



การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ที่ก่อโรคในน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือปลักด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์

อินทิพร เพ็งรัตน์^{1,*} ประยุทธ์ แซ่ไคว² และธัญญาพร ไชยคุณ-มาร์คว³

¹นักศึกษาปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ชั้นปีที่ 2 ปีการศึกษา 2565

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร แขวงกระทุ่มราย เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตำบลแม่เหิยะ อำเภอเมืองเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

³คลินิกสูติศาสตร์ โภชนาวิทยา แอนโดรวิทยา และเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร แขวงกระทุ่มราย เขตหนองจอก กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: โรคเลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนูเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่สำคัญโดยเฉพาะกลุ่มอาชีพเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ กระบือปลักที่ติดเชื้อมักจะไม่แสดงอาการแต่สามารถส่งผลให้เกิดความไม่สมบูรณ์พันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ที่ก่อโรคในน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือปลักจำนวน 56 ตัว ที่มีจำหน่ายและเกษตรกรใช้อยู่ทั่วไปในพื้นที่ประเทศไทยด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction; PCR) นำตัวอย่างทั้งหมดมาสกัด DNA แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 7 กลุ่ม และตรวจด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) เดียว *LipL32* และ *16S rRNA* และ multiplex primer *Ph In* และ *Sa* ผลการศึกษาพบว่า ไม่พบเชื้อ *Leptospira* spp. ในตัวอย่างทั้ง 7 กลุ่ม อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีการผสมยาเพนิซิลลินและสเตอโรยในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งยาปฏิชีวนะนี้อาจจะยังมีประสิทธิภาพต่อเชื้อ *Leptospira* spp. ได้ หรือพ่อพันธุ์กระบือปลักมีสุขภาพดีไม่มีการติดเชื้อ *Leptospira* spp. ตั้งแต่ต้น

คำสำคัญ: *Leptospira* spp. กระบือปลัก น้ำเชื้อแช่แข็ง เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2566. 18(1): 9-18.

E-mail address: karpoo.inny@gmail.com

Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. in Swamp Buffalo Bulls Frozen Semen by Polymerase Chain Reaction Technique

Inthiporn Pheangrat^{1,#}, Prayout Sarkaou², and Thuchadaporn Chaikhun-Marcou³

¹The 2nd Year Master Degree Student of Animal Biotechnology Program in Academic Year 2022, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Kratumrai, Nongchok, Bangkok 10530, Thailand.

²Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Maehia, Mueangchiangmai, Chiangmai 50200, Thailand.

³Clinical Practice in Obstetrics, Gynecology, Andrology and Theriogenology, , Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Kratumrai, Nongchok, Bangkok 10530, Thailand

Abstract: Leptospirosis is an important zoonotic disease, especially for farmers and those involved in animal husbandry. Infected swamp buffaloes usually are asymptomatic but infertility issues may present themselves. This study was designed to detect pathogenic *Leptospira* spp. by polymerase chain reaction (PCR) technique in commercially available and widely used frozen semen samples from 56 swamp buffalo bulls in Thailand. DNA samples were extracted and grouped into seven experimental group samples (eight samples per test tube). Polymerase Chain Reaction assays were performed using single primer *LipL32* and 16S rRNA and multiplex primer Ph In and Sa. The results showed that *Leptospira* spp. was not detected in any of the seven experimental group samples. However, penicillin and streptomycin were added in the extenders of these frozen semen samples, which could have acted as antibiotics for *Leptospira* spp. or The buffalo bulls were healthy without *Leptospira* spp. Infection.

Keywords: *Leptospira* spp., Swamp buffalo, Frozen semen, Polymerase chain reaction

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2023 18(1): 9-18.

E-mail address: karmpoo.inny@gmail.com

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis) เกิดจากการติดเชื้อกลุ่ม genus *Leptospira* เป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คน (zoonosis) ที่พบได้ทั่วโลก และเป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขเนื่องจากอาการเริ่มแรกไม่ชัดเจนแต่หากปล่อยไว้สามารถเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ นอกจากนี้ยังเป็นปัญหาด้านเศรษฐกิจทางการปศุสัตว์ เนื่องจากเป็นเชื้อที่แพร่กระจายได้ง่ายผ่านการสัมผัสกับปัสสาวะของสัตว์ที่

