

การตรวจวินิจฉัยและระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* sp. โดยตรงจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ

นภาพร ศรีเด่น ญัฐพล นุขุนทด ชลลดา มีทรัพย์ กาญจนา สอนงบุญ ดารารัตน์ แบ่งดี เดชา แบ่งใจ และ อาชวินทร์ ไรจนวิวัฒน์

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเลปโตสไปรา (*Leptospira*) ปัจจุบันการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการใช้การทดสอบทางซีโรโลยีด้วยวิธี IFA และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี IFA ร่วมกับวิธี Real-time PCR และระบุชนิดของแบคทีเรีย *Leptospira* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ การศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุทั้งสิ้น 2,110 ตัวอย่าง โดยพบการติดเชื้อ *Leptospira* จำนวน 33 ตัวอย่าง (1.56%) ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อถูกนำมาระบุชนิดโดยการศึกษายีน *16S rRNA* (*rrs2*) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่า มีเพียง 14 ตัวอย่างเท่านั้น ที่สามารถระบุชนิดได้ โดยตัวอย่างถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกับสายพันธุ์ก่อโรคหลัก จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. weilii* จำนวน 8 ตัวอย่าง *L. interrogans* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. alexanderi* จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งแบคทีเรีย *L. weilii* และ *L. alexanderi* ไม่เคยมีการรายงานการตรวจพบและระบุชนิดจากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงในประเทศไทยมาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงสามารถอนุมานได้ว่า *L. weilii* และ *L. alexanderi* มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิดที่ระบาดในประเทศไทยนอกเหนือจาก *L. interrogans*

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส, การระบุชนิดเลปโตสไปรา, ไข้ไม่ทราบสาเหตุ, วิวัฒนาการชาติพันธุ์

Corresponding author E-mail: napaporn.sr@dmasc.mail.go.th

Received: 29 August 2024

Revised: 11 December 2024

Accepted: 27 December 2024

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรสิส (Leptospirosis) เป็นโรคในกลุ่มโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonotic disease) ที่มีอุบัติการณ์ของโรคทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยเขตร้อน⁽¹⁾ สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทยจากข้อมูลเฝ้าระวังโรคในระบบเฝ้าระวัง 506 โดยสำนักโรคเลปโตสไปโรสิสในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 3,688 ราย และปี พ.ศ. 2566 จำนวน 4,627 ราย โดยมีอัตราการตายคงที่ที่ 0.07 คนต่อแสนประชากร⁽²⁾ โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม พบอัตราป่วยสูงสุดในภาคกลาง รองลงมา คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ ตามลำดับ

โรคเลปโตสไปโรสิส เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* โดยแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในบริเวณไตของโฮสต์กักเก็บโรค (reservoir host) จำพวกสัตว์ฟันแทะ (rodent) เช่น กระจ่าง หนู โดยไม่ทำให้โฮสต์กักเก็บโรคแสดงอาการของโรค แต่แบคทีเรีย *Leptospira* จะถูกขับออกพร้อมปัสสาวะของโฮสต์ลงสู่สิ่งแวดล้อมส่งผลให้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น เช่น โค กระบือ สุนัข สุกร หรือแม้กระทั่งคนที่สัมผัสกับแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะที่มีเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* ติดเชื้อและเกิดโรคเลปโตสไปโรสิสได้⁽³⁾ โดยทั่วไปผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อรุนแรงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง ร่วมกับการมีประวัติสัมผัสกับน้ำหรือสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่แฉะ หรือสัมผัสโดยตรงกับสิ่งขับถ่ายของสัตว์ ในผู้ป่วยที่มีประวัติอาการไม่ชัดเจนแต่มีอาการไข้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 38.5°C เป็นเวลานานกว่า 1 สัปดาห์ รวมถึงการชักประวัติการเจ็บป่วยและตรวจร่างกายแล้วไม่สามารถอธิบายสาเหตุของไข้ได้ จะถูกจัดว่าเป็นโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ⁽⁴⁾ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ไม่ทราบสาเหตุอยู่ในช่วงสูง 20–40%⁽⁵⁾ ข้อมูลจากการเฝ้าระวังโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุนี้จึงสามารถถูกใช้เพื่อติดตามสถานการณ์โรคเลปโตสไปโรสิสได้ เนื่องจากโรคนี้นักมาพร้อมอาการไข้ที่ไม่ชัดเจนและอาจยังไม่ได้รับการวินิจฉัยจากแพทย์ในครั้งแรกที่มารับการรักษาในโรงพยาบาล

แบคทีเรีย *Leptospira* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Spirochete ที่มีจำนวนชนิด (species) มากกว่า 64 ชนิดทั่วโลก^(6,7) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (primary pathogenic strain, P1) กลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรง (pathogenic but low-virulent strain, P2) และกลุ่มสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (saprophytes, S)^(6,8) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในประเทศไทยจังหวัดน่าน พบแบคทีเรีย *L. interrogans* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิส อีกทั้งพบแบคทีเรีย *L. interrogans* และ *L. weilii* จากตัวอย่างปัสสาวะของสุนัข สุกร และแพะที่ไม่แสดงอาการของโรคเลปโตสไปโรสิส⁽⁹⁾ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก การศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Leptospira* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากที่จะช่วยเพิ่มเติมองค์ความรู้เกี่ยวกับโรคเลปโตสไปโรสิสในประเทศไทยให้ดียิ่งขึ้น

