้แก่ Shermani 91.20% (145/159) และ Ranarum 89.94% (143/159) ส่วนซีโรวาร์อื่นที่พบ ได้แก่ Sejroe และ Djasiman สำหรับสุกรพบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราทุกเขต ยกเว้นเขต 7 และ 8 โดยมีค่า 17.01% (58/341) พบซีโรวาร์ Shermani และ Ranarum มากที่สุดเช่นเดียวกับ โคเนื้อ โดยพบ Shermani 70.69% (41/58) และ Ranarum 55.17% (32/58) การที่พบเปอร์เซ็นต์แอนติบอดีของโคเนื้อมากกว่าในสุกรอาจเป็นเพราะโคเนื้อ มีช่วงชีวิตการเลี้ยงยาวนานกว่าสุกร อีกทั้งมีการเลี้ยงแบบปล่อย จึงมีโอกาสสัมผัสเชื้อได้มากกว่าสุกร ซึ่งส่วนใหญ่ถูกเลี้ยงจำกัดอยู่ในฟาร์ม สำหรับกระบือจากปศุสัตว์เขต 8 พบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา 77.27% (17/22) โดยพบแอนติบอดีต่อซีโรวาร์ Ranarum 94.12% (16/17) มากที่สุด รองลงมา คือ ซีโรวาร์ Shermani โดยพบ 88.24% (15/17)

ค่าเปอร์เซ็นต์แอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปรา

ตารางที่ 1 รายละเอียดและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการตัวอย่างโคเนื้อ สุกร และกระบือ พื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 ถึง 9

เขตพื้นที่	จังหวัด	ชนิดสัตว์	จำนวน (ตัว)	ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ			
				วิธี MAT		Real-time PCR	เพาะเชื้อ
				Titer $\geq 1:100^*$	ซีโรวาร์ที่พบ	บวก Ct $\leq 40^*$	พบสไปโรเช็ต*
1	กรุงเทพฯ	โคเนื้อ	15	14 (93.33%)	Ranarum, Shermani	5 (33.33%)	3 (20.00%)
		สุกร	30	2 (6.67%)	Shermani, Bratislava, Ranarum	5 (16.67%)	3 (10.00%)
2	ชลบุรี	โคเนื้อ	30	27 (90.00%)	Shermani, Ranarum, Sejroe,	4 (13.33%)	3 (10.00%)
		สุกร	60	8 (13.33%)	Bratislava, Shermani, Ranarum	11 (18.33%)	3 (5.00%)
3	บุรีรัมย์	โคเนื้อ	17	15 (88.24%)	Ranarum Shermani, Sejroe	10 (58.82%)	4 (23.53%)
		สุรินทร์	สุกร	30	13 (43.33%)	Shermani, Ranarum, Bratislava	4 (13.33%)
4	มุกดาหาร	โคเนื้อ	16	14 (87.50%)	Ranarum, Shermani	7 (43.75%)	1 (6.25%)
		สุกร	30	11 (36.67%)	Bratislava, Ranarum, Shermani	16 (53.33%)	0
5	เชียงใหม่	โคเนื้อ	27	18 (66.67%)	Ranarum, Shermani	0	0
		สุกร	34	4 (11.76%)	Shermani, Bratislava	2 (5.88%)	0
6	ตาก พิจิตร พิษณุโลก	โคเนื้อ	15	14 (93.33%)	Djasiman, Ranarum, Shermani	0	1 (6.67%)
		สุกร	66	7 (10.61%)	Ranarum, Shermani, Bratislava	1 (1.52%)	0
7	ราชบุรี	โคเนื้อ	17	7 (41.18%)	Ranarum, Shermani	13 (76.47%)	3 (17.64%)
		สุกร	31	0	-	0	0
8	พังงา พัทลุง	โคเนื้อ	29	26 (89.66%)	Shermani, Ranarum	0	0
		สุกร	30	0	-	0	2 (6.67%)
		กระบือ	22	17 (77.27%)	Ranarum, Shermani	4 (18.18%)	4 (18.18%)
9	สงขลา	โคเนื้อ	24	24 (100.00%)	Ranarum, Shermani, Sejroe	0	0
		สุกร	30	13 (43.33%)	Ranarum, Shermani, Bratislava	2 (6.67%)	0
รวม			553	28 (5.06%)			

หมายเหตุ: * จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวก (%)

