

รหัสโครงการ PDF/34/2544

ชื่อโครงการ การนำยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide O-antigen มาพัฒนา
วิธีตรวจ serovar จำเพาะใน *Leptospira* spp

ชื่อนักวิจัย ดร. ธารีรัตน์ ทะลัมพะเทติ

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ม.มหิดล

E-mail Address: tmtkl@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: วันที่ 1 กรกฎาคม 2544 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2546

บทคัดย่อ

ในการวินิจฉัยโรค Leptospirosis ผู้วิจัยเลือกยีนส์จาก *rfb* locus ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ O-antigen ของ lipopolysaccharide ซึ่งคาดว่าจะ conserved ครอบคลุม *Leptospira* species ได้เป็นส่วนมาก ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือก primers ที่ออกแบบจาก *orf14* ทั้งนี้ primer คู่นี้ จะครอบคลุม *Leptospira* serovar ต่างๆ ยกเว้น *L. interrogans* serovar wolffi ผู้วิจัยยังนำระบบ nested PCR มาใช้เพื่อจะเพิ่มความไวในการตรวจ สำหรับปฏิกิริยา cross reactivity ที่เกิดกับ bacteria บาง species ได้แก้ปัญหานี้โดยเพิ่มอุณหภูมิ annealing ของ PCR รอบที่ 2 จาก 55°C เป็น 62°C ทั้งนี้จะป้องกัน non-specific product และไม่สามารถตรวจพบทั้งจาก gel electrophoresis และหลังจากกระบวนการ Southern hybridization โดยใช้ probe จาก nested primers คู่ใน จากการใช้ PCR test นี้กับ serum ผู้ป่วย Leptospirosis จะไม่สามารถเห็น PCR product อะไรเลยจาก agarose gel electrophoresis แต่จะเห็นได้หลังจากปฏิกิริยา Southern Hybridization เท่านั้น

สำหรับจุดมุ่งหมายในการใช้ยีนส์ *orf14* จำแนก *Leptospira* ออกเป็น serovar จำเพาะนั้นพบว่าไม่สามารถใช้ได้กับ serovar ส่วนมากที่เป็นสมาชิกของ *L. interrogans* อย่างไรก็ดีตามใน serovar hardjoprajitno และ serovar hardjobovis ซึ่ง *rfb* organization แตกต่างจาก *L. interrogans* จะมี *orf14* sequence ที่แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยนำส่วนที่แตกต่างกันมาใช้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับ serovar hardjo ได้แล้ว

คำหลัก : โรคเลปโตสไปโรซิส วินิจฉัยโรค PCR

Abstract

To develop the PCR diagnosis for Leptospirosis, the oligo primers are selected from the *rfb* locus that involved in biosynthesis of O-antigen. It is expected to have the primers that is conserved enough to cover most of the pathogenic *Leptospira*, but still possess the specificity. The oligo primers designed from *orf14* sequence gave the promising results as they could amplify most of the *Leptospira* DNA panel except *L. interrogans* serovar wolffi. The nested PCR process was used to increase sensitivity of the test. The cross reactivity is

still found with a few species of bacteria, however it could be prevented by increasing the annealing temperature of the second round nested-PCR from 55 °C to 62 °C. With this procedure none of the cross-reactivity product could be view by both gel electrophoresis and Southern hybridization, while the specific PCR-product from *Leptospira* remain.

In another aspect to use the variation within *orf14* sequence as the signature sequence to identify the Leptospiral serovar is the wrong hypothesis, since the recent *orf14* sequence of *L. interrogans* serovars from database revealed that they are quite conserved. However *orf14* sequence of serovar hardjoprajitno that belong to *L. interrogans* has a far distance - variation to other *L. interrogans* and the specific primers designed from this variation has already been obtained.

Keywords : Leptospirosis PCR diagnosis

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคที่กำลังมีการแพร่ระบาดในชนบทของประเทศไทยอันเป็นกลุ่มที่สัมผัสกับสัตว์ที่เป็นพาหะ เช่น หนู สุกร วัว ควาย การตรวจวินิจฉัยปัจจุบันใช้วิธีทาง serology ซึ่งคนไข้หลังจากเริ่มแสดงอาการแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ จึงจะตรวจพบ Antibody และมีระดับสูงสุดภายใน 4 สัปดาห์ นอกจากนี้เชื้อ *Leptospira* สามารถหลบเข้าไปอยู่ในไตและเพิ่มจำนวนมากขึ้น แล้วถูกขับออกมากับปัสสาวะ สัตว์ที่เป็นพาหะจะกำจัดเชื้อ *Leptospira* ออกมาเป็นครั้งคราวหรือเป็นประจำ เป็นเวลานานนับเดือน หรือเป็นปี หรือตลอดชีวิตของสัตว์นั้นๆ ในขณะที่คนจะมีสถานะการเป็นพาหะอยู่ไม่นานนัก

การยืนยันว่าติดเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเหมือนแบคทีเรียทั่วไปทำได้ยาก เพราะเชื้อ *Leptospira* เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อราคาแพง และ ใช้เวลา 7-10 วันจึงสังเกตเห็นการเติบโต การตรวจวินิจฉัยดังกล่าวจึงค่อนข้างช้ากว่าจะยืนยันได้ว่าติดเชื้อโรคเลปโตสไปโรซิส การนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการตรวจหา DNA ของเชื้อในกระแสเลือดและในปัสสาวะผู้ป่วย จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการวินิจฉัยโรคนี้ เทคนิค PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองมีการนำมาใช้กับโรคติดเชื้อต่างๆอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้ใดรายงานการนำเทคนิคนี้มาใช้กับผู้ป่วยในประเทศไทย การศึกษานี้มีจุดหมายเพื่อหา oligo primers ที่มีความจำเพาะต่อ *Leptospira* และปรับกระบวนการสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยเพื่อการนำไปใช้ได้จริง

Leptospira spp. เป็นแบคทีเรียที่มี Antigen ที่หลากหลาย และสามารถแบ่งตามวิธีทาง serology ได้ถึง 23 serogroups ถ้าเราสามารถบอกได้ว่าเชื้อ *Leptospira* ที่กำลังระบาดว่าอยู่ใน serogroup อะไร จะนำไปสู่การป้องกันโดยการผลิตวัคซีนต่อ serogroup ที่กำลังมีการระบาดอย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังนำไปสู่การตรวจหาแหล่งที่เป็นที่มาของโรค โดยนำปัสสาวะจากหนู วัว สุกร ที่เป็นพาหะนำโรคมารวบรวม ซึ่งถ้าเจอ serogroup ใดที่มีการระบาดในคน จะได้มีการวางแผนป้องกัน