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสใช้เทคนิคทางซีโรโลยี ซึ่งเป็นเทคนิคการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการ (gold standard method) โดยวิธีที่ใช้ ได้แก่ วิธี Macroscopic Agglutination Test (MAT) และวิธี Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) ซึ่งวิธีเหล่านี้จำเป็นต้องรอระดับภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจสอบปริมาณแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Leptospira* รวมทั้งต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญในการอ่านและแปลผลจากความก้าวหน้าของเทคนิคทางอณูชีววิทยาในปัจจุบันทำให้การรายงานผู้ป่วยตามระบบเฝ้าระวังโรค (ระบบ ร. 506) ของกรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุขสามารถรายงานโดยใช้ผลการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* sp. ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อรายงานผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสได้⁽⁴⁾ การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการรายงานผลการติดเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่มักมาพร้อมกับอาการที่ไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

ด้วยวิธีมาตรฐานทางซีโรโลยีร่วมกับวิธีทางอณูชีววิทยา และศึกษาชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Leptospira* จากสิ่งส่งตรวจทางคลินิกโดยตรงของผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ เพื่อทำให้เกิดความรู้ ความเข้าใจ ในสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดนี้ที่จะเป็นประโยชน์ ต่องานด้านการแพทย์และการสาธารณสุขของประเทศไทย ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

สไลด์หลุมชนิด 21 หลุม (Epredia, Breda, Netherlands), เครื่องบ่มอุณหภูมิ 37°C (Memmert, Germany), กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Nikon, Japan), ตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C (Mitsubishi Electric, Thailand), เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิด real-time PCR รุ่น CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม รุ่น MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารละลาย phosphate buffer saline (Caisson, Utah, USA), สารละลาย conjugate working solution ชนิด anti-human-IgG-FITC และ ชนิด anti-human-IgM-FITC (Agilent, Glostrup, Denmark), ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Germany), น้ำยา 2X THUNDERBIRD™ Probe qPCR mix (TOYOBO, Japan), Nuclease-free water (Bio Basic, Ontario, Canada), น้ำยา 2X KOD One™ PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO, Japan), agarose (Bio Basic, Ontario, Canada) และ สารละลาย 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (Invitrogen, New York, USA)

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาต้องเข้าเกณฑ์คัดเข้าตาม นิยามของโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุของสำนักโรคบาติวิทยา

กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ ผู้ป่วยมี ไข้สูงมากกว่าหรือเท่ากับ 38.5°C เป็นเวลานานกว่า 1 สัปดาห์ รวมถึงซักประวัติการเจ็บป่วยและตรวจร่างกาย แล้วไม่สามารถอธิบายสาเหตุของไข้ได้ โดยคัดเลือก สิ่งส่งตรวจชนิดเลือด EDTA-blood และซีรัมที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ ในปี พ.ศ. 2566-2567 (สิ้นสุด ณ วันที่ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2567) สิ่งส่งตรวจมีปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร คัดเลือกตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์จากศูนย์ วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 1/1 เชียงราย ศูนย์วิทยาศาสตร์ การแพทย์ที่ 5 สมุทรสงคราม ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ 8 อุดรธานี ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 9 นครราชสีมา และศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 11 สุราษฎร์ธานี จากนั้น ส่งที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ควบคุมให้มีอุณหภูมิ 4°C ตลอดระยะเวลา ขนส่ง

การคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่าง

ค่าอุบัติการณ์โรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ ไม่ทราบสาเหตุ จากการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย พบว่ามีผู้ป่วยยืนยันโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ ไม่ทราบสาเหตุอยู่ในช่วงร้อยละ 20-40⁽⁵⁾ การคำนวณ ขนาดกลุ่มตัวอย่างจึงเลือกค่าอุบัติการณ์ที่ร้อยละ 20 ซึ่งเป็นร้อยละของการตรวจพบเชื้อที่น้อยที่สุด เพื่อคำนวณ ขนาดตัวอย่างและให้ครอบคลุมการเก็บตัวอย่างได้ มากที่สุด โดยคำนวณจากสูตรค่าประมาณสัดส่วน⁽¹⁰⁾

$$n = \frac{p(1-p)z^2}{d^2}$$

กำหนดให้ n คือ จำนวนกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการ

p คือ ค่าอุบัติการณ์การเกิดโรคเลปโต- สไปโรสิสในผู้ป่วยไข้ไม่ทราบสาเหตุ

d คือ ค่าสัดส่วนของความคลาดเคลื่อน ที่ยอมให้เกิดขึ้นได้

z คือ ค่าความเชื่อมั่นที่ระดับนัยสำคัญ ทางสถิติ 0.05

แทนค่า ค่า p = 0.2

ค่า d ควรมีค่าไม่เกิน 20% ของค่า p ดังนั้น

$$\text{ค่า } d = 0.2 \times 0.2 = 0.04$$

$$\text{ค่า } z = 1.96$$

$$n = \frac{0.2(1-0.2) 1.96^2}{0.04^2}$$

$$n = 384.2$$

ดังนั้นการศึกษานี้ใช้ตัวอย่างอย่างน้อย 385 ตัวอย่างต่อไป

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยวิธี Indirect Immunofluorescence Assay (IFA)