ติดเชื้อหรือผ่านทาง การผสมพันธุ์ ทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง ทั้งลูก ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และผสมติดยาก สัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าสามารถเป็นแหล่งรังโรคที่ปล่อยเชื้อออกมาได้กับปัสสาวะได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์ฟันแทะ (rodent) เช่น หนู เนื่องจากโรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดเชื้อที่มีความซับซ้อนทั้งจากลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อ พาหะนำเชื้อ ร่วมกับธรรมชาติของการระบาดที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมและการประกอบ

อาชีพจึงทำให้การควบคุมป้องกันโรค ทำได้ยาก และมักมีอุบัติการณ์ของโรคเกิดเป็นระยะ (Uavechanichkul, 2008)

จากรายงานของกรมปศุสัตว์ในปีพุทธศักราช 2565 มีเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือในประเทศไทยจำนวน 309,001 ราย และมีกระบือจำนวน 1,741,141 ตัว (DLD, 2022) แสดงให้เห็นถึงความนิยมการเลี้ยงกระบือปลัก (*Bubalus bubalis carabanesis*) ในประเทศไทยที่มีมากกว่าในอดีต กระบือปลักพบได้ในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย เวียดนาม พม่า จีนตอนใต้ กัมพูชา และลาว เป็นต้น (Na-Chiangmai, 2002) ในปัจจุบันกระบือไม่ได้ถูกเลี้ยงเพื่อใช้แรงงานอย่างเช่นในอดีต มีการเลี้ยงกระบือหลากหลายรูปแบบมากขึ้นทั้งเลี้ยงเพื่อขายเนื้อเป็นอาหาร ผลิตน้ำนม และเพื่อการแข่งขัน เช่น ประเพณีวิ่งควาย หรือการประกวดกระบือสวยงาม เป็นต้น ทำให้เกษตรกรมีความต้องการในการเพิ่มจำนวนกระบือ เทคโนโลยีการผสมเทียมจึงได้ถูกนำมาใช้ร่วมกับน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามยังพบปัญหาการผสมติดยากหรือความไม่สมบูรณ์พันธุ์เกิดขึ้นในการเลี้ยงกระบือในประเทศไทยโดยการใช้เทคนิคการผสมเทียม (Chaikhun et al., 2010) ซึ่งสาเหตุสำคัญส่วนหนึ่งในหลายสาเหตุ นั่นคือคุณภาพน้ำเชื้อและสุขภาพทั้งในพ่อและแม่พันธุ์กระบือที่ปลอดจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ที่สำคัญ

ในประเทศไทยข้อมูลจากกรมควบคุมโรค พบผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิสเฉลี่ยปีละ 2,500 ราย เสียชีวิต 40 ราย อาชีพของผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นเกษตรกร (DDC, 2021) ผู้ป่วยจะติดได้จากการสัมผัสกับปัสสาวะของสัตว์ที่ติดเชื้อหรือ น้ำ ดิน อาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ โดยที่เชื้อจะผ่านเข้าสู่ร่างกายได้ทางบาดแผลและเยื่อเมือก เช่น ตา จมูก และปาก เป็นต้น หลังจากได้รับเชื้อผู้ป่วยอาจแสดงอาการที่ไม่จำเพาะเจาะจงได้แก่ มีไข้ ปวดหัว หนาวสั่น ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ตาแดง อาเจียน และตัวเหลือง

(jaundice) ซึ่งอาการอาจปรากฏภายใน 2 วัน จนถึง 4 สัปดาห์ หากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) ไตเสียหาย ตับวาย หายใจลำบาก และเสียชีวิตได้ (CDC, 2019)

กระบือที่ติดเชื้อส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ (subclinical) แต่มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *Leptospira* spp. ได้จากเลือด (Wongpanit et al., 2012; Suwancharoen et al., 2013; Chadsuthi et al., 2017) อวัยวะจากระบบปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ (Guedes et al., 2020) และปัสสาวะ (Suwancharoen et al., 2016; Chadsuthi et al., 2018) นอกจากนี้เชื้อ *Leptospira* spp. สามารถมีชีวิตอยู่ในอุณหภูมิเยือกแข็ง (freezing temperature) ที่ใช้ในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (cryopreservation) ได้ (Perumal et al., 2013; Givens, 2018; Philip et al., 2018; Loureiro and Lilenbaum, 2020) นอกจากการตรวจโรคและสุขภาพพ่อพันธุ์ประจำปีแล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์เพศเมียติดเชื้อจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่อาจมีเชื้อ *Leptospira* spp. ในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งจึงจำเป็นต้องใส่ยาปฏิชีวนะลงในสารละลายน้ำเชื้อ (extender) เช่น GTLS (gentamycin tylosin lincomycin และ spectinomycin) (Andrabi et al., 2016; Ansari et al., 2017) หรือ SP (streptomycin และ penicillin) (Andrabi et al., 2016) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือปลักซึ่งถือเป็นโรคติดต่อสำคัญทางระบบสืบพันธุ์ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ ดังนั้นการศึกษารังนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ *Leptospira* spp. ที่ก่อโรคในน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือปลักที่มีจำหน่ายและเกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบันด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction; PCR)