จากการศึกษาที่สูงกว่าการศึกษาของ Chadsuthi *et al.* (2017) ในทุกชนิดสัตว์ ซึ่งศึกษาในประเทศไทยระหว่าง พ.ศ. 2553–2560 โดยรายงานค่าความชุกทางซีรัมในโค เท่ากับ 28.1%, สุกร 11.3% และกระบือ 24.8% สำหรับ ซีโรวาร์ที่พบบ่อยในโคและสุกร คือ Shermani และ Ranarum เช่นเดียวกัน แต่ในกระบือซีโรวาร์ที่พบมีความแตกต่างกับการศึกษาครั้งนี้ โดยภาคใต้พบซีโรวาร์ Louisiana แต่การศึกษานี้ซีโรวาร์ที่มากคือ Ranarum และ Shermani ซึ่งก็พบซีโรวาร์ Louisiana ด้วยเช่นกัน โดยพบเพียง 1 ตัวอย่าง (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การตรวจคัดกรองการติดเชื้อเลปโตสไปราชนิด ก่อโรคในสัตว์โดยวิธี real-time PCR ต่อยีน *LipL32* พบเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคในปัสสาวะโคเนื้อ สุกร และกระบือ คิดเป็นความชุกของเชื้อในปัสสาวะ (uoprevalence) คือ 20.53% (39/190), 12.02% (41/341) และ 18.18% (4/22) ตามลำดับ โคเนื้อพบความ ชุกสูงสุดในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 7 คือ 76.47% (13/17) รองลงมาคือเขต 3 คิดเป็น 58.82% (10/17) แต่ไม่พบ สารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปรา ชนิดก่อโรคในพื้นที่

ปศุสัตว์เขต 5, 6, 8 และ 9 สำหรับสุกรพบความชุกสูงสุดในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 4 คือ 53.33% (16/30) รองลงมาคือ เขต 2 เท่ากับ 18.33% (11/60) ส่วนเขต 7 และ 8 ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราชนิด ก่อโรค (ตารางที่ 1) การศึกษานี้ใช้วิธี real-time PCR ต่อยีน *LipL32* ซึ่งถอดรหัสเป็น outer membrane protein ที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ผลจากการตรวจจึงแสดงว่าโคเนื้อ สุกรและกระบือสามารถขับ เชื้อเลปโตสไปราก่อโรคออกมาพร้อมกับปัสสาวะได้ ประมาณ 12-20% โดยในโคมีการพบเชื้อสูงที่สุดที่ 20% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zarantonelli *et al.* (2018) ซึ่งศึกษาโคในประเทศอิตาลี เชื้อสามารถถูกขับออกมา กับปัสสาวะของสัตว์ปกติที่ไม่มีอาการป่วยได้ จากการ ศึกษานี้ได้เก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ซึ่งสัตว์ก็ไม่แสดง อาการป่วยแต่อย่างใด เชื้อเลปโตสไปราที่ถูกขับออกมามี โอกาสปนเปื้อนในดินและน้ำ รวมทั้งสามารถติดต่อสู่ ผู้เลี้ยงสัตว์โดยการสัมผัสปัสสาวะ หรือดิน น้ำที่ปนเปื้อน เชื้อได้ ดังนั้นปศุสัตว์จึงเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญของโรค เลปโตสไปโรซิสที่ควรมีการเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง

ผลการจำแนกสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา

จากการสังเกตเชื้อที่เพาะจากปัสสาวะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.06% (28/553) (ตารางที่ 1) ในจำนวนนี้มีเพียง 21 ตัวอย่างที่มีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับจำแนกสายพันธุ์ แบ่งออกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ จำนวน 14 isolates (Unknown 1-14) ประกอบด้วย โคเนื้อ 10 isolates และ กระปือ 4 isolates ส่วนตัวอย่างสุกไม่สามารถเพาะแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ได้ (ตารางที่ 2) จากนั้นนำเชื้อเลปโตสไปราบริสุทธิ์จำนวน 14 isolates มาจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี serotyping (SG) และ molecular typing (MLST, PFGE และ 16S rRNA sequencing) การจำแนกสายพันธุ์โดยวิธี SG ทำได้โดยใช้โพลีโคลนัล แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา จำนวน 24 ซีโรวาร์ ซึ่งเป็นตัวแทนของแต่ละซีโรกรุ๊ป สังเกตและรายงานผลได้เตอร์ที่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม การศึกษานี้พบว่าเชื้อที่เพาะแยกได้ คือ Unknown 1, 2, 3, 4, 5, 9 และ 10 ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่มที่ค่าไคเตอร์สูงสุดกับ ซีโรกรุ๊ป Sejroe (1:6,400) เชื้อ Unknown 6 ทำปฏิกิริยากับ ซีโรกรุ๊ป Sejroe (1:25,600) เชื้อ Unknown 7 ทำปฏิกิริยากับ ซีโรกรุ๊ป Bataviae แต่มีค่าไคเตอร์เพียง 1:200 เชื้อ Unknown 8 ทำปฏิกิริยากับ ซีโรกรุ๊ป Pomona (1:1,600) เชื้อ Unknown 11, 12 และ 13 ทำปฏิกิริยากับ ซีโรกรุ๊ป Autumnalis (1:1,600) และเชื้อ Unknown 14 ทำปฏิกิริยากับ ซีโรกรุ๊ป Autumnalis เช่นกัน แต่มีค่าไคเตอร์ 1:3,200 ส่วนอีก 7 ตัวอย่าง (Unknown 15-21) ไม่สามารถเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้จึงจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี 16S rRNA sequencing แสดงผลดังตารางที่ 2

การศึกษครั้งนี้ใช้วิธี PFGE และ MLST ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับกันทั่วไป วิธี PFGE ทำได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* ย่อยชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จากนั้นเปรียบเทียบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์อ้างอิงที่มีในห้องปฏิบัติการของศูนย์เลปโตสไปโรสิส สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ รายงานผลการวิเคราะห์เป็นค่า % similarity ซึ่งจะมีประโยชน์ในด้านระบาดวิทยามากกว่า สำหรับวิธี MLST มีข้อเด่นในเรื่องฐานข้อมูลออนไลน์ซึ่งเชื่อถือได้ อีกทั้ง เป็นวิธีการซึ่งวิเคราะห์ allele number ได้แก่ ยีน *tipA*, *sucA*, *caiB*, *pntA*, *pfkB*, *glmU* และ *mreA* ที่จำเพาะต่อเชื้อเลปโตสไปรา

ไปราชนิดก่อโรค จึงให้รายละเอียดในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้มากกว่า (Hartskeerl and Smythe, 2015)

ผลการจำแนกสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรา ด้วยวิธี MLST พบว่าเชื้อ Unknown 1 ถึง 6, 9 และ 10 เป็นเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรกรุ๊ป Sejroe ซีโรวาร์ Hardjobovis (ST 152) ซึ่งจำแนกได้จากตัวอย่างโคเนื้อในเขต 1, 2, 3 และ 7 นอกจากนี้การใช้วิธีทางห้องปฏิบัติการหลาย ๆ วิธี ได้ผลสอดคล้องกัน (ตารางที่ 2) เชื้อ Unknown 7 จากตัวอย่างโคเนื้อในเขต 4 ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี MLST ดังนั้นเชื่อนี้อาจจะเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดอื่น เช่น กลุ่มไม่ก่อโรค หรือกลุ่ม intermediate จึงยืนยันผลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA โดยผลเป็นเชื้อ *L. licerasiae* ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่ม intermediate เชื้อ Unknown 8 จากตัวอย่างโคเนื้อพื้นที่เขต 6 จำแนกโดยวิธี MLST สามารถยืนยันผล allele number ของยีนได้เพียง 4 ยีน เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล บอกได้เพียงระดับสปีชีส์ คือเป็นเชื้อเลปโตสไปรา *L. interrogans* และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย PFGE พบว่ามีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Pomona โดยมีค่า similarity เท่ากับ 80% (ตารางที่ 2)

