



การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทาง ห้องปฏิบัติการ

Laboratory diagnosis of leptospirosis

พรทิพย์ ปิ่นละอ

บทคัดย่อ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่เป็นปัญหาด้านสัตว์เศรษฐกิจสำหรับประเทศที่พัฒนาแล้ว และยังคงเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขสำหรับประเทศในเขตร้อนที่กำลังพัฒนา มีรายงานการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสมากขึ้นและอาการแสดงของโรคนี้มีหลายแบบ การตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบที่จำเพาะจึงเป็นสิ่งจำเป็น การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส ได้แก่ การตรวจโดยตรงและการตรวจทางซีโรโลยี การตรวจโดยตรง เช่น การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบได้แม้ในสิ่งส่งตรวจมีเชื้อเลปโตสไปราเพียง 10 เซลล์ การตรวจทางซีโรโลยีเป็นการตรวจหาแอนติบอดีมีบทบาทสำคัญในการตรวจวินิจฉัย วิธี MAT เป็นการตรวจทางซีโรโลยีวิธีหนึ่งซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานและเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อ เนื่องจากสามารถนำไปใช้ตรวจได้ในคนและสัตว์ และสามารถเลือกใช้แอนติเจนได้ตามต้องการ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการทดสอบมากมายที่ตรวจได้รวดเร็วเพื่อประโยชน์ในการรักษาโดยการให้ยาต้านจุลชีพแก่ผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน และการทดสอบดังกล่าวควรพัฒนาเพื่อให้ตรวจได้ง่ายและสามารถนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลาย

คำรหัส: เลปโตสไปโรซิส ● PCR ● MAT

ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Laboratory diagnosis of leptospirosis

Porn-tip Pinlaor

Leptospirosis continues to be the disease of considerable economic significance in animal husbandry in developed countries, but the major burden of human disease remains in tropical developing countries. Several recent outbreaks of leptospirosis have occurred and the disease has broad spectrum of clinical manifestations. For confirmation of the diagnosis, specific tests are necessary. Diagnosis of leptospirosis relies on either direct method to detect the causative organisms or serological tests to detect specific antibodies in the sera. PCR technique was able to detect as few as 10 leptospires and it provided to detect the causative agents in the early infection. Serological methods play an important role in the diagnosis of leptospirosis. Microscopic agglutination test (MAT), as a reference test, is employed in epidemiological serosurveys, since it can be applied to detect antibodies from either human or animal sera. In addition, the range of antigens used can be expanded or decreased as required. However, this technique is not widely used since it has significant drawbacks. The development of several promising approaches to rapid diagnosis has been based not only on the recognition that early initiation of antibiotic therapy is important in acute disease, but also on the need for simpler assays that can be used more widely.

Key words: Leptospirosis ● PCR ● MAT

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis) หรือโรคไข้ฉี่หนู เป็นโรคติดต่อประจำถิ่น (endemic disease) และเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยในปัจจุบัน เนื่องจากการระบาดของโรคเพิ่มขึ้นทุกปีนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 เป็นต้นมา อัตราป่วยของประชากรที่ป่วยด้วยโรคนี้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลกับ 10 ปีที่ผ่านมา คือ

ในปี พ.ศ. 2528-2538 มีอัตราป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรซิส 0.30 ต่อประชากรแสนคน และสูงขึ้นในปี พ.ศ. 2539 เท่ากับ 0.58 ต่อประชากรแสนคน¹ และจากรายงานของกองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ. 2543 มีรายงานผู้ป่วยจำนวน 14,608 ราย คิดเป็นอัตราป่วย 23.65 ต่อประชากรแสนคน โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ²

Department of Clinical Microbiology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่เกิดจากสัตว์ติดต่อมาสู่คน (zoonosis) สัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค (reservoir) มีทั้งสัตว์ป่า ได้แก่ กระรอก กวาง สุนัขจิ้งจอก และสัตว์อื่นๆ ได้แก่ หนู สุนัข สุกร โค กระบือและแมว เป็นต้น โดยเชื้อจะอาศัยอยู่ในท่อไตของสัตว์ที่เป็นแหล่งรังโรค และถูกขับออกมากับปัสสาวะ แล้วแพร่ไปตามน้ำและดิน เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นานเป็นเดือน ในแหล่งน้ำและดินที่มีความชื้นหรือมีร่มเงา มีสภาพความเป็นกรดต่ำ (pH) 7.2-7.4 และอุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส³ การติดเชื้ออาจติดโดยการสัมผัสกับสิ่งขับถ่ายจากสัตว์โดยตรง หรือติดต่อทางอ้อมโดยการสัมผัสดินหรือน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน โดยเชื้อจะแทรกหรือไชเข้าทางผิวหนังหรือเยื่อต่างๆ เช่น เยื่อบุตา จมูก และปาก เป็นต้น¹

เมื่อผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย จะมีระยะฟักตัวของโรค 5-14 วัน ผู้ที่ได้รับเชื้ออาจไม่มีอาการทางคลินิก ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกอาจแบ่งเป็น 2 ระยะตามพยาธิกำเนิด⁴⁻⁶ คือระยะแรก (leptospiemic phase) ตั้งแต่ 4-7 วันแรกของการดำเนินโรค ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อโดยเฉพาะกล้ามเนื้อหลัง น่องและต้นคอ อาจพบอาการคอแข็งและความดันโลหิตต่ำ นอกจากนี้อาจมีอาการตาแดง ในระยะนี้สามารถตรวจแยกเชื้อได้จากเลือดและน้ำไขสันหลัง ระยะที่สอง (immune phase) เป็นระยะที่ผู้ป่วยเริ่มสร้างภูมิคุ้มกัน คือเริ่มหลังจากมีอาการไข้ 1 สัปดาห์และมีช่วงไข้ลดลงประมาณ 1-2 วัน แล้วผู้ป่วยกลับมีไข้อีกครั้งหนึ่งทำให้มีไข้เป็นลักษณะ biphasic ในระยะนี้ผู้ป่วยมีอาการปวดศีรษะ อาการสับสน เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การทำงานของตับและไตผิดปกติ การตรวจหาเชื้ออาจพบได้ในเลือดและน้ำไขสันหลัง หลังจากนั้นเชื้อจะออกมากับปัสสาวะ 1-3 สัปดาห์