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือปลักที่มีจำหน่ายในประเทศไทย 56 ตัวอย่าง โดยเก็บรักษาในถังเก็บน้ำเชื้อที่มีไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สำหรับการเคลื่อนย้ายไปยังห้องปฏิบัติการ

การสกัด DNA

นำน้ำเชื้อแช่แข็งละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 – 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งใส่น้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายลงในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์ สกัด DNA ด้วยชุดสกัด QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN, เยอรมนี) ใช้ตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ buffer ATL 100 ไมโครลิตร proteinase K 10 ไมโครลิตร และ buffer AL 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่เครื่องอุ่นหลอดทดลองที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ใส่เอทานอล 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (15 - 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดสารทั้งหมดย้ายไปใส่ใน QIAamp MinElute column แล้วนำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่ เติม buffer AW1 500 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่ เติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เปลี่ยน collection tube เป็นอันใหม่อีกครั้ง จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เยื่อ silica (silica membrane) แห้ง ย้าย column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์อันใหม่แล้วเติม Buffer AE 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1

นาที นำส่วน column ที่จะได้ DNA อยู่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์

นำ 1 วัคซีน *Leptospira Canicola-Icterohaemorrhagiae* Bacterin (Boehringer Ingelheim, สหรัฐอเมริกา) มาสกัด DNA ด้วยวิธีเดียวกันเพื่อนำมาเป็นตัวควบคุมบวก

นำตัวอย่าง DNA ตัวอย่างละ 1 ไมโครลิตร มารวมกันได้ 7 หลอด หลอดละ 8 ตัวอย่าง DNA ดังที่แสดงในตารางที่ 1

ไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการตรวจสอบ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานการใช้และตรวจพบเชื้อ *Leptospira* spp. ดังที่แสดงในตารางที่ 2 ไพรเมอร์ *LipL32* สามารถตรวจหายีน *LipL32* ของเชื้อก่อโรค *Leptospira* spp. แต่ไพรเมอร์ 16S rRNA สามารถตรวจหาได้ทั้งเชื้อก่อโรค *Leptospira* spp. และเชื้อ *Leptospira* spp. ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคได้ (Vital-Brazil et al., 2010) ในส่วนของ multiplex primer Ph In และ Sa เป็น primer ที่ใช้ร่วมกันแล้วสามารถตรวจหาเชื้อก่อโรค ไม่ก่อโรค และเชื้อที่ยังไม่มีรายงานการก่อโรคได้ (Pui et al., 2015)

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่าง DNA ของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการสกัด DNA เพื่อไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR

DNA จากน้ำเชื้อ แช่แข็ง	ตัวอย่างสำหรับทดสอบ PCR
Buff 1 - 8	1
Buff 9 - 16	2
Buff 17 - 24	3
Buff 25 - 32	4
Buff 33 - 40	5
Buff 41 - 48	6
Buff 49 - 56	7

การทำ PCR

แบ่งเป็น 3 กลุ่มตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ใช้ไพรเมอร์ *LipL32* ตัวอย่างที่ใช้ไพรเมอร์ 16S rRNA และตัวอย่างที่ใช้ primer Ph In และ Sa

แต่ละปฏิกิริยาจะมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เตรียมใส่ในหลอด PCR สำหรับไพรเมอร์ *LipL32* และไพรเมอร์ 16S rRNA ใส่สำหรับทำ PCR 8.2 ไมโครลิตร Quick Taq™ HS DyeMix (Toyobo, ญี่ปุ่น) 1.0 ไมโครลิตร forward และ reverse primer เส้นละ 0.4 ไมโครลิตร และตัวอย่าง DNA ที่เตรียมไว้ 1 ไมโครลิตร แต่ในส่วนของ primer Ph In และ Sa จะใส่สำหรับทำ PCR 7.8 ไมโครลิตร Quick Taq™ HS DyeMix (Toyobo, ญี่ปุ่น) 1.0 ไมโครลิตร forward และ reverse primer ของแต่ละ primer เส้นละ 0.2 ไมโครลิตร และตัวอย่าง DNA ที่เตรียมไว้ 1 ไมโครลิตร