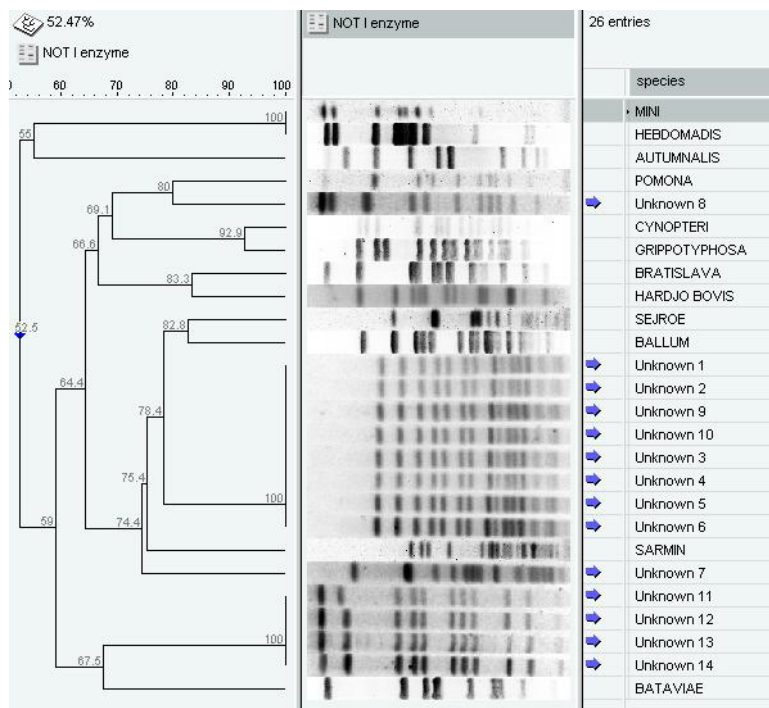
เชื้อ Unknown 11 ถึง 14 เพาะแยกได้จากกระปือพื้นที่ปศุสัตว์เขต 8 พบว่ามีรูปแบบ allele number ของยีนทั้ง 7 ยีนเป็นรูปแบบใหม่ และจัดเป็น ST ใหม่ ซึ่งไม่ตรงกับเชื้อใดในฐานข้อมูล MLST (ตารางที่ 2) ซึ่งบอกได้เพียงเป็นเชื้อเลปโตสไปรา *L. interrogans* ซึ่งเป็นเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคสปีชีส์หนึ่งเท่านั้น ส่วนการวิเคราะห์ด้วย PFGE มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกับเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Bataviae และมีค่า similarity เพียง 67.5 % (รูปที่ 1) แต่ผลจากวิธี SG ตรงกับ ซีโรกรุ๊ป Autumnalis ซึ่งเป็นวิธีจำแนกทางซีรัม แสดงให้เห็นว่าผลการจำแนกสายพันธุ์ทางซีรัมและดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันได้ (Levett, 2001) โดยจะต้องหาวิธีพิสูจน์ต่อไปว่าเป็นเชื้อเลปโตสไปรา ซีโรกรุ๊ป ซีโรวาร์ใด หรือเป็นเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจะต้องอาศัยเทคนิคอื่นเข้ามาช่วย เช่น การจำแนกโดยวิธี DNA-DNA hybridization หรือ whole genome sequencing เป็นต้น

เชื้อ Unknown 15 ถึง 21 เป็นเชื้อเลปโตสไปราที่ไม่สามารถเพาะแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ แต่เบื้องต้น

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบผลการจำแนกเชื้อไลโปโปรตีน 1 ถึง 21 โดยวิธี SG, MLST, PFGE และ 16S rRNA sequencing

Unknown	เขตพื้นที่	ชนิดสัตว์	เพาะเชื้อ	SG		MLST				PFGE		16S rRNA	
				Serovars (titer)	ST	Species	Serogroup	Serovars	Serovars	Serovars	% Similarity	Species	Species
1	1	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
2	1	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
3	2	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
4	2	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
5	2	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
6	3	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:25,600)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
7	4	โคเนื้อ	+	Bataviae (1:200)	ND	ND	ND	ND	Sejroe, Sarmin	Sejroe, Sarmin	74.4	<i>L. licheriae</i>	<i>L. licheriae</i>
8	6	โคเนื้อ	+	Pomona (1:1,600)	ND	<i>L. interrogans</i>	ND	ND	Pomona	Pomona	80.0	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
9	7	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
10	7	โคเนื้อ	+	Sejroe (1:6,400)	152	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sejroe	Sejroe	78.4	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
11	8	กระบือ	+	Autumnalis (1:1,600)	ND	<i>L. interrogans</i>	ND	ND	Bataviae	Bataviae	67.5	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
12	8	กระบือ	+	Autumnalis (1:1,600)	ND	<i>L. interrogans</i>	ND	ND	Bataviae	Bataviae	67.5	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
13	8	กระบือ	+	Autumnalis (1:1,600)	ND	<i>L. interrogans</i>	ND	ND	Bataviae	Bataviae	67.5	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
14	8	กระบือ	+	Autumnalis (1:3,200)	ND	<i>L. interrogans</i>	ND	ND	Bataviae	Bataviae	67.5	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
15	1	โคเนื้อ	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
16	1	โคเนื้อ	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
17	2	สุกร	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. santarosai</i>	<i>L. santarosai</i>
18	2	สุกร	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
19	2	สุกร	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
20	7	โคเนื้อ	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>
21	7	โคเนื้อ	NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. borgpetersenii</i>