โรคเลปโตสไปโรซิส เป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดสไปโรจิตในจีนัสเลปโตสไปรา เชื้อมีขนาดเล็ก ยาว 6-20 ไมโครเมตร เส้นผ่า

ศูนย์กลาง 0.1 ไมโครเมตร³ เป็นเกลียว ปลายด้านหนึ่งโค้งงอเป็นตะขอ เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วโดยการหมุนรอบตัวเองหรือโค้งงอ เยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) มี 3-5 ชั้นเป็นเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ภายในเซลล์เป็น protoplasmic cylinder ซึ่งประกอบด้วยชั้น peptidoglycan และ cytoplasmic membrane ซึ่งห่อหุ้ม cytoplasm ของเซลล์ ด้านนอกของผนังเซลล์เป็น outer envelope ประกอบด้วย ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งคล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมลบ และมีความสำคัญในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันรวมทั้งการตรวจวินิจฉัยโรค⁴ เชื้อเจริญแบบต้องการออกซิเจน ในอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส สามารถสร้างเอนไซม์เคตาเลสและออกซิเดสได้^{1,5}

การแบ่งเชื้อเลปโตสไปรา สามารถแบ่งกลุ่มโดยอาศัยคุณสมบัติ 2 อย่างคือ แบ่งตามคุณสมบัติทางซีรัมวิทยา (base on serology) และแบ่งตามคุณสมบัติทางพันธุกรรม (base on DNA-DNA hybridization) การแบ่งตามคุณสมบัติทางซีรัมวิทยาสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 2 ชนิด คือ เชื้อไม่ก่อโรค (*Leptospira biflexa*) และในเชื้อกลุ่มนี้ถ้าแบ่งโดยอาศัยองค์ประกอบของแอนติเจนจะแบ่งได้เป็น 3 ซีโรกรุป ซึ่งมีมากกว่า 60 ซีโรวาร์ และชนิดที่สองคือ เชื้อก่อโรค (*Leptospira interrogans*) ในเชื้อชนิดนี้ยังแบ่งกลุ่มโดยอาศัยองค์ประกอบของแอนติเจนได้ถึง 23 ซีโรกรุป และมีมากกว่า 230 ซีโรวาร์^{1,2} ซีโรวาร์ที่พบในประเทศไทยดังแสดงในตารางที่ 1 ส่วนการแบ่งตามคุณสมบัติทางพันธุกรรม ในเชื้อที่ก่อโรคแบ่งได้เป็น 7 จีโนสปีชีส์ (genospecies) ได้แก่ *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. santarosai* และ *L. weilii* และที่ยังไม่มีชื่อสปีชีส์อีก 5 จีโนสปีชีส์ ได้แก่ *L. genospecies* 1,2,3,4 และ 5 ส่วนเชื้อที่ไม่ก่อโรคแบ่งได้ 5 จีโนสปีชีส์ ได้แก่ *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. wolbachii*, *Turneria parva* และ

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสมักมีอาการอย่างอ่อนจนถึงรุนแรงและเสียชีวิต ขึ้นอยู่กับซีโรวาร์และระยะเวลาที่เริ่มป่วยจนกระทั่งมาพบแพทย์ นอกจากนี้ อาการของโรคยังคล้ายคลึงกับอาการของโรคติดเชื้อชนิดอื่นอีกหลายโรค เช่น สกอร์ไทฟัส มาลาเรีย ไข้เลือดออก ตับอักเสบบี เมลลิออยโดซิส เป็นต้น⁶ ผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสที่ไม่มีอาการตัวเหลือง ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป การตรวจเพื่อทดสอบสมรรถภาพของตับ จะให้ค่าเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรส (aminotransferase) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และ บิลิรูบิน (bilirubin) เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ผลการตรวจปัสสาวะอาจพบโปรตีน เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดง และอาจพบ hyaline cast และ granular cast ในสัปดาห์แรกที่มีอาการป่วย หากผู้ป่วยมีอาการตัวเหลืองจะให้ผลการตรวจเอนไซม์ต่างๆ และค่าบิลิรูบินเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้หากอาการผู้ป่วยรุนแรงมาก จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น เกล็ดเลือดต่ำ และผลการตรวจสมรรถภาพของไตโดยการตรวจครีเอตินิน (creatinin) ซึ่งค่าจะสูงขึ้นตามระดับของภาวะ azotemia แต่การตรวจเพื่อยืนยันการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสจำเป็นต้องอาศัยการตรวจยืนยันจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้⁵

1. การตรวจหาเชื้อโดยตรงจากสิ่งส่งตรวจ

1.1 การตรวจหาเชื้อโดยตรง เป็นการตรวจหาเชื้อจากเลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบพื้นมืด (darkfield microscope) เนื่องจากเชือบางมากจึงไม่สามารถตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เชื้อจะมีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว การตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธีนี้ไม่ถือเป็นการยืนยันการวินิจฉัย⁸ เพราะจะตรวจพบเชื้อ 1 เซลล์ใน 1 พิวต์

ได้ต้องมีเชื้ออย่างน้อย 104 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในสิ่งส่งตรวจ⁹ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งส่งตรวจที่เป็นน้ำไขสันหลังยังจะมีโอกาสตรวจพบเชือน้อย¹⁰ นอกจากนี้ในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด ไฟบรินและโปรตีนอาจรบกวนการตรวจได้ทำให้อ่านผลยาก³

1.2 การย้อมสี (Staining) การใช้สีย้อมจะเพิ่มความไวได้มากกว่าการตรวจโดยตรงภายใต้กล้องพื้นมืด โดยเฉพาะการย้อมทางอิมมูโนจะช่วยให้แยกเชื้อได้ง่ายขึ้น ในกรณีที่เชื้อมีปริมาณน้อย อาจทำได้โดยย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อที่ติดฉลากกับสารเรืองแสง แล้วอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ซึ่งมีการนำเทคนิคนี้ไปตรวจในปัสสาวะของวัว¹¹ และตรวจหาเชื้อในน้ำและดิน¹² นอกจากนี้ยังใช้สีย้อมอิมมูโนเพอร์ออกซิเดสในการย้อมหาเชื้อในเลือดและปัสสาวะ¹³ ส่วนการย้อมหาเชื้อในชิ้นเนื้อต่างๆ สามารถย้อมด้วยสี Warthin-Starry silver stain ซึ่งเป็นสีย้อมที่ใช้กันมาก¹⁴ และสี immunogold silver staining (IGSS)¹⁵