ตรวจวินิจฉัยแอนติบอดีในสิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมด้วยวิธี IFA โดยเจือจางสิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมให้มีความเข้มข้น 1:50 ถึง 1:3,200 ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline หยดซีรัมที่เจือจาง ปริมาตร 7 μ L ลงบนแต่ละหลุมของสไลด์ที่มีแอนติเจนของเชื้อ *L. interrogans* บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline แล้วผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็น เมื่อสไลด์แห้งจึงหยดสารละลาย Conjugate ของ Anti-human-IgG-FITC และ Anti-human-IgM-FITC ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 1:40 ลงบนแต่ละหลุมของสไลด์ สไลด์ละ 7 μ L โดยแยกกระหว่างสไลด์ IgG และ IgM นำสไลด์บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer Saline และผึ่งสไลด์ให้แห้งด้วยลมเย็นอีกครั้ง จากนั้นนำสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกและผลลบต่อเชื้อ *L. interrogans* เป็น positive และ negative control ตามลำดับ แปลผลพบการติดเชื่อเมื่อพบการเรืองแสงมากกว่า +2 โดยมีค่าไคเตอร์ของแอนติบอดี IgM มากกว่าหรือเท่ากับ 1:100

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป DNeasy Blood & Tissue Kits จากสิ่งส่งตรวจชนิด EDTA-blood ปริมาตร 200 μ L ทำการสกัดตามวิธีการในคู่มือของชุดน้ำยา โดยได้สารสกัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 50 μ L เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยวิธี Real-time PCR

การตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อ *Leptospira* ด้วยวิธี Real-time PCR ใช้ไพรเมอร์และโพรบที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *LipL32* ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 μ L ประกอบด้วย 2X THUNDERBIRD™ Probe qPCR mix ปริมาตร 10 μ L ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse primer) ความเข้มข้น 0.4 μ M โพรบความเข้มข้น 0.2 μ M และสารสกัดดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากสิ่งส่งตรวจปริมาตร 2 μ L โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *L. interrogans* Australis และ *L. santarosai* Shermani เป็น positive control และใช้ Nuclease-free water เป็น negative control ในทุกครั้งของการทำปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น CFX96 C1000 Touch Thermal Cycler โดยมีอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้แก่ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วย 40 รอบ ของอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที และอุณหภูมิ 58°C เป็นเวลา 30 วินาที ตั้งค่าให้เครื่องอ่านค่าความเข้มแสงจากโมเลกุลของ 6-carboxy-fluorescein (FAM) เมื่อครบแต่ละรอบหลังจากอุณหภูมิ 58°C แปลผลพบการติดเชื่อเมื่อค่า Ct Cycle น้อยกว่า 37 รอบ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนกชนิดของเชื้อ *Leptospira*

ตัวอย่างที่พบการติดเชื่อถูกจำแนกชนิดของเชื้อ *Leptospira* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 μ L ประกอบด้วย 2X KOD One™ PCR Master Mix-Blue-ปริมาตร 12.5 μ L ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด และไพรเมอร์รีเวิร์สความเข้มข้น 0.3 μ M และดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างที่พบการติดเชื่อ ปริมาตร 2 μ L โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *L. interrogans* Australis และ *L. santarosai* Shermani เป็น positive control และใช้ Nuclease-free water เป็น negative control

จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยมีอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ต่อด้วย 40 รอบ ของ อุณหภูมิ 98°C เป็นเวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 50°C เป็น เวลา 5 วินาที และอุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้น นำ PCR amplicon ที่ได้ตรวจสอบขนาดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose ในสารละลาย 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และส่ง PCR amplicon ไปที่บริษัท Bio Basic Inc. (Ontario, Canada) เพื่อดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค sanger sequencing

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

วิเคราะห์และประมวลผลข้อมูลโดยใช้ RStatistical Program version 4.3.3 (<https://www.r-project.org>) แบ่งรูปแบบการวิเคราะห์เป็นสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวน ร้อยละ และวิเคราะห์ปัจจัยที่สัมพันธ์กับผลการตรวจวินิจฉัยโดยใช้สถิติ Pearson's Chi-squared test โดยใช้ Yates' continuity correction กำหนดนัยสำคัญทางสถิติด้วย p -value < 0.05

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องมือชีวสารสนเทศ

นำข้อมูล 16S rRNA sequencing ของยีน *rrs2* อยู่ในรูปของไฟล์นามสกุล .ab1 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Geneious Prime version 2024.0.5 (Biomatter, New Zealand) ควบคุมคุณภาพโดยตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพต่ำช่วงต้นและช่วงปลายจากแต่ละตัวอย่างออก จากนั้นสร้างเมทริกซ์ DNA substitution ด้วยกระบวนการ multiple sequence alignment เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล ภายใต้โมเดลทางวิวัฒนาการ (Evolutionary Model) ด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม IQTree⁽¹¹⁾ กำหนดให้การคำนวณความน่าจะเป็นของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงสถานะของลักษณะที่ปรากฏ ภายใต้การใช้โมเดลวิวัฒนาการแบบ Generalized Time-Reversible (GTR) แผนภาพ Phylogenetic Tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ที่มีความน่าจะเป็นสูงที่สุดจัดเป็นแผนภาพที่ดีที่สุด จากนั้นใช้กระบวนการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Bootstrap Analysis จำนวน 1,000 ซ้ำ ในการทดสอบความเชื่อมั่นของ Clade โดย Clade ที่จับกลุ่มได้แข็งแรงควรมีค่าสถิติ Bootstrap มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 70 แผนภาพ Phylogenetic Tree สามารถแสดงภาพโดยใช้โปรแกรม TreeViewer version 2.2.0 (<https://treeviewer.org>)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพเมอร์ (primer) และโพรบ (probe) ที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนการศึกษา

ยื่นเป้าหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' – 3')	ชนิด	อ้างอิง
การตรวจวินิจฉัย <i>LipL32</i>	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG	Forward primer	(12)
	GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT	Reverse primer	
	FAM-AAA GCC AGG ACA AGC GCC G-BHQ1	Probe	
การระบุสายพันธุ์ <i>rrs2</i>	CAT GCA AGT CAA GCG GAG TA	Forward primer	(13)
	AGT TGA GCC CGC AGT TTT C	Reverse primer	

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษานี้ผ่านการอนุมัติโดยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เมื่อวันที่ 30 เมษายน

พ.ศ. 2567 รหัสโครงการวิจัย 2/2567 รหัสเอกสารรับรอง DMSc-EC014

ผล

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิส

การตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุใช้สิ่งส่งตรวจ 2 ชนิด ได้แก่ สิ่งส่งตรวจชนิดซีรัมเพื่อตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และสิ่งส่งตรวจชนิด EDTA-Blood เพื่อวินิจฉัยด้วยวิธี Real-time PCR โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งโดยวิธีใดวิธีหนึ่งหรือทั้งสองวิธีจะถูกแปลผลพบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. และจัดเป็นผู้ป่วยยืนยัน (confirmed case) ตามนิยามและแนวทางการรายงานโรคติดต่ออันตรายของสำนักกระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข⁽⁴⁾ จำนวนสิ่งส่งตรวจจากกลุ่มตัวอย่างโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุในระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2565 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2567 จำนวน 2,110 ตัวอย่าง พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. จากการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และ/หรือ วิธี Real-time PCR จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยมีตัวอย่าง จำนวน 18 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA จำนวน 17 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR และจำนวน 2 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยทั้งสองวิธี จากการ

วิเคราะห์พบว่าผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเพศชาย (ร้อยละ 2.1) ซึ่งมีความแตกต่างจากเพศหญิง (ร้อยละ 0.9) อย่างมีนัยสำคัญ (Chi-square test, p -value < 0.05) โดยผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุพบอาการปวดกล้ามเนื้อมากที่สุด ร้อยละ 3.3 รองลงมาคือ ผู้ป่วยมีไข้สูงมากกว่า 38°C และปวดศีรษะรุนแรง ร้อยละ 2.9 เท่ากัน โดยการพบอาการดังกล่าวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับอาการดังกล่าวในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ไม่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. (Chi-square test, p -value < 0.05) นอกจากนี้พบผู้ป่วยจากพื้นที่ 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดน่าน (20 ราย) จังหวัดเชียงราย (10 ราย) จังหวัดกาญจนบุรี (2 ราย) และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (1 ราย) โดยจำนวนผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจากจังหวัดน่านและจังหวัดเชียงรายมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุจากจังหวัดกาญจนบุรีและประจวบคีรีขันธ์ (Chi-square test, p -value < 0.05) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางประชากร (Demographic Characteristics) ของกลุ่มตัวอย่างโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุที่ได้รับการยืนยันพบการติดเชื้อ *Leptospira* sp.

	N (%)	จำนวนตัวอย่างพบการติดเชื้อ <i>Leptospira</i> sp. (%)	Chi-square test	p -value
จำนวนตัวอย่างผู้ป่วยโรคไข้ไม่ทราบสาเหตุ	2,110 (100)	33 (1.56)	-	-
เพศ				
ชาย	1,209 (57.3)	25 (2.1)	3.9	< 0.05
หญิง	901 (42.7)	8 (0.9)	-	-
ลักษณะทางคลินิก				
ไข้สูง > 38°C	546 (25.9)	16 (2.9)	7.78	< 0.05
ปวดกล้ามเนื้อ	419 (19.9)	14 (3.3)	9.34	< 0.05
ปวดศีรษะรุนแรง	380 (18.0)	11 (2.9)	4.33	< 0.05
ไอ	488 (23.1)	11 (2.3)	1.42	0.23
พื้นที่				
จ.น่าน	879 (41.7)	20 (2.3)	4.19	< 0.05
จ.เชียงราย	282 (13.4)	10 (3.5)	15.54	< 0.05
จ.กาญจนบุรี	50 (2.4)	2 (4.0)	0.69	0.41
จ.ประจวบคีรีขันธ์	15 (0.2)	1 (6.7)	0.31	0.58