หมายเหตุ: NP the isolate cannot be purified, ND: not determine, nd: not done



รูปที่ 1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราที่เพาะแยกได้จากตัวอย่าง Unknown 1 ถึง 14 วิเคราะห์ด้วยวิธี Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) แสดงผลโดยใช้โปรแกรม Gel compare II version 4.6 (Applied Maths, USA)

ให้ผลบวกต่อเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรค ด้วยวิธี real-time PCR การจำแนกสายพันธุ์เชื้อที่ไม่บริสุทธิ์ทำได้โดยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *16S rRNA* เพื่อจำแนกในระดับสปีชีส์ โดยเชื้อ Unknown 15, 16, 20 และ 21 ได้จากตัวอย่างปัสสาวะโคนือในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 และ 7 ผลการจำแนกเป็นเชื้อเลปโตสไปรา *L. borgpetersenii* ส่วนเชื้อ Unknown 17, 18 และ 19 ได้จากตัวอย่างปัสสาวะสุกร จากพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2 และผลการจำแนกพบว่า เชื้อ Unknown 17 เป็นเชื้อเลปโตสไปรา *L. santarosai* เชื้อ Unknown 18 เป็นเชื้อ *L. borgpetersenii* และเชื้อ Unknown 19 เป็นเชื้อ *L. interrogans* (ตารางที่ 2)

ข้อมูลสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในปศุสัตว์มีค่อนข้างจำกัด จากการศึกษาของ Kurilung *et al.* (2017) ซึ่งศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะในโค และสุกร ในจังหวัดน่าน โดยใช้เทคนิค MLST และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *16S rRNA* พบว่าในโคและสุกรพบเชื้อ *L. interrogans* และ *L. welli* ส่วนการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อเลปโตสไปรา *L. borgpetersenii* ในเขต 1, 2, 3 และ 7 *L. interrogans* ในเขต 6 และ *L. licerasiae* ในเขต 4 สำหรับสุกรพบเชื้อเลปโตสไปราเฉพาะในเขต 2 เป็นเชื้อ *L. santarosai*, *L. borgpetersenii*

และ *L. interrogans* ซึ่งการศึกษานี้พบเชื้อสปีชีส์ที่หลากหลายมากกว่าการศึกษาของ Kurilung *et al.* (2017) และพบเชื้อกลุ่ม intermediate ด้วย อาจเนื่องจากการศึกษาในพื้นที่แตกต่างกันและได้ศึกษาในพื้นที่ปศุสัตว์ทุกเขตทั่วประเทศ ทำให้ทราบว่าแต่ละพื้นที่มีโอกาสพบเชื้อเลปโตสไปราสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเขตพื้นที่ที่ใกล้เคียงกัน คือ เขต 6 จังหวัดตาก พบเชื้อ *L. interrogans* เช่นเดียวกับรายงานการพบเชื้อในโคและสุกรจังหวัดน่าน การศึกษาของ Cosson *et al.* (2014) จำแนกเชื้อในหนูธรรมชาติโดยส่วนใหญ่จังหวัดน่าน พบเชื้อ *L. interrogans* ส่วนจังหวัดเลยพบ *L. borgpetersenii* รองลงมาคือ *L. interrogans* และ *L. kirschneri* ตามลำดับ โดยเมื่อวิเคราะห์รายงานผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือย้อนหลังขณะช่วงเวลานั้นเมื่อ พ.ศ. 2547 เชื้อสายพันธุ์ที่พบคือ *L. interrogans* (ST34) ซีโรวาร์ Autumnalis ซึ่งส่วนใหญ่ได้จากผู้ป่วยจังหวัดอุดรธานี (Thaipadungpanit *et al.*, 2007) สำหรับการศึกษาี้ ผู้วิจัยได้สำรวจในช่วง พ.ศ. 2560-2562 ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวทั่วประเทศพบอัตราการป่วยในคน 4.42-2.35 ต่อประชากรแสนคน และอัตราการตาย 1.2-1.4% แต่ไม่มีรายงานว่าเชื้อสายพันธุ์ใดที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิต (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) โดยข้อมูลนี้