1.3 การเพาะแยกเชื้อ (Cultural isolation) เป็นวิธีที่สามารถแสดงเชื้อที่เป็นสาเหตุโดยตรง (definite diagnosis) โดยทั่วไปถือว่าการเพาะแยกเชื้อเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการวินิจฉัยโรคทางจุลชีววิทยา แต่การเพาะแยกเชื้อเลปโตสไปราทำได้ยากกว่าแบคทีเรียทั่วไป เนื่องจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยาก ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน และอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาแพง ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยจึงใช้วิธี Microscopic Agglutination Test (MAT) เป็นวิธีมาตรฐาน^{16,17}

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อมีหลายชนิด ได้แก่

1. อาหารเลี้ยงเชื้อดั้งเดิม ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี rabbit serum เป็นส่วนประกอบร้อยละ 8-10 ได้แก่ Stuart, Korthof, Fletcher และ Vervoot medium⁹

2. EMJH (Ellinghausen and

ตารางที่ 1 เชื้อเลปโตสไปราที่เคยตรวจพบในประเทศไทย

ชนิดของเชื้อ (serovar)	คน	หมู	สุนัข	โค กระบือ	สุกร	แมว
<i>L.australis</i>	+	+	++	+		
<i>L.bangkok BD92</i>			+			
<i>L.ballico</i>	+					
<i>L.lora</i>		+				
<i>L.bataviae</i>	++	++	++	+		
<i>L.autumnalis</i>	++	++	+	++		
<i>L.akiyami A</i>		+				
<i>L.rachamati</i>	+					
<i>L.forbragg</i>		+				
<i>L.canicola</i>	++		++		++	
<i>L.grippotyphosa</i>	+	++	+			
<i>L.hebdomadis</i>	+	++	+	+		
<i>L.hyos(L.tarassovi)</i>		++	+	+		
<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	++	++	+			
<i>L.javanica</i>	++	++	++	+	++	+
<i>L.pomona</i>	+	+	+	++	++	
<i>L.pyrogenes</i>	++	++	+			
<i>L.sexkoebing</i>		+				
<i>L.wolffi</i>		+				
<i>L.malayi</i>		+				
<i>L.zazoni</i>		+				
<i>L.diatzi</i>		+				
<i>L.alexii</i>		+		+		
<i>L.sentot</i>		+				

+ ตรวจพบโดยวิธีซีโรโลยี

++ตรวจพบโดยวิธีซีโรโลยีและแยกเชื้อได้

(ที่มา: ดาริกา กิ่งเนตร ธรรมชาติของโรคเลปโตสไปโรซิส ใน: วิชัย โชควัฒน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540:10.)

MacCullough, 1965 และดัดแปลงโดย Johnson and Harris, 1967) มีส่วนผสมสำคัญ ได้แก่ ferric ion, thiamine, cyanocobalamine, copper, magnesium, bovine serum albumin ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีราคาแพงที่สุด และ Tween-80 ซึ่งเป็นแหล่งของกรดไขมัน¹⁸

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนหรือมีจำนวนน้อยใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อไวเดียมวัคซิน¹⁹

4. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 5-Fluoro-uracil หรือยาต้านจุลชีพอื่น ทำให้ใช้เพาะแยกเชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจที่ไม่ปลอดเชื้อได้ด้วย เช่น ปัสสาวะเป็นต้น²⁰ หรืออาจเติมวุ้นประมาณร้อยละ 0.1-0.2 จะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งการเจริญของเชื้อจะพบลักษณะเป็นวงสีขาวขุ่นภายใต้ผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เรียกว่า Dinger ring ซึ่งเชื้อจะเจริญในบริเวณที่มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม⁶ ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งลักษณะโคโลนีของเชื้อจะขึ้นกับปริมาณวุ้นและชนิดของซีโรวาร์²¹ เช่น ปริมาณวุ้นร้อยละ 0.5-1 โคโลนีจะมีการเจริญได้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณวุ้นร้อยละ 2 เชื้อจะเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ⁶ เป็นต้นประโยชน์ของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งคือสามารถใช้เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และใช้ทดสอบการสร้างฮิโมไลซินของเชื้อได้²¹

สิ่งส่งตรวจที่สามารถใช้ส่งเพาะเชื้อมีหลายชนิดดังนี้¹⁶

1. เลือดและน้ำไขสันหลัง ควรเก็บสิ่งส่งตรวจภายใน 7 วันหลังเริ่มแสดงอาการ โดยการหยดเลือดหรือน้ำไขสันหลังลงใน EMJH ชนิดกึ่งเหลว จำนวน 1, 2 และ 3 หยด ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ หากไม่สามารถเพาะเชื้อได้ทันทีควรเก็บจากหลอดเลือดดำโดยใช้เฮปาริน 10-20 ยูนิตสากล เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ปัสสาวะ ควรเก็บปัสสาวะช่วงกลาง

(midstream urine) หลังจากผู้ป่วยมีอาการ 1 สัปดาห์สามารถเพาะแยกเชื้อจากปัสสาวะได้นานถึง 30 วัน ก่อนการเก็บปัสสาวะอาจให้ผู้ป่วยดื่ม NaHCO_3 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ก่อนนอนและหลังตื่นนอน การตรวจโดยนำปัสสาวะมาเจือจางเป็น 10, 100, 1,000 เท่า เป็นอย่างน้อยด้วย PBS (phosphate buffer saline) pH 7.2-7.4 แล้วนำปัสสาวะที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาลงใน EMJH ที่เติม 5-Fluorouracil ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลชีพอื่น หากการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วมีการปนเปื้อน อาจนำไปกรองผ่านมิลลิพอร์ ฟิลเตอร์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่

