

เอกสารอ้างอิง

1. Johnson RC, Walby J, Henry RA, Auran NE. Cultivation of parasitic leptospires: effect of pyruvate. *Appl Microbiology* 1973;26:118-119.
2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DM, Seldman JG, Smith JA, et al. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons; 1993.
3. Southern ME. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975;98(3):503-17.
4. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1992;30(9):2219-2224.
5. de la Pena-Moctezuma A, Bulach DM, Adler B. Genetic differences among the LPS biosynthetic loci of serovars of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2001;31:73-81.
6. Truccolo J, Serais O, Merien F, Perolat P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. *FEMS Microbiology Letters* 2001;204(2):317-321.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ขอเวลาเพิ่มเติมเพื่อนำระบบการวินิจฉัยโรคที่พัฒนาขึ้นนี้ไปทดสอบกับสิ่งส่งตรวจผู้ป่วย Leptospirosis จำนวนมากขึ้น เพื่อยืนยันความถูกต้องว่าใช้งานได้จริง ต่อจากนั้นจะเขียนเพื่อการตีพิมพ์ในวารสาร Molecular diagnosis หรือ Molecular and Cellular Probes ต่อไป

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ถ้าผลงานตีพิมพ์ได้รับการตอบรับจึงจะเปิดบริการที่ โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อนต่อไป

รูปที่ 1 Alignment of orf *Ict14* (upper line) and orf *Cop14* (lower line)
Identity=99.12%(1234/1245) Gap=0.00%(0/1245)

1 ATGAGCACTCACTTCTCATTAAAAAGTGCATCAGTTATAACAGATTATTTATTTAAATTT
1 ATGAGCACTCACTTCTCATTAAAAAGTGCATCAGTTATAACAGATTATTTATTTAAATTT
61 CGAATTTTTCTCTTCCAGCCATTTGTTGGATTTGTTCAACTTTAATAGGTTTTGGTACT
61 CGAATTTTTCTCTTCCAGCCATTTGTTGGATTTGTTCAACTTTAATAGGTTTTGGTACT
121 GTAAATGGACGCCTTTCTTTATTTGTTATCGGATTGTCTTTTATAATCAGTATTTTTTTTA
121 GTAAATGGACGCCTTTCTTTATTTGTTATCGGATTGTCTTTTATAATCAGTATTTTTTTTA
181 TTAAAAAATATAAAGTGAATATCTCTTCAACTTTTTCTTTTTTATTAGTTATTTCTTTT
181 TTAAAAAATATAAAGTGAATATCTCTTCAACTTTTTCTTTTTTATTAGTTATTTCTTTT
241 TTATTAGCTTATTTCTTTTTCTATAAACTCCAAATATGCCTCAACATTTGGATGGTAAG
241 TTATTAGCTTATTTCTTTTTCTATAAACTCCAAATATGCCTCAACATTTGGATGGTAAG
301 TTAAATCCTATACTTTACGTGTTTAAGGCGTTTCCTACTTTATTTTCATTTTTTATTATT
301 TTAAATCCTATACTTTACGTGTTTAAGGCGTTTCCTACTTTATTTTCATTTTTTATTATT
361 TTTGCACTTCCAAGTTTAAAACAAAAAAGCTCTTTTTTATAGGAATTGCTTTGGGAATG
361 TTTGCACTTCCAAGTTTAAAACAAAAAAGCTCTTTTTTATAGGAATTGCTTTGGGAATG
421 TTTGTATTTGCAATTATCAATTCCATTGCAACCTTAGTTTATTTAGAACCCCTTATTAT
421 TTTGTATTTGCAATTATCAATTCCATTGCAACCTTAGTTTATTTAGAACCCCTTATTAT
481 GGAAAAGCGTATCACTTCTTTTATAAAATGGAATATAATTCGCCTGGAATTACCATTTTG
481 GGAAAAGCGTATCACTTCTTTTATAAAATGGAATATAATTCGCCTGGAATTACCATTTTG
541 GCTAGTATGCTACCTATCGTTCTTTTTTGTTTTAACGGTTATCTTTTGGAAATAGATAAA
541 GCTAGTATGCTACCTATCGTTCTTTTTTGTTTTAACGGTTATCTTTTGGAAATAGATAAA
601 AAACATAAATGGCAAAATATTTTTTTTCTATTTCGTTTTCCTGATTAGCATTTCTATTTC
601 AAACATAAATGGCAAAATGTATTTTTTCTATTTCGTTTTCCTGATTAGCATTTCTATTTC
661 TTTTTATTTAGTGACGAACCTTTTTTTTTCTGATCATTGCAAATATAATTATATTAGTT
661 TTTTTATTTAGTGACGAACCTTTTTTTTTCTGATCATTGCAAATATAATTATATTAGTT
721 TTGATTGATTGTGGAAAATCTATTTCGATTCCATAAAGGGATATATTATAAATTTATT
721 TTGATTGATTGTGGAAAATCTATTTCGATTCCATAAAGGGATATATTATAAATTTATT
781 ATTGGATTTTTGATCTTGTTTGTTCGTGTTCTTCTATTTATTTTTTCTTAAAAGAAACA

```

      |||
781  ATTGGATTTTGGATCTTGTTGTTTCGTGTTCTTCTATTTATTTTCTTAAAAGAAACA
      |||
841  TACATTGGTCAGAGAATTATAAACGGAATTTATTCCGAAAAATTAAATCATCATGTTGAT
      |||
841  TACATTGGTCAGAGAATTATGAACGGAATTTATTCCGAAAAATTAAATCATCATGTTGAT
      |||
901  TATTGGAACACGATTAAAAAGATTTTTTTATATACCCTAAAATTACAATTGGATCTGAA
      |||
901  TATTGGAACACGATTAAAAAGATTTTTTTATATACCCTAAAATTACAATTGGATCTGAA
      |||
961  TATACTTTTTGGTATCATAATATTTTTTTTGATTTCGCATAAACTTCCGGTCCTATCACC
      |||
961  TATACTTTTTGGTATCATAATATTTTTTTTGATTTCGCATAAACTTCCGGTCCTATCACC
      |||
1021 GCTTTGATATTATATATTTATTCGGTTTTTATTTTTTTAATTGCATTAAAAAAATCTTTA
      |||
1021 GCTTTGATATTGTATATTTATTCGGTTTTTATTTTTTTAATTGCATTAAAAAAATCTTTA
      |||
1081 AAAAGAGATTATAGATCGTTCCGATATTTTCATTTCTATATTGTGTTTATTCCTATTTA
      |||
1081 AAAAGAGATTATAGATCGTTCCGATATTTTCATTTCTATATTGTGTTTATTCCTATTTA
      |||
1141 ATGACAACAATACCTTGGAATCCTCAGAGTCTCAAATGGTAGCATTGTTTGCGGGTTTA
      |||
1141 ATGACAACAATACCTTGGAATCCTCAGAGTCTCAAATGGTAGCATTGTTTGCGGGTTTA
      |||
1201 GGGGCTTTGATCACAACCTGTAGATGATCAAACCTCCTGAAATGTAG
      |||
1201 GGGGCTTTGATCACAACCTGTAGATGATCAAACCTCCTGAAATGTAG