นำตัวอย่างใส่ในเครื่อง PCR แต่รอบของ PCR (PCR cycle) ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

แสดงผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) และอ่านผลด้วยเครื่อง UVP GelMax™ Imager (ANALYTİK, สหรัฐอเมริกา)

ผลการทดลอง

ตัวอย่างทั้งหมดไม่พบเชื้อ *Leptospira* spp. ดังแสดงในตารางที่ 3

วิจารณ์

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่สำคัญโรคหนึ่งในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ที่มีความเสี่ยงสูงในการสัมผัสกับสัตว์ป่วยที่ไม่แสดงอาการแต่สามารถแพร่เชื้อได้ กระจับปี่เป็นสัตว์ชนิดหนึ่งที่มักป่วยแบบไม่แสดงอาการและสามารถเป็นพาหะนำโรคได้ ในประเทศไทยเกษตรกรผู้เลี้ยงกระจับปี่มักปล่อยกระจับปี่ลงแหล่งน้ำ ทั้งแหล่งน้ำตามธรรมชาติและแหล่งน้ำภายในฟาร์ม นั่นเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กระจับปี่ติดเชื้อหรือสามารถแพร่เชื้อไปสู่ธรรมชาติได้ โรคเลปโตสไปโรซิสยังเป็นโรคที่สำคัญในกลุ่มสัตว์ปศุสัตว์เนื่องจากสามารถติดต่อไปยังระบบทางเดินปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ ส่งผลให้เกิดการผสม

ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

Primer	Sequence 5'-3'	PCR product (bp)
<i>LipL32</i> F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	474
<i>LipL32</i> R	GAAGTCCCATTTTCAGCGATT	
16S F	GAAGTGGACACGGTCCAT	430
16S R	GCCTCAGCGTCAGTTTTAGG	
Ph F	CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT	423
Ph R	CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT	
In F	GGCGGCGCGTCTTAAACATG	331
In R	TTCCCCCATTTGAGCAAGATT	
Sa F	AGAAATTTGTGCTAATACCGAATGT	240
Sa R	GGCGTCGCTGCTTCAGGCTTTTCG	



รูปที่ 1 ผลของเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือ ปลักด้วยไพรเมอร์ *LipL32* ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์



รูปที่ 2 ผลของเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือ ปลักด้วยไพรเมอร์ 16S rRNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์



รูปที่ 3 ผลของเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือ ปลักด้วย multiplex primer Ph In และ Sa ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

ติดยาก ผลผลิตลดลง และแห้ง เป็นต้น

มีการศึกษาที่ผ่านมาที่สามารถตรวจพบเชื้อ *Leptospira* spp. ในน้ำเชื้อสดจากโค (Masri *et al.*, 1997; Heinemann *et al.*, 1999; 2000; Maiolino

et al., 2021) ม้า (Hamond *et al.*, 2013) แพะและ แกะ (Lilenbaum *et al.*, 2008) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ แสดงให้เห็นว่า โรคเลปโตสไปโรซิสสามารถติดต่อได้ผ่านการสืบพันธุ์

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp.

ตัวอย่าง	Primer	LipL32	16S rRNA	Ph In และ Sa
1		N	N	N
2		N	N	N
3		N	N	N
4		N	N	N
5		N	N	N
6		N	N	N
7		N	N	N
Negative control		N	N	N
Positive control		P	P	P

ถึงแม้ว่าจะใช้วิธีการผสมเทียมแต่หากใช้น้ำเชื้อสดสัตว์เพศเมียก็มีโอกาสที่จะติดโรคได้

การทำน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับเทคนิคการผสมเทียมมีข้อดีคือสามารถเพิ่มจำนวนครั้งการผสมได้มากขึ้น เก็บได้นาน ลดความเครียดและความเสี่ยงในการติดโรคจากการเคลื่อนย้ายสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *Leptospira* spp. สามารถมีชีวิตอยู่ในอุณหภูมิเยือกแข็งที่ใช้ในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ (Perumal et al., 2013; Givens, 2018; Philip et al., 2018; Loureiro and Lilenbaum, 2020) ในกระบวนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งจึงจำเป็นที่จะต้องผสมยาปฏิชีวนะลงในสารละลายน้ำเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้