3. ชิ้นเนื้อ ซึ่งอาจจะเป็นชิ้นเนื้อที่ได้จากการ biopsy หรือ autopsy ชิ้นเนื้อจะนำมาบดในสารละลาย PBS pH 7.2 หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว อัตราส่วน 1:10 แล้วจึงหยดน้ำส่วนใสที่ได้ 1-2 หยดลงในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อ 2 หลอด

4. แหล่งธรรมชาติ ได้แก่ น้ำ ดิน โคลน การตรวจทำโดยนำน้ำมากรองด้วยมิลลิพอร์ฟิลเตอร์ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เชื้อสามารถผ่านรูของตัวกรองได้ หากเป็นดินหรือโคลนจะถูกนำไปแช่ในน้ำที่ปลอดเชื้อแล้วนำไปปั่น นำน้ำส่วนบนไปกรองแล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะได้สารต้านจุลชีพเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลชีพอื่น หากเพาะเชื้อไม่ได้ทันทีให้เก็บน้ำไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเพาะเชื้อ^{6,22}

เชื้อเลปโตสไปราในสิ่งส่งตรวจมักมีปริมาณน้อยและเจริญช้าดังนั้นการเพาะเชื้อจะอยู่ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 2-3 เดือน¹⁶ หากเพาะเชื้อได้แล้วให้นำไปทดสอบว่าได้เชื้อบริสุทธิ์หรือไม่ โดยการนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง การวินิจฉัยว่าเป็นเชื้อก่อโรคหรือไม่ หากเป็นเชื้อไม่ก่อโรคจะเจริญได้ที่อุณหภูมิ 11-13

องศาเซลเซียส เจริญได้ใน 8 azoguanine หรือ 2,6-diaminopurine และสามารถสร้าง lipase ได้ ขณะที่เชื้อก่อโรคไม่มีคุณสมบัติดังกล่าว หลังจากนั้นนำไปทดสอบต่อว่าเป็นซีโรกรุ๊ปหรือซีโรวารใดกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะซึ่งมีมากมาย^{17,23}

1.4 การตรวจหาแอนติเจน การตรวจหาแอนติเจนจะให้ความไวและความจำเพาะมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมิด จากการศึกษาในการตรวจหาเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* พบว่าหากตรวจด้วยวิธี staphylococcal agglutination, countercurrent immunoelectrophoresis, ELISA และการตรวจโดยใช้วิธี RIA ให้ความไว 10^8 , 10^7 , 10^5 , 10^4 – 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ²⁴ และมีการใช้ chemiluminescent ในการตรวจหา *L. interrogans* serovars *hardjo* ในสารน้ำและเลือดให้ความไว 9×10^4 และ 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ²⁵ นอกจากนี้ยังพัฒนาวิธี Dot blot enzyme-linked immunoassay (dot-ELISA) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อที่ก่อโรคเคลือบบนแผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแอนติเจนในปัสสาวะ²⁶ และมีการพัฒนาวิธี magnetic antigen capture ร่วมกับ fluoroimmunoassay ใช้ตรวจหาเชื้อ *L. interrogans* serovar *hardjo* ในปัสสาวะของวัว ซึ่งให้ความไว 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร²⁷

1.5 การฉีดเข้าสัตว์ทดลองโดยตรง (Animal inoculation) วิธีการนี้ทำโดยใช้ตัวอย่างของผู้ป่วยฉีดเข้าหนูตะเภาหรือหนูแฮมสเตอร์ ต่อมาเมื่อสัตว์ป่วยจะดูดเอาน้ำจากช่องท้อง เลือด ตับ ไต ไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือนำไปย้อมสี วิธีนี้ยังสามารถนำไปตรวจหาเชื้อในแหล่งน้ำได้ด้วย¹

1.6 การตรวจโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular biology) เป็นการตรวจสารพันธุกรรมของเชื้อ โดยใช้เทคนิค dot-blotting²⁸ และ in situ hybridization²⁹ ซึ่งมีการเตรียม probe ที่จำเพาะกับซีโรวาร *lai* เพื่อวินิจฉัยซีโรวารที่ก่อ

โรค³⁰ นอกจากนี้ยังเตรียม probe สำหรับซีโรวาร *hardjobovis* ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อในปัสสาวะของวัว การติดฉลาก probe ด้วย ^{32}P จะสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อได้ 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร²⁸ แต่ความไวยังต่ำกว่าการตรวจวินิจฉัยโดยวิธี PCR (polymerase chain reaction)

PCR เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการหาดีเอ็นเอของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค โดยจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง สิ่งส่งตรวจที่มีผู้ศึกษานำมาตรวจโดยเทคนิคนี้ได้แก่ เลือด ปัสสาวะ น้ำไขสันหลัง และน้ำในลูกตา^{31–33} การตรวจโดยเทคนิค PCR มีการตรวจหาชิ้นส่วนของจีนในหลายตำแหน่ง โดยจะสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อจีนส่วน 16S หรือ 23S rRNA^{34,35}, repetitive element³⁶, IS 1533³⁷ และ genomic libraries³⁸ เป็นต้น

จากการศึกษาของ Merien และคณะ³⁹ ได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อส่วน 16S rRNA ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งสามารถตรวจหาเลปโตสไปราดีเอ็นเอได้ปริมาณ 1 พิโคกรัม และ 10 เฟมโตกรัม เมื่อตรวจหา PCR product โดย agarose gel electrophoresis และ DNA-DNA hybridization ตามลำดับ โดยสามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นจึงมีข้อจำกัดในการใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรค จากการศึกษานี้ของ Gravekamp และคณะ⁴⁰ ใช้ไพรเมอร์ G1/G2 เพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคแต่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อก่อโรคบางซีโรวารจึงทำให้ต้องใช้ไพรเมอร์ B64-I/B64-II อีกคู่ จึงสามารถตรวจหาเชื้อที่ก่อโรคได้ทุกซีโรวาร โดยสามารถตรวจเชื้อได้ 1–10 เซลล์/ปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร Kee และคณะ⁴¹ ออกแบบไพรเมอร์จาก highly conserved DNA ของเชื้อ *L. interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae serovar *lai* WH20 คือไพรเมอร์ LP1/LP2 ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราที่พบในประเทศเกาหลีและไม่พบที่ไพรเมอร์คู่นี้

สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่นและสามารถตรวจหาเชื้อในเลือดสัตว์ที่ติดเชื้อได้ 2 วัน ในขณะที่ยังตรวจไม่พบแอนติบอดี Savio และคณะ³⁶ สังเคราะห์ไพรเมอร์ 590-dir/590-rev จาก recombinant clone ของ genome *L. interrogans* serovar *hardjo* type hardjoprajitno ไพรเมอร์จะใช้เพิ่มขยายดีเอ็นเอส่วน fragment 'e' ซึ่งเป็นส่วน repetitive sequence แต่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้บางซีรัวร์

การตรวจโดยเทคนิค PCR มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจพบเชื้อได้จำนวน 10 ตัวหรือน้อยกว่า แต่เทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัด ได้แก่ ต้องใช้วัสดุและเครื่องมือพิเศษเสี่ยงต่อการปนเปื้อน ทำให้เทคนิคนี้มักถูกใช้ในงานวิจัยหรือห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมมากกว่า

2. การตรวจโดยอศัยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา

เนื่องจากการตรวจโดยตรง ด้วยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีข้อจำกัดคือ ความไวต่ำ ใช้เวลาในการตรวจวินิจฉัยนาน การตรวจวินิจฉัยโดยการตรวจหาแอนติบอดีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ได้ดี แต่การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาจะไม่สามารถวินิจฉัยโรคในระยะเริ่มต้นได้ โดยปกติแล้วแอนติบอดีจะเพิ่มขึ้นหลังแสดงอาการไปแล้ว 5-7 วัน และมีระดับสูงสุดภายใน 4 สัปดาห์ ดังนั้นการตรวจหาแอนติบอดีควรตรวจจากซีรัมคู่ (paired serum) ที่เก็บห่างกันอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อหา four-fold rising titer เทคนิคในการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยามีหลายเทคนิค อาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.1 การตรวจหาแอนติบอดีชนิด type specific antibody วิธีที่ใช้คือ Microscopic Agglutination Test (MAT) ปัจจุบันองค์การอนามัยโลกถือเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส วิธีนี้จะนำเชื้อเลปโตสไปรา ซีรัวร์ต่างๆ ที่พบบ่อยในประเทศไทย ในปัจจุบันใช้อยู่ประมาณ 24 ซีรัวร์ การอ่าน

ผลนั้นดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยกับเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ ภายใต้กล้องพื้นมืด¹⁶ การดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มจะใช้การวินิจฉัยว่าผู้ป่วยติดเชื้อซีรัวร์ใดนั้น จะอ่านผลที่ titer มากกว่าหรือเท่ากับ 1:400 ในการตรวจเพียงครั้งเดียว หรือพบว่าไตเตอร์เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 4 เท่าระหว่างการเจาะเลือดในระยะเฉียบพลันและระยะพักฟื้น การพบไตเตอร์ต่ำๆ เช่น 1:50 หรือ 1:100 ในการตรวจครั้งแรกและไม่พบว่าไตเตอร์เพิ่มขึ้นในระยะต่อมาจะบ่งบอกการติดเชื้อนานแล้ว แต่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคนานแล้ว (endemic area) ระดับแอนติบอดีจะอยู่ในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ดังนั้นควรดูจากแอนติบอดีที่เพิ่มจากเดิมมากกว่า 4 เท่า แต่หากตรวจพบผลบวกไตเตอร์ 1:800 หรือมากกว่าโดยผู้ป่วยมีอาการที่เข้ากับโรคเลปโตสไปโรซิสจะสนับสนุนการวินิจฉัยว่าเป็นการติดเชื้อในระยะเฉียบพลัน ข้อดีของวิธีนี้คือ มีความจำเพาะสูง สามารถรายงานซีรัวร์ของการติดเชื้อได้ด้วย ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในด้านการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ การพยากรณ์โรคและยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจในสัตว์อื่นๆ ได้อีกด้วย แต่ก็มีข้อจำกัดคือ ต้องใช้เชื้อเลปโตสไปราหลายซีรัวร์ และเชื้อที่มีชีวิตในการเตรียมแอนติเจน ทำให้สิ้นเปลืองกำลังคน เวลา ค่าใช้จ่ายและอาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติการ การอ่านผลต้องอาศัยความชำนาญและไม่สามารถตรวจคราวละมากๆ มีความไวต่ำประมาณ ร้อยละ 30 ในการตรวจวินิจฉัยโรคระยะเฉียบพลัน แต่มีความจำเพาะสูง ร้อยละ 97⁴² นอกจากนี้ยังมีการนำเอาเชื้อที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินมาเตรียมเป็นแอนติเจนในการตรวจด้วยวิธี MAT แต่พบว่าเมื่อนำไปทำการตรวจในผู้ป่วยพบว่าให้ไตเตอร์ที่ต่ำลงและเกิดปฏิกิริยาข้ามได้มากกว่า^{6,17} แต่ถึงอย่างไร หากห้องปฏิบัติการไม่มีผู้ชำนาญในการเลี้ยงเชื้อ การใช้เชื้อที่ถูกฆ่าด้วยฟอร์มาลินหรือการใช้เชื้อที่ถูกทำให้เป็นผงแห้งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจด้วยวิธี MAT

2.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อ genus

specific antigen ซึ่งมีวิธีการตรวจเพื่อคัดกรองว่าเป็นโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไม่ โดยเทคนิคที่ใช้มีหลายวิธีด้วยกัน ดังนี้

2.2.1 Complement fixation test (CF) แอนติเจนถูกเตรียมโดย *L. interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* และ *canicola* และ *L. biflexa* serovar *patoc* ซึ่งมีความไวต่ำ แต่ความจำเพาะสูง⁴³ วิธีนี้ได้นำไปใช้ตรวจวินิจฉัยในสัตว์ แต่เนื่องจากวิธีนี้ยังไม่ได้พัฒนาให้ได้มาตรฐานเดียวกัน จึงไม่ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