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2*

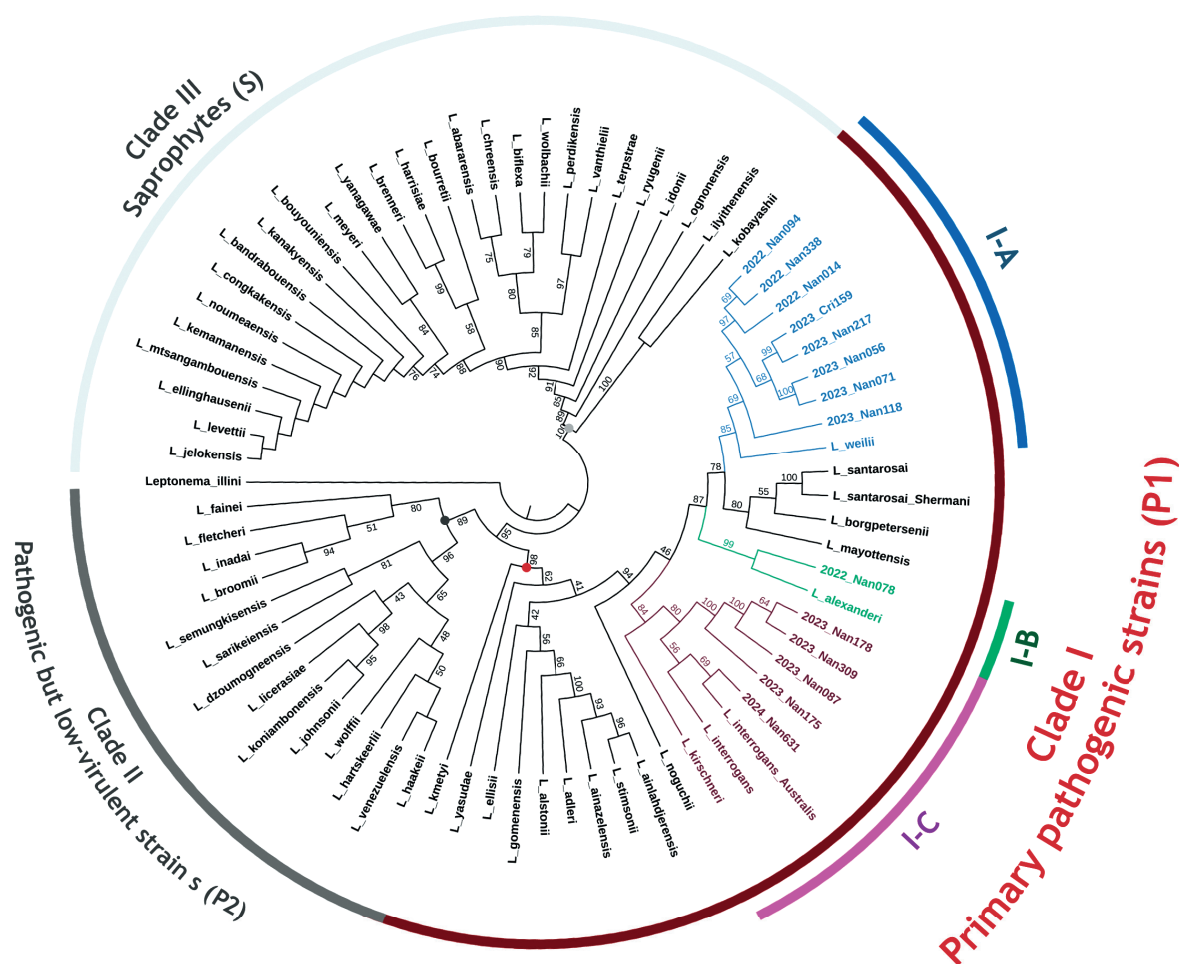
ตัวอย่างที่พบการติดเชื้อทั้งหมดนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S Ribosomal RNA เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียจีส *Leptospira*⁽¹³⁾ โดยมี 14 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ได้ ผลการวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยวิธี Maximum Likelihood จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ในแบคทีเรียจีส *Leptospira* จากสายพันธุ์อ้างอิงทั้งหมดที่ได้รับการตีพิมพ์บนฐานข้อมูล NCBI⁽⁶⁾ วิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ 14 ตัวอย่าง พบการจัดกลุ่มแบคทีเรียจีส *Leptospira* เป็น 3 Clade หลัก ได้แก่ Clade I มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่น (Bootstrap Support, BS) เท่ากับ 98% ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (primary pathogenic strain, P1), Clade II (BS = 95%) ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคไม่รุนแรง (pathogenic but low-virulent strain, P2) และ Clade III (BS = 100%) ประกอบด้วย สมาชิกกลุ่มสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (saprophytes, S) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยพบว่าตัวอย่างทั้ง 14 ตัวอย่าง อยู่ใน Clade I ซึ่งเป็นกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรคหลักทั้งหมด เมื่อพิจารณาเฉพาะใน Clade I พบว่าประกอบด้วย Clade ย่อย (sub-clade) ที่มีตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้เป็นสมาชิกอยู่ใน 3 sub-clade ดังนี้

sub-clade I-A (BS = 85%) ประกอบด้วย สมาชิกตัวอย่างในปี พ.ศ. 2565 จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ หมายเลข 2022_Nan014, 2022_Nan094 และ 2022_Nan338 และตัวอย่างในปี พ.ศ. 2566 จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ หมายเลข 2023_Nan056, 2023_Nan071, 2023_Nan118, 2023_Cri159 และ 2023_Nan217

โดยพบว่าตัวอย่างในปี พ.ศ. 2565 ทั้ง 3 ตัวอย่าง อยู่ใน sub-clade ย่อยเดียวกัน ซึ่งมีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงถึง 97% แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของเวลาต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย นอกจากนี้ ตัวอย่างที่พบใน sub-clade I-A มาจากพื้นที่จังหวัดน่าน ยกเว้นตัวอย่างหมายเลข 2023_Cri159 เท่านั้น ที่มาจากพื้นที่จังหวัดเชียงราย sub-clade I-A มีสปีชีส์ *L. weilii* แสดงความสัมพันธ์แบบ basal taxa แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดใน sub-clade I-A นี้ มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. weilii* มากที่สุด

sub-clade I-B (BS = 99%) ประกอบด้วย สมาชิกสปีชีส์ *L. alexanderi* เป็น basal taxa และตัวอย่างหมายเลข 2022_Nan078 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างนี้มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. alexanderi* มากที่สุด