จากผลการศึกษานี้ไม่พบเชื้อ *Leptospira* spp. ตัวอย่างแต่พบ PCR product ในตัวควบคุมบวกสาเหตุหนึ่งนี้อาจส่งผลให้ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อเนื่องจากการใส่ยาปฏิชีวนะลงในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในประเทศไทยคือ SP ซึ่งยาเป็นยาที่สามารถจัดการกับเชื้อ *Leptospira* spp. ได้ (Philpott, 1993; Fraga et al., 2015) ดังนั้นจึงแนะนำ

ให้มีการผสมยาปฏิชีวนะอย่างน้อยหนึ่งชนิดลงในสารละลายน้ำเชื้อสำหรับการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (Mughal et al., 2017)

เชื้อ *Leptospira* spp. ที่ก่อโรคเลปโตสไปโรซิสมีหลากหลายสายพันธุ์และวินิจฉัยได้ยากเนื่องจากมีอาการที่ไม่จำเพาะ Gloriani และคณะ (2016) กล่าวว่า การตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าสัตว์ไม่มีการติดเชื้อจริง จึงแนะนำให้ใช้วิธีการอื่นเข้ามาตรวจร่วมด้วย เช่น microscopic agglutination test (MAT) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด อย่างไรก็ตามวิธีการนี้จำเป็นต้องตรวจด้วยตัวอย่างเลือด ซึ่งบ่งบอกถึงการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโรคที่สัตว์ได้สร้างขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแล้วเท่านั้น ผลการศึกษาของ Ganda และคณะ (2016) ทำการตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ในน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์โคด้วยวิธี PCR พบว่ามีการตรวจพบเชื้อเมื่อมีความเข้มข้นของ DNA ที่ $10^2 - 10^3$ แบคทีเรีย/มิลลิลิตร ขึ้นไปเท่านั้น

ในการศึกษารั้งต่อไปจะมีการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ DNA จากน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กระบือ ปลักในการตรวจตรวจหาเชื้อ *Leptospira* spp. ร่วมกับ

การใช้วิธีการทดสอบอื่นตรวจควบคุมไปด้วยเพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบและคัดกรองสัตว์ที่เป็นโรคได้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการผู้เลี้ยงพ่อพันธุ์กระบือ ปลักที่อนุเคราะห์น้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการทำวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร สำหรับห้องปฏิบัติการ และทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Andrabi, S. M., Khan, L. A. and Shahab, M. 2016. Isolation of bacteria in semen and evaluation of antibiotics in extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia*. 1-9.

Ansari, M., Rakha, B. and Akhter, S. 2017. Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017: 1-6.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Leptospirosis: Systematic review of the published literature. <https://www.cdc.gov/leptospirosis/index.html>. (Accessed 25 August 2022).

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 Neglected Tropical Diseases*. 10.1371: 1-18.

Chadsuthi, S., Chalvet-Monfray, K., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D. and Cappelle, J. 2018. A remotely sensed flooding indicator associated with cattle and buffalo leptospirosis cases in Thailand 2011–2013. *BMC Infectious Diseases*. 18(602): 1-9.

Chaikhun, T., Tharasanit, T., Rattanatep, J., De Rensis, F. and Techakumphu, M. 2010. Fertility of swamp buffalo after synchronization of ovulation by sequential GnRH and PGF administration (ovsynch) and fixed-timed artificial insemination. *Theriogenology*. 74: 1371-1376.

Department of Disease Control (DDC). 2021. Leptospirosis. Systematic review of the published literature. <https://ddc.moph.go.th/brc/news.php?news=26719&deptcode=brc>. (Accessed 25 August 2022).

Department of Livestock Development (DLD). 2022. Farmer/Livestock Information, Fiscal Year 2022. Systematic review of the published literature. <http://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/396-report-thailand-livestock/reportservey2565>. (Accessed 25 August 2022).