2.2.2 Macroscopic Agglutination Test (MSAT) แอนติเจนที่ใช้ในวิธีนี้ใช้เชื้อที่ฆ่าด้วยความร้อนหรือน้ำยาฟอर्मาลิน นำมาทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วย อ่านผลโดยการดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มด้วยตาเปล่า วิธีนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยแต่มีข้อจำกัดคือปฏิกิริยาไม่ค่อยจำเพาะและอ่านผลยาก เหมาะสำหรับใช้เป็นการตรวจกรอง (screening test) มีการศึกษาโดยการนำเชื้อจำนวน 12 ซีโรวาร์มาผสมกันและนำไปตรวจในคนและสัตว์⁴⁴ และมีการเตรียมแอนติเจนโดยใช้ซีโรวาร์ *patoc*⁴⁵ แต่มีรายงานว่า *patoc* slide test นี้ให้ความไวต่ำ⁴⁶ แต่ commercial *patoc* slide test ให้ความไวและความจำเพาะเท่ากับ ELISA IgM⁴⁷

2.2.3 Indirect Immunofluorescent Antibody (IFA) แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยทำปฏิกิริยากับเชื้อที่ถูกเคลือบบนกระจกสไลด์ และใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากกับสารเรืองแสง วิธีการนี้สามารถตรวจได้ทั้ง IgM และ IgG ใช้เชื้อที่ตายแล้วเตรียมเป็นแอนติเจน เนื่องจากใช้แอนติเจนที่จำเพาะต่อจีนัส (genus specific antigen) จึงไม่สามารถรายงานซีโรวาร์ที่ผู้ป่วยติดเชื้อ และเนื่องจากจำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง จึงอาจไม่เหมาะที่จะใช้ตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทั่วไป การตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิคนี้ได้พัฒนาในประเทศไทย⁴⁸ โดยใช้เชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *bataviae* ในการเตรียมแอนติเจนที่ไคเตอร์

1:100 ให้ความจำเพาะสูงและความไวระดับปานกลางเมื่อตรวจซีรัมของผู้ป่วยระยะเฉียบพลัน

2.2.4 Indirect Haemagglutination Test (IHA) แอนติเจนชนิดนี้จะถูกเคลือบบนเม็ดเลือดแดงของคนกรู๊ปโอและเลือดแกะ และทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย อ่านผลโดยดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม วิธีการนี้ให้ความไวและความจำเพาะอยู่ในระดับปานกลางและใช้ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM และ IgG ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากวิธีนี้พัฒนาโดย CDC ให้ความไวร้อยละ 92 และความจำเพาะร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี MAT⁴⁹

2.2.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) แอนติเจนอาจใช้เป็นลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ จะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีของผู้ป่วยและเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วจึงเติม substrate อ่านผลจากสีที่เกิดขึ้น ซึ่งอ่านเป็นค่า OD การแปลผลหากค่า OD สูงกว่าค่าจุดตัด (cutoff) ถือว่าผู้ป่วยเป็นโรค ซึ่งสามารถใช้หาแอนติบอดีชนิด IgG หรือ IgM ก็ได้ วิธีการนี้ให้ความไวและความจำเพาะสูง ตรวจตัวอย่างได้คราวละมากๆ แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษได้แก่ เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader) นอกจากนี้ยังไม่เหมาะในการตรวจตัวอย่างจำนวนน้อยๆ ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาวิธีนี้โดยใช้ *Leptospira interrogans* serovar *bataviae*, *pyrogenes* และ *icterohaemorrhagiae* เตรียมเป็นแอนติเจน ผลการศึกษาคือเมื่อใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar *bataviae* จะให้ความไวและความจำเพาะสูงสุด⁵⁰ นอกจากนี้ยังมีการนำ *Leptospira interrogans* serovar *patoc* มาเตรียมเป็นแอนติเจนในชุดน้ำยาทดสอบสำเร็จรูป (commercial test kit) ซึ่งให้ความไวและความจำเพาะสูงเช่นเดียวกัน⁴²

2.2.6 Dot blot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA) วิธีนี้จะเคลือบแอนติเจนบนแผ่นเมมเบรน แล้วตรวจหา

ตารางที่ 2 ข้อพิจารณาการเลือกใช้ชุดการทดสอบสำเร็จรูป

วิธีการทดสอบ	การนำไปใช้	ข้อดี	ข้อด้อย
MSAT	วินิจฉัยโรค	ง่าย สะดวก รวดเร็ว	อาจเกิดปฏิกิริยาไม่จำเพาะได้
MAT	วินิจฉัยโรค/วิจัย	ความจำเพาะสูง สามารถแยกชนิดแอนติเจนได้	ความไวต่ำ/วิธีการยุ่งยากซับซ้อน
IHA, LA	วินิจฉัยโรค	ง่าย สะดวก รวดเร็ว	ความไวและความจำเพาะปานกลาง
IgM ELISA	วินิจฉัยโรค/วิจัย	ความไว ความจำเพาะสูง ตรวจตัวอย่างได้คราวละหลายตัวอย่าง	ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษเสริม เช่น microplate reader และ microplate washer
Dipstick	วินิจฉัยโรค	ง่าย สะดวก รวดเร็ว ความจำเพาะสูง	ไม่เหมาะกับการตรวจตัวอย่างคราวละมากๆ ราคาต่อการทดสอบสูง

(ที่มา: พิมพ์ใจ นัยโกวิท, ดวงพร พูลสุขสมบัติ การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ ใน: วิชัย โชควัฒน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540:40.)