sub-clade I-C (BS = 84%) ประกอบด้วย สมาชิกตัวอย่างจากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 5 ตัวอย่าง จากพื้นที่จังหวัดน่าน โดยมีสปีชีส์ *L. kirschneri* แสดงความสัมพันธ์แบบ basal taxa เมื่อพิจารณาใน sub-clade I-C พบว่ามี sub-clade ย่อย จำนวน 2 sub-clade ซึ่งมีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงถึง 80% ได้แก่ sub-clade ย่อย จากตัวอย่างปี พ.ศ. 2566 ทั้งหมด (ตัวอย่างหมายเลข 2023_Nan087, 2023_Nan175, 2023_Nan178 และ 2023_Nan309) และ sub-clade ย่อย ที่มีสมาชิกตัวอย่างจากปี พ.ศ. 2567 (หมายเลข 2024_Nan631) โดยมี *L. interrogans* เป็น basal taxa ของ sub-clade ย่อย ซึ่งสปีชีส์ *L. interrogans* จัดเป็นสายพันธุ์ก่อโรคหลักที่พบการระบาดในประเทศไทย⁽¹⁴⁾ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่พบนั้นมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับสายพันธุ์ก่อโรคหลักในประเทศไทยและมีปัจจัยด้านเวลาที่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียด้วยเช่นกัน



วิจารณ์

ปวดกล้ามเนื้อรุนแรงโดยเฉพาะกล้ามเนื้อน่อง ร่วมกับการมีประวัติสัมผัสกับน้ำหรือสิ่งแวดล้อมที่มีพื้นที่แฉะ⁽⁴⁾ จากการศึกษาพบว่าอาการของผู้ป่วยมีความสอดคล้องกันกับการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทยที่พบผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และมีอาการไข้สูงร่วมกับอาการปวดกล้ามเนื้อและอาการปวดศีรษะรุนแรง ซึ่งเป็นลักษณะทางคลินิกที่พบมากในผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิส⁽¹⁶⁻¹⁹⁾

ปัจจุบันวิธีมาตรฐานในการตรวจวินิจฉัยโรค
เลปโตสไปโรสิสใช้วิธีการทางซีโรโลยี ได้แก่ วิธี Micro-
scopic Agglutination Test (MAT) และวิธี Indirect
Immunofluorescence Assay (IFA) ในการศึกษาครั้งนี้

คณะผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี IFA เนื่องจากห้องปฏิบัติการมีทรัพยากรสำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และผู้ร่วมวิจัยมีความชำนาญในการอ่านสไลด์ด้วยวิธีนี้ การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA มีข้อจำกัดเนื่องจากสไลด์ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนของ *L. interrogans* เท่านั้น ทำให้ไม่สามารถครอบคลุมไปยังสายพันธุ์ก่อโรคอื่น ๆ ที่อาจตรวจพบในตัวอย่างและเป็นข้อจำกัดอย่างมากของการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการทางซีโรโลยี⁽²⁰⁾ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี IFA และวิธี Real-time PCR พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากปัจจัยหลายประการ อาทิ ระยะเวลาในการเจาะเลือดหลังจากติดเชื้อ โดยปริมาณเชื้อจะเพิ่มสูงสุดในช่วง 2-7 วันแรก หลังจากได้รับเชื้อในระยะ Leptospiremia และระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สร้างแอนติบอดีเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ ในช่วงระยะเฉียบพลัน (acute phase) จึงสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี Real-time PCR แต่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี IFA⁽²¹⁾ แต่หากพ้นช่วงระยะเวลานี้ไปจะเกิดการสร้างแอนติบอดีเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อในระยะฟื้นตัวจากโรค (convalescent phase) ทำให้สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี IFA แต่ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR ได้ รวมทั้งการได้รับยาต้านจุลชีพ ซึ่งจะทำให้การติดเชื้อในกระแสเลือด ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี Real-time PCR เช่นเดียวกัน ดังนั้นการตรวจสอบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA และ Real-time PCR จึงควรใช้ร่วมกันเพื่อยืนยันการติดเชื้อของผู้ป่วยได้^(22,23) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ตัวอย่าง จำนวน 33 ตัวอย่าง ที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. ตามวิธีที่ใช้มีจำนวน 14 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* เนื่องจากตัวอย่างเหล่านี้เป็นตัวอย่างที่วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR หรือวินิจฉัยพบการติดเชื้อทั้งจากวิธี IFA และวิธี Real-time PCR แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเหล่านี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นตัวอย่างที่ถูกเก็บในช่วงระยะเฉียบพลัน ทำให้ยังคงมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ เช่น ตัวอย่างหมายเลข 2023_Nan087, 2023_Nan175,

2023_Nan178, 2023_Nan309 และ 2024_Nan631 ที่ถูกระบุว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. interrogans* ซึ่งตัวอย่างเหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อได้ด้วยวิธี IFA เนื่องจากวิธี IFA เป็นการตรวจสอบแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อในระยะฟื้นตัวจากโรค ซึ่งมีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียและสร้างแอนติบอดีแล้ว จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *rrs2* ในตัวอย่างที่วินิจฉัยพบการติดเชื้อเฉพาะจากวิธี IFA ได้