อาจใช้เทียบเคียงได้คือการศึกษาลักษณะทางคลินิกและระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในพื้นที่ประสบอุทกภัยภาคใต้ตอนบน ปี 2560 ซึ่งผล MAT พบซีโรวาร์ของเชื้อก่อโรคในผู้ป่วยสูงสุดคือ Shermani ซึ่งก็เป็นซีโรวาร์ที่พบส่วนใหญ่ในโค สุนัข และสุนัขที่อยู่บริเวณนั้นเช่นกัน (ขาลิตา, 2563) จึงสอดคล้องกับผลการศึกษาในที่พบแอนติบอดีต่อซีโรวาร์ Shermani สูงที่สุดในโค และสุนัข อย่างไรก็ตามซีโรวาร์ดังกล่าวก็ไม่ตรงกับผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปรามีความหลากหลาย อีกทั้งการจำแนกสายพันธุ์ทางซีรัม (serological typing) และการจำแนกตามคุณสมบัติทางพันธุกรรมของเชื้อ (molecular typing) นั้นไม่มีความเกี่ยวเนื่องกัน จึงไม่สามารถใช้ผลของวิธีหนึ่งทำนายผลของอีกวิธีหนึ่งได้ (Levett, 2001; Marquez *et al.*, 2017) นอกจากนี้วิธี MAT ยังไม่เหมาะกับการใช้วินิจฉัยโรคในสัตว์รายตัวที่มีลักษณะการติดเชื้อแบบเรื้อรังอย่างในสัตว์รังโรค แต่อาจช่วยบ่งชี้สภาวะการมีเชื้อในฝูงสัตว์ (Ellis, 2015) และโรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคประจำถิ่นของประเทศไทยจึงพบแอนติบอดีได้ในสัตว์รังโรค สัตว์ที่ได้รับเชื้อมักไม่แสดงอาการและสามารถขับเชื้อปนมากับปัสสาวะได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการติดเชื้อและอาจยาวนานได้เป็นปี ในกรณีที่ได้รับเชื้อต่อเนื่อง (persistent infection) (Bal *et al.*, 1994) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสจึงควรเก็บตัวอย่างปัสสาวะตรวจด้วยเพื่อดูภาวะการแพร่เชื้อด้วย

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การพบแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราในเปอร์เซ็นต์ที่สูงแสดงให้เห็นถึง antibody background ของปศุสัตว์ในประเทศไทย การศึกษารังนี้สามารถจำแนกเชื้อเลปโตสไปราจากโคเนื้อ สุนัข และกระบือ ซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่สำคัญของประเทศไทย โดยเชื้อเลปโตสไปราสปีชีส์ *borgpetersenii* ซีโรกรุ๊ป Sejroe ซีโรวาร์ Hardjobovis เป็นสายพันธุ์หลักที่พบในโคเนื้อ นอกจากนี้ยังพบเชื้อกลุ่ม intermediate คือ *L. licerasiae* อีกด้วย สุนัขพบเชื้อ *L. santarosai*, *L. borgpetersenii* และ *L. interrogans* ส่วนกระบือพบเชื้อ *L. interrogans* อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุซีโรกรุ๊ปหรือซีโรวาร์ได้

ซึ่งอาจต้องมีการศึกษา whole genome sequencing ต่อไป ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงการกระจายตัวของเชื้อที่มีอยู่ในปศุสัตว์ของประเทศไทย ซึ่งสัตว์เหล่านี้เป็นแหล่งรังโรคที่มีโอกาสขับเชื้อผ่านทางปัสสาวะมาปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เมื่อคนสัมผัสเชื้อจึงมีโอกาสติดเชื้อได้ ข้อมูลสายพันธุ์เชื้อเลปโตสไปราที่ได้ครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาทางระบาดวิทยา การสอบสวนโรค ตลอดจนการเฝ้าระวังโรคทั้งในคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2560-2562 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าของโรงฆ่าสัตว์ในความเอื้อเฟื้อสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง เจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์เขต 1 ถึง 9 และเจ้าหน้าที่สำนักงานปศุสัตว์จังหวัด ในการช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกการเก็บตัวอย่าง และทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวถึงในความช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ขาลิตา วารวณิช. 2563. ลักษณะทางคลินิกและระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสในพื้นที่ประสบอุทกภัยภาคใต้ตอนบนปี 2560. วารสารวิชาการสาธารณสุข. 29(4): 580-9.
- กรมควบคุมโรค. 2557. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ. 10-11: 61-2.
- อุไร โพธา และกัมพล พันธอำพล. 2513. เลปโตสไปโรซิสในประเทศไทย. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 3: 1-42.
- Alston, J.M. and Broom, J.C. 1958. Leptospirosis in man and animals. E. & S. Livingstone Ltd, Edinburgh. 237-241.
- Bal, A.E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R.A., De Meza-Brewster, J., Korver, H. and Terpstra, W.J. 1994. Detection of *Leptospire*s in urine by PCR for early diagnosis of Leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 32(8): 1894-8.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Chierakul, W.,