แอนติบอดีชนิด IgG, IgM หรือ IgA ก็ได้ ทำการศึกษาโดยใช้ *Leptospira interrogans* serovars *brasiliensis*, *canicola*, *cynopteri*, *hebdomadis* และ *icterohaemorrhagiae* เตรียมเป็นแอนติเจน พบว่าหากตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM, IgG และ IgA ในผู้ป่วยในระยะเฉียบพลัน ให้ความไวร้อยละ 98, 70 และ 76 ตามลำดับ⁵¹ และยังมีการนำเอา proteinase-K-resistance antigen (PK-Dot-ELISA) ตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM พบว่าให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 92.1 และ 97.5 ตามลำดับ⁵²

2.2.7 Lepto-Dipstick แอนติเจนของเชื้อเลปโตสไปรา จะถูกเคลือบบนแผ่น cellulose ร่วมกับ anti-human IgM dye conjugate ซึ่งจะทำให้ปฏิกิริยาในขณะที่เคลื่อนที่แบบโครมาโตกราฟฟี เกิดเป็นแถบสีขึ้นมา ซึ่งวิธีนี้ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 91.6 และ 93.6 ตามลำดับ เมื่อ

เทียบกับวิธีมาตรฐาน⁵³ วิธีการนี้ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะสูง แต่ไม่เหมาะกับการตรวจตัวอย่างคราวละมากๆ และราคาต่อการทดสอบสูง

2.2.8 Microcapsule Agglutination Test (MCAT) วิธีนี้เคลือบแอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อบน microcapsule particles ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ และนำไปทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย อ่านผลโดยการดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม วิธีนี้ให้ความไวมากกว่าวิธี MAT หรือ IgM ELISA ในซีรัมผู้ป่วย ที่เจาะในระยะเฉียบพลัน⁵⁴ แต่ไม่สามารถตรวจในผู้ป่วยที่ติดเชือบางซีโรวาร์ วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจได้ทั้งในคนและสัตว์

2.2.9 Latex Agglutination (LA) วิธีนี้จะเคลือบแอนติเจนของเชื้อกับเม็ด latex และเมื่อแอนติเจนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย อ่านผลโดยดูปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม ซึ่งวิธีนี้ให้

ความไวและความจำเพาะร้อยละ 82.3 และ 94.6 ตามลำดับ⁵⁵ วิธีการนี้ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ให้ ความไวและความจำเพาะปานกลาง

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทาง ห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปนั้น มีอยู่หลายวิธี ดังนั้น ควรเลือกใช้วิธีการตรวจคัดกรองที่เหมาะสมกับ ห้องปฏิบัติการนั้นๆ โดยพิจารณาถึงองค์ประกอบ หลายประการ เช่น วิธีการที่ใช้ตรวจ ข้อดีและข้อ จำกัด ความไว ความจำเพาะ ราคาต่อการทดสอบ เป็นต้น ปัจจุบันมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปมากมาย ใน แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสีย ดังสรุปในตารางที่ 2 ในการ ตรวจเพื่อการวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการต่างๆ ไป หากให้ผลบวกโดยการตรวจขั้นต้นแล้ว การตรวจ เพื่อยืนยันผลตรวจโดยวิธี MAT ไม่เหมาะนำมาใช้ เพราะเป็นวิธีที่ยุ่งยาก และมีความไวต่ำในระยะแรก ของโรคที่ผู้ป่วยมาพบแพทย์ จึงไม่ค่อยมีประโยชน์ หากจะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเพื่อดูแลรักษาผู้ ป่วยในโรงพยาบาล แต่อย่างไรก็ตามการตรวจโดยวิธี MAT สามารถใช้แยกชนิดของเชื้อที่ก่อโรคได้จึง มีประโยชน์อย่างมากในการติดตามสถานการณ์การ ระบาดหรือการหาแหล่งระบาดของโรค ดังนั้นเพื่อ ประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันโรค จึงต้องส่ง สิ่งส่งตรวจไปตรวจยืนยันผลการตรวจในหน่วยงาน ที่รับผิดชอบ คือกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หรือ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ต่อไป

บรรณานุกรม

1. ดาริกา กิ่งนคร. ธรรมชาติของโรคเลปโตสไปโรซิส. ใน: วิชัย โชควัฒน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการ โรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540:7-23.
2. สมบัติ แทนประเสริฐกุล. สถานการณ์และปัญหา โรคเลปโตสไปโรซิสในคน. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องมาตรฐานการ ตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส. 28-29 มิถุนายน 2544. กรุงเทพฯ.
3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira and Leptospirosis*. 2nd ed. Melbourne: Manash University Prin Service, 1999:1-172.
4. Far Rw. Leptospirosis. Clin Infect Dis 1995;21:1-8.
5. Faine S. Leptospira: Topley & Wilson's Microbiology and microbial infection. In: Collier L, Balow A, Sussman M, eds. Systematic bacteriology. 9th ed. New York: Oxford University Press, 1998:1287-303.
6. วรลักษณ์ ดังคณะกุล. อาการและอาการแสดง ของโรคเลปโตสไปโรซิส. ใน: วิชัย โชควัฒน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุม สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540:24-8.
7. Ellis WA. International Committee on Systemic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of Leptospira. Minutes of the meetings, 1 -2 July 1994, Prague Czech Replublic. Int J Syst Bacteriol 1995;45:872-4.
8. Edward GA, Domm BM. Human leptospirosis. Medicine 1960;39:117-56.
9. Turner LH. Leptospirosis III Maintenance, isolation and demonstration of leptospirosis. Tran R Soc Trop Med Hyg 1970;64:623-46.
10. Wolff FW, Bohlander HJ. Evaluation of Galton's macroscopic slide test for the serodiagnosis of leptospirosis in human serum samples. Ann Soc Belg Med Trop 1996;46:123-32.
11. Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G. Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* in bovine urine. Am J Vet