```

รูปที่ 2 ลำดับเบสของ nested PCR primer สำหรับ Leptospiral 16S rRNA

```

1   AACACGGAGA GTTTGATCCT GGCTCAGAAC TAACGCT GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG CAA
   TTGTGCCTCT CAAACTAGGA CCGAGTCTTG ATTGCGACCG CCGCGCAGAA TTTGTACGTT
61  GTCAAGCGGA GTAGCAATAC TCAGCGGCGA ACGGGTGAGT AACACGTGGG TAATCTTCCT
   CAGTTCGCCT CATCGTTATG AGTCGCCGCT TGCCCACTCA TTGTGCACCC ATTAGAAGGA
121 CTGAGTCTGG GATAACTTTC CGAAAGGGAA GCTAATACTG GATGGTCCCG AGAGATCACA
   GACTCAGACC CTATTGAAAG GCTTTCCCTT CGATTATGAC CTACCAGGGC TCTCTAGTGT
181 AGATTTTTCG GGTAAAGATT TATTGCTCGG AGATGAGCCC GCGTCCGATT AGCTAGTTGG
   TCTAAAAAGC CCATTTCTAA ATAACGAGCC TCTACTCGGG CGCAGGCTAA TCGATCAACC
241 TGAGGTAAAG GCTCACCAAG GCGACGATCG GTAGCCGGCC TGAGAGGGTG TTCGGCCACA
   ACTCCATTTC CGAGTG GTTC CGCTGCTAGC CATCGGCCGG ACTCTCCAC AAGCCGGTGT
301 ATGGAAGTGA GACACGGTCC ATACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTTAAGAAT CTTGCTCAAT
   TACCTTGACT CTGTGCCAGG TATGAGGATG CCCTCCGTCG TCAATTC GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG
361 GGGGGGAACC TGAAGCAGCG ACGCCGCGTG AACGATGAAG GTCTTCGGAT TGTAAGTTC
   GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG GG ACTTCGTCGC TGC GGCGCAC TTGCTACTTC CAGAAGCCTA ACATTTCAAG
421 AGTAAGCAGG GAAAATAAG CAGCAATGTG ATGATGGTAC CTGCCTAAAG CACCGGCTAA
   TCATTCGTCC CTTTTTATTC GTCGTTACAC TACTACCATG GACGGATTTT GTGGCCGATT

```

Primer design

Primer A (+ strand) from nucleotide base 38-57

5' **GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG** 3'

Primer B (- strand) from nucleotide base 349-369

5' **TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT** 3'