- Fraga, T. R., Carvalho, E., Isaac, L. and Barbosa, A. S. 2015. *Leptospira* and Leptospirosis. Animal and Ectoparasitic Source Infections. 1973-1990.
- Ganda, M. R., Souza, M. A., Lourencetti, M. P., Ciuffa, A. Z., Soares, P. M. and Lima, A. M. 2016. Molecular detection of *Leptospira* spp. in bull semen. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 167(11-12): 297-301.
- Givens, M. D. 2018. Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*. 12(S1): 165-171.
- Glorian, N. G., Villanue, S. Y. A. M., Yanagiha, Y. and Yoshid, S. 2016. Identification of Prevalent *Leptospira* Serovars Infecting Water Buffaloes, Cows, Dogs, Pigs and Rats in the Philippines. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 47(4): 766-773.
- Guedes, I. B., Souza, G. O., Paula Castro, J. F., Souza Filho, A. F., Cavalini, M. B., Taniwaki, S. A., Maia, A. L. P., Pereira, I. C. and Heinemann, M. B. (2020). Identification of Pathogenic *Leptospira* Species in the Urogenital Tract of Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) From the Amazon River Delta Region, Brazil. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(269), 1-7.
- Hamond, C., Martins, G., Medeiros, M. A. and Lilenbaum, W. 2013. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33:1157-1159.
- Heinemann, M. B., Garcia, J. F., Nunes, C. M., Gregori, F., Higa, Z. M., Vasconcellos, S. A. and Richtzenhain, L. J. 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology*, 73, 261-267.
- Lilenbaum, W., Varges, R., Brandao, F. Z., Cortez, A., de Souza, S. O., Brandao, P. E., Richtzenhain, L. J. and Vasconcellos, S. A. 2008. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology*. 69:837-842.
- Loureiro, A. P. and Lilenbaum, W. 2020. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology*. 141:41-47.
- Maiolino, S. R., Cortez, A., Langoni, H., Giuffrida, R., Santos, J. R., Júnior, G. D., Lara, G. H. B., Motta, R. G., Chacur, M. G. M., Monteiro, F. M., Heinemann, M. B., Filho, A. F. S., Martins, L. S. A., Bello, T. S. and Ribeiro, M. G. 2021. Sperm viability, serological, molecular, and modified seminal plasma agglutination tests in the diagnosis of *Leptospira* in the semen and serum of bovine bulls. *Brazilian Journal of Microbiology*. 1-8.
- Masri, S. A., Nguyen, P. T., Gale, S. P., Howard, C. J. and Jung, S. C. 1997. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen.

- Canadian Journal of Veterinary Research, 61, 15-20.
- Mughal, D. H., Ijaz, A., Yousaf, M. S., Wadood, F. and Farooq, U. 2017. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen- limitations and expectations. Buffalo Bulletin. 36(1): 1-14.
- Na-Chiangmai, A. 2002. Raising buffaloes. Department of Livestock Development. Bangkok. p. 1-9.
- Perumal, P., K., C. J., Srivastava, N., Vupru, K. and Srivastava, S. K. 2013. Infectious Causes of Infertility in Buffalo Bull (*Bubalus bubalis*). International Journal of Bio-resource and Stress Management. 4(1):084-090.
- Philip, N., Garba, B. and Neela, V. K. 2018. Long-term preservation of *Leptospira* spp.: challenges and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology. 102: 5427–5435.
- Philpott, M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. British Veterinary Journal. 149(4): 339-369.
- Pui, C. F., Bilung, L. M., Su'ut, L. and Apun, K. 2015. Prevalence of *Leptospira* Species in Environmental Soil and Water from National Parks in Sarawak, Malaysia. Borneo Journal of Resource Science and Technology, 5(1), 49-57.
- Suwancharoen, D., Chaisakdanugull, Y., Thanapongtharm, W. and Yoshida, S. 2013. Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand. Epidemiology and Infection. 141:2269-2277.
- Suwancharoen, D., Limlertvatee, S., Chetiyawan, P., Tongpan, P., Sangkaew, N., Sawaddee, Y., Inthakan, K. and Wiratsudakul, A. 2016. A nationwide survey of pathogenic leptospires in urine of cattle and buffaloes by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in Thailand, 2011–2013. The Journal of Veterinary Medical Science. 78(9):1495-1500.
- Uavechanichkul, R. 2008. Guidelines for Quality Control of Semen Quality for Artificial Insemination. Department of Livestock Development. Bangkok. p. 36-116.
- Vital-Brazil, J. M., Balassiano, I. T., Oliveira, F. S., Souza Costa, A., Hillen, L. and Pereira, M. M. 2010. Multiplex PCR-based detection of leptospira in environmental water samples obtained from a slum settlement. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105(3), 353-355.
- Wongpanit, K., Suwanacharoen, D. and Srikram, A. 2012. Serological Survey of Leptospirosis in Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) in Sakon Nakhon Province, Thailand. Kasetsart Journal (Natural Science). 46:736-741.