- Res 1989;50:1001-3.
12. Henry RA, Johnson RC, Bohlool BB, Schmidt EL. Detection of *Leptospira* in soil and water by immunofluorescence staining. *Appl Microbiol* 1971;21:953-6.
 13. Terpstra WJ, Jabboury-Postema J, Korver H. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. *Zentralbl Bakteriologie* 1983;254:534-9.
 14. Chappel RJ, Prime RW, Miller BD, Mead BD, Jones RT, Adler B. Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Vet Microbiol* 1992;30:151-63.
 15. Stimon AM. Note on an organism found in yellow fever tissue. *Public Health Rep* 1970;22:541.
 16. พิมพ์ใจ นัยโกวิท, ดวงพร พูลสุขสมบัติ. การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสทางห้องปฏิบัติการ ใน: วิชัย โชควัฒน, บรรณาธิการ. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540:32-42.
 17. Faine S. Leptospirosis: Topley & Wilson's Microbiology and microbial infection. In: Collier L, Balow A, Sussman M, eds. *Bacterial infection*. 9th ed. New York: Oxford University Press, 1998:849-69.
 18. Ellinghausen HC, McCullough WG. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine serum albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965;26:45-51.
 19. Bey RF, Johnson RC. Protein-free and low protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect Immun* 1978;19:562-9.
 20. Oie S, Koshiro A, Konishi H, Zoshii Z. In vitro evaluation of combined usage of fosfomycin and 5-fluorouracil for selection isolation of *Leptospira* species. *J Clin Microbiol* 1986;23:1084-7.
 21. Tripathy DN, Hanson LE, Jones FC. Growth of *Hebdomadis* group of leptospires in solid medium. *Am J Vet Res* 1980;41:1153-4.
 22. ดวงใจ สุวรรณเจริญ. โรคเลปโตสไปโรซิสในปศุสัตว์. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง มาตรฐานการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส. 28-29 มิถุนายน 2544. กรุงเทพฯ.
 23. Alexander AD. *Leptospira: Manual of clinical microbiology* In: Balow A, Hamsler WJ, eds. 5th ed. Washington: American Society for Microbiology 1991:554-9.
 24. Adler B, Chappel RJ, Faine S. The sensitivities of different immunoassays for detecting leptospiral antigen. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg* 1982;252:405-13.
 25. Palmer M, Hookey J. The chemiluminescence detection of leptospiral antigen. *Zentralbl Bakteriologie* 1992;277:300-8.
 26. Saengjaruk P, Chaicumpa W, Watt G, Bunyaraksyotin G, Wuthiekanun V, Tapchaisri P, et al. Diagnosis of human leptospirosis by monoclonal antibody-based antigen detection in urine. *J Clin Microbiol* 2002;40: 480-9.
 27. Yan KT, Ellis WA, Montgomery JM, Taylor MJ, Mackie DP, McDowell SW. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar

- hardjo* in cattle. Vet Microbiol 1999;69: 173-87.
28. Millar BD, Chappel RJ, Adler B. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridization. Vet Microbiol 1987;15:71-8.
 29. Terpstra WJ, Schoone GJ, Ligthart GS, Schegget J. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by in situ hybridization using biotin-labelled DNA probes. J Gen Microbiol 1987;133:911-4.
 30. da Silva MV, Batista L, Camargo ED, Leita PA, Szalkay VG, Rosenthal C, et al. Leptospirosis in patients with anti-HIV antibodies: report 2 cases. Rev Soc Bras Med Trop 1990;23:229-31.
 31. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. J Infect Dis 1995;172:281-5.
 32. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl FA, Edwards CN, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 1995;43:110-4.
 33. Merien F, Perolat P, Mancel E, Persan D, Baranton G. Detection of leptospiral DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. J Infect Dis 1993;168:1335-6.
 34. Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. FEMS Microbiol Lett 1992;90:267-74.
 35. Zhang YS, Li S, Dai B. Amplified 23 SrRNA gene of 52 strains of *leptospira* and detection of leptospiral DNA in 55 patients by PCR. Hua His I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao 1993;24:262-7.
 35. Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Clin Microbiol 1994;32:935-41.
 37. Zurner RL, Alt D, Bolin CA. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars. J Clin Microbiol 1995;33:3284-9.
 38. Gravekamp CH, Van de Kemp H, Carrington D, Van Eys GJ, Everard CO, Terpstra WJ. Detection of leptospiral DNA by PCR in serum from patients with copenhageni infection. In: Kobayashi Y ed. Leptospirosis: Proceedings of the Leptospirosis Research conference University of Tokyo Press, Tokyo Japan 1990:154-64.
 39. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol 1992;30:2219-24.
 40. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol 1993;139:1691-700.
 41. Kee S, Kim I, Choi M, Chang W. Detection of leptospiral DNA by PCR. J Clin Microbiol 1994;32:1035-9.
 42. Cumberland WE, Merry DJ, Pire ML, Devine PL. Evaluation of a commercial Enzyme linked immunoassay for detec

- tion of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J Clin Microbiol* 1997;35:1938-42.
43. Koury MC, Cisalpino EO, Rangel HA. The use of methanol extract of *Leptospira interrogans* in complement fixation test for leptospirosis. *Can J Microbiol* 1991;37: 455-8.
 44. Galton MM, Crouch WL, Powers DK, Hall AM, Coenell RG. A rapid microscopic slide screening test for the diagnosis of leptospirosis. *Am J Vet Res* 1958;19:505-12.
 45. Bragger JM, Alder B. A card test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Pathol* 1976;29:198-202.
 46. Marin L, Perez L, De Villar-Conde E, Dastin-Bendara C, Vargas-Romeo J, Pumarola S. Prospective evaluation of the macroagglutination slide test for *Leptospira*. *Serodiag Immunother Infec Dis* 1997;8:191-3.
 47. Brandao AP, Camargo ED, Da Silva ED, Silva MV, Abrao RV. Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3138-42.
 48. Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J. Evaluation of the immunofluorescence antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:340-3.
 49. Sulzer CR, Glosser JW, Rogers F, Jones WL, Frix M. Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1975;2:218-21.
 50. Petchclai B, Hiranras S, Kunakorn M, Potha U, Liemsuwan C. Enzyme-linked immunosorbent assay for leptospirosis immunoglobulin M specific antibody using surface antigen from a pathogenic *Leptospira*: a comparison with indirect hemagglutination and microagglutination test. *J. Med Assoc Thai* 1992;75:203-8.
 51. da Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Romero EC, et al. Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG and IgA antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1997;56:650-5.
 52. Riebeiro MA, Souza CC, Almeida SH. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. *J Trop Med Hyg* 1995;98:452-6.
 53. Hatta M, Smits HL, Gussenhoven GC, Gooskens J. 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* 2000;31:515-20.
 54. Arimitsu YE, Kmety Y, Ananyina Y, Baranton G, Ferguson IR, Smythe L, et al. Evaluation of the one point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *Bull WHO* 1994;72:395-9.
 55. Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Saraki DM, et al. Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1272-5.