แบคทีเรีย *Leptospira* เป็นแบคทีเรียที่มีหลากหลายสายพันธุ์ โดยมีสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (P1) และสายพันธุ์ก่อโรคที่ไม่รุนแรง (P2) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคเลปโตสไปโรสิส แบคทีเรีย *Leptospira* ชนิดที่พบการระบาดในทุกภูมิภาคของโลก 3 อันดับแรก ได้แก่ *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* และ *L. kirschneri*⁽²⁴⁾ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* sp. มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสปีชีส์ *L. weilii* จำนวน 8 ตัวอย่าง (sub-clade I-A, ภาพที่ 1) ถึงแม้ว่า *L. weilii* จะไม่ใช่ species หลักที่พบการระบาด แต่ *L. weilii* ถูกจัดเป็นอีก species หนึ่งที่อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงเช่นกัน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศพบการระบุชนิด *L. weilii* ได้จากตัวอย่างน้ำอุปโภคบริโภคในหมู่บ้านในประเทศชิลี⁽²⁵⁾ และจากผู้ป่วยในประเทศออสเตรเลีย⁽²⁶⁾ สำหรับประเทศไทย พบการรายงาน *L. weilii* จากตัวอย่างน้ำและตัวอย่างปัสสาวะจากสุนัขที่ไม่แสดงอาการของโรคจากการศึกษาในพื้นที่จังหวัดน่าน⁽⁹⁾ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่าง จำนวน 7 ตัวอย่าง จาก 8 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. weilii* โดยมาจากพื้นที่จังหวัดน่านเช่นเดียวกัน และ 1 ตัวอย่าง มาจากพื้นที่จังหวัดเชียงราย แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ *L. weilii* จะเป็นหนึ่งใน species ที่พบการระบาดในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อนำไปสู่ข้อสรุปนี้สำหรับการศึกษาก่อนหน้าในประเทศไทย พบว่า *L. interrogans* เป็น species ก่อโรคหลักที่พบการระบาดในประเทศไทย⁽¹⁴⁾ โดยพบการระบุชนิดของเชื้อ *L. interrogans* จากการศึกษาด้วยวิธี multilocus

sequence typing จากสิ่งส่งตรวจชนิดเลือดจากผู้ป่วยในจังหวัดอุดรธานี⁽¹⁴⁾ และพบจากการศึกษาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs2* ด้วยวิธี PCR จากสิ่งส่งตรวจชนิดปัสสาวะของผู้ป่วยในพื้นที่จังหวัดน่าน⁽⁹⁾ จากการศึกษาครั้งนี้ พบตัวอย่าง จำนวน 5 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. interrogans* ดังแสดงใน sub-clade I-C (ภาพที่ 1) ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมาจากพื้นที่จังหวัดน่าน แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ *L. interrogans* จะยังคงถูกพบอยู่ในพื้นที่ดังกล่าว นอกจากนี้ *L. alexanderi* จัดเป็นอีกหนึ่งชนิดที่มีความรุนแรงในการก่อโรค เนื่องจาก *L. alexanderi* สามารถผลิต Di-acetylated nonulosonic acid ซึ่งเป็นหนึ่งใน virulent factor ของ Genus *Leptospira*⁽³⁾ *L. alexanderi* มีรายงานการค้นพบครั้งแรกที่ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1999⁽²⁷⁾ สำหรับประเทศไทยยังไม่พบการรายงานการพบสายพันธุ์นี้มาก่อน ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีตัวอย่าง จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *L. alexanderi* จึงควรเริ่มต้นศึกษาสายพันธุ์ *L. alexanderi* ในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

สรุป

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า อุบัติการณ์ของโรคเลปโตสไปโรสิสในผู้ป่วยโรคไขไม่ทราบสาเหตุมีค่าประมาณ 1.56% (33/2,110 ตัวอย่าง) โดยวินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA จำนวน 18 ตัวอย่าง วินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี Real-time PCR จำนวน 17 ตัวอย่าง และวินิจฉัยพบการติดเชื้อด้วยวิธี IFA และ Real-time PCR จำนวน 2 ตัวอย่าง จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rRNA จากตัวอย่างเพื่อระบุชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Leptospira* พบว่าตัวอย่างที่พบการติดเชื้อ *Leptospira* ถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสายพันธุ์ก่อโรคหลัก (P1) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *L. weillii*, *L. interrogans* และ *L. alexanderi* โดยในอนาคตการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้นร่วมกับการใช้การศึกษาคุณลักษณะทางจีโนม รวมทั้งการเก็บข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ครบถ้วน จะช่วยส่งเสริมให้การศึกษา species *Leptospira* ที่พบในประเทศไทยมีความครอบคลุมและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย DGHP-BAC-ZOONOSIS ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากศูนย์ควบคุมโรคติดต่อสหรัฐอเมริกา ผ่านศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายริกเกิดเซีย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ทั้ง 5 ศูนย์ (เชียงใหม่ อุดรธานี นครราชสีมา สมุทรสงคราม และสุราษฎร์ธานี) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ทุกท่านที่ร่วมกันติดต่อประสานการรับส่งตัวอย่าง ช่วยเหลือในขั้นตอนการวิจัย และการทำปฏิบัติการ รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Karpagam KB, Ganesh B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39(5): 835–46.
2. กรมควบคุมโรค. สรุปสถานการณ์ประจำปีโรคเลปโตสไปโรสิส 2567. [ออนไลน์]. 2567; [สืบค้น 23 ส.ค. 2567]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <http://doe.moph.go.th/surdata/disease.php?ds=43>
3. Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, Adler B, Amorim-Santos L, Berg DE, et al. What makes a bacterial species pathogenic?: Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(2): e0004403. (57 pages).
4. กองระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. นิยามโรคและแนวทางการรายงานโรคติดต่ออันตราย และโรคติดต่อที่ต้องเฝ้าระวังในประเทศไทย. นนทบุรี: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2563.
5. Tangkanakul W, Smits HL, Jatanasen S, Ashford DA. Leptospirosis: an emerging health problem in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36(2): 281–8.

6. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13(5): e0007270. (25 pages).
7. Kurilung A, Perreten V, Prapasarakul N. Comparative genomic analysis and a novel set of missense mutation of the *Leptospira weilii* serogroup mini from the urine of asymptomatic dogs in Thailand. Front Microbiol 2021; 12: 731937. (17 pages).
8. Amran F, Noor Halim NA, Muhammad AH, Mohd Khalid MKN, Dasiman NM, Shamsusah NA, et al. Application of multilocus sequence typing for the characterization of *Leptospira* strains in Malaysia. Trop Med Infect Dis 2023; 8(2): 69. (11 pages).
9. Kurilung A, Chanchaithong P, Lugsomya K, Niyomtham W, Wuthiekanun V, Prapasarakul N. 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 2017; 115: 146–54.
10. Cochran WG, Cox GM. Experimental designs. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University; 1948.
11. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Res 2016; 44(W1): W232–5.
12. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009; 64(3): 247–55.
13. Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(11): e1374. (8 pages).
14. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl Trop Dis 2007; 1(1): e56. (6 pages).
15. World Health Organization. Report of the second meeting of the leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva: World Health Organization; 2011.
16. มาลีตา วารีนิช. ลักษณะทางคลินิกและระบาดวิทยาของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในพื้นที่ประสบอุทกภัยภาคใต้ ตอนบน ปี 2560. ว วิชาการสาธารณสุข 2563; 29(4): 580–9.
17. วราลักษณ์ ตั้งคณะกุล. โรคเลปโตสไปโรสิสในนักระบาดวิทยาภาคสนาม. ว วิชาการสาธารณสุข 2557; 23(5): 954–62.
18. อลงกต สุพร. ปัจจัยที่สัมพันธ์กับผลการรักษาผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรสิสในโรงพยาบาลมุกดาหาร. ว โรงพยาบาลนครพนม 2567; 11(1): e268471. (17 หน้า).
19. อมรรัตน์ ชูตินันท์กุล, พัศุฒิ ชะกิจจานุกิจ, โรม บัวทอง. รายงานสอบสวนการระบาดโรคเลปโตสไปโรสิสหลังเกิดภาวะอุทกภัย มกราคม 2560 อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช. ว ควบคุมโรค 2562; 45(3): 317–29.
20. Levett PN. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clin Infect Dis. 2003; 36(4): 447–52.
21. Sykes JE, Reagan KL, Nally JE, Galloway RL, Haake DA. Role of diagnostics in epidemiology, management, surveillance, and control of leptospirosis. Pathogens 2022; 11(4): 395. (24 pages).
22. Philip N, Affendy NB, Masri SN, Yuhana MY, Than LTL, Sekawi Z, et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis. PLoS One. 2020; 15(9): e0239069. (9 pages).
23. Iwasaki H, Chagan-Yasutan H, Leano PS, Koizumi N, Nakajima C, Taurustiat D, et al.

- Combined antibody and DNA detection for early diagnosis of leptospirosis after a disaster. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 84(4): 287–91.
24. Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(4): e0007374. (23 pages).
25. Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C. Distribution and diversity of pathogenic *Leptospira* species in peri-domestic surface waters from South Central Chile. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(8): e0004895. (16 pages).
26. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Corney BG, Smythe LD. Epidemiology of *Leptospira weilli* serovar Topaz infections in Australia. *Commun Dis Intell Q Rep* 2007; 31(2): 216–22.
27. Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira genomospecies*. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49 Pt 2: 839–58.
-

Diagnosis and Identification of *Leptospira* sp. from Direct Clinical Specimens in Pyrexia of Unknown Origin Patients

Napaporn Sriden, Nattapon Nukhunthod, Chonlada Meesub, Kanjana Sanongboon, Dararat Bangdee, Decha Pangjai, and Archawin Rojanawiwat

National Institute of Health of Thailand, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Leptospirosis is a zoonotic disease caused by the bacterium *Leptospira*. Currently, laboratory diagnoses of *Leptospira* infection are performed using serological techniques, particularly the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA), and nucleic acid amplification techniques, such as Real-time PCR. This study aimed to diagnose *Leptospira* infections through both IFA and Real-time PCR and identify the *Leptospira* species using direct typing of the 16S rRNA (*rrs2*) gene from clinical specimens. A total of 2,110 samples from patients with pyrexia of unknown origin were included in this study. *Leptospira* infection was detected in 33 samples (1.56%). Among these, only 14 samples provided interpretable data from *rrs2* gene sequencing. Phylogenetic analysis revealed that 8 samples clustered with *L. weilii*, 5 with *L. interrogans*, and 1 with *L. alexanderi*. Notably, the identification of *L. weilii* and *L. alexanderi* from direct clinical specimens has not been previously reported in Thailand. This study suggests that *L. weilii* and *L. alexanderi* may be endemic *Leptospira* species in Thailand, in addition to *L. interrogans*.

Keywords: Leptospirosis diagnosis, *Leptospira* identification, Pyrexia of Unknown Origin, Phylogenetics