- Limmathurotsakul, D., Day, N.P. and Peacock, S.J. 2011. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC diseases*. 11(1): 338.
- Boonsilp, S., Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Wuthiekanun, V., Bailey, M.S., Holden, M.T., Zhang, C., Jiang, X., Koizumi, N., Taylor, K., Galloway, R., Hoffmaster, A.R., Craig, S., Smythe, L.D., Hartskeerl, R.A., Day, N.P., Chantratita, N., Feil, E.J., Aanensen, D.M., Spratt, B.G. and Peacock, S.J. 2013. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(1): e1954.
- Bunnag, T., Potha, U., Thirachandra, S. and Impand, P. (1983). Leptospirosis in man and rodents in North and Northeast Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health*. 14(4): 481-487.
- Chadsuthi, S., Bicout, D.J., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. (2017). Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(2): e0005228.
- Cosson, J.F., Picardeau, M., Mielcarek, M., Tatard, C., Chaval, Y., Suputtamongkol, Y., Buchy, P., Jittapal-pong, S., Herbreteau, V. and Morand, S. 2014. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(6): e2902.
- Ellinghausen Jr, H.C. 1973. Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospires. *J. Med Microbiol*. 6(4): 487-497.
- Ellis, W.A. 2015. Animal leptospirosis. In *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg. 99-137.
- Farr, R.W. 1995. Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis*. 21: 1-6.
- Hartskeerl, R.A., and Smythe, L.D. 2015. The role of leptospirosis reference laboratories. In *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg. 273-288.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 33(7): 1870-1874.
- Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V. and Prapasarakul, N. 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. *Res Vet Sci*. 115: 146-54.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 14(2): 296-326.
- Marquez, A., Djelouadji, Z., Lattard, V. and Kodjo, A. 2017. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol*. 20(4): 184-193.
- MOPH. 2016. Situation of Leptospirosis, Thailand, 2015. *Weekly Epidemiological Surveillance Report*. Online Available: https://wesr.boe.moph.go.th/wesr_new/file/y59/F59211_1525.pdf. Accessed on Oct 18. 2018.
- Romero, E.C., Blanco, R.M., and Galloway, R.L. 2009. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Lett Appl Microbiol*. 48(5): 623-627.
- Stoddard, R.A. (2013). Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through real-time PCR (qPCR) targeting the *LipL32* gene. In *PCR Detection of Microbial Pathogens*. Humana Press, Totowa, NJ. 257-266.
- Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L.D., Petkanchanapong, W., Limpai boon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A.T., Suputtamongkol, Y., White, N.J., Feil, E.J., Day, N.P. and Peacock, S.J. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 1(1): e56.
- WHO. 2003. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. 1-109.
- Yamane, T. 1967. Elementary sampling theory. Prentice-Hall, New Jersey.
- Zarantonelli, L., Suanes, A., Meny, P., Buroni, F., Nieves, C., Salaberry, X., Briano, C. Ashfield, N. Da Silva Silveira, C., Dutra, F., Easton, C., Fraga, M., Giannitti, F., Hamond, C., Macias-Rioseco, M., Menendez, C., Mortola, A., Picardeau, M., Quintero, J., Rios, C., Rodriguez, V., Romero, A., Varela, G., Rivero, R., Schelotto, F., Riet-Correa, F., Buschiazzi, A. and Grupo de Trabajo Interinstitucional de Leptospir

rosis, Consortium. 2018. Isolation of pathogenic *Leptospira* strains from naturally infected cattle in Uruguay reveals high serovar diversity, and uncovers a relevant risk for human leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(9): e0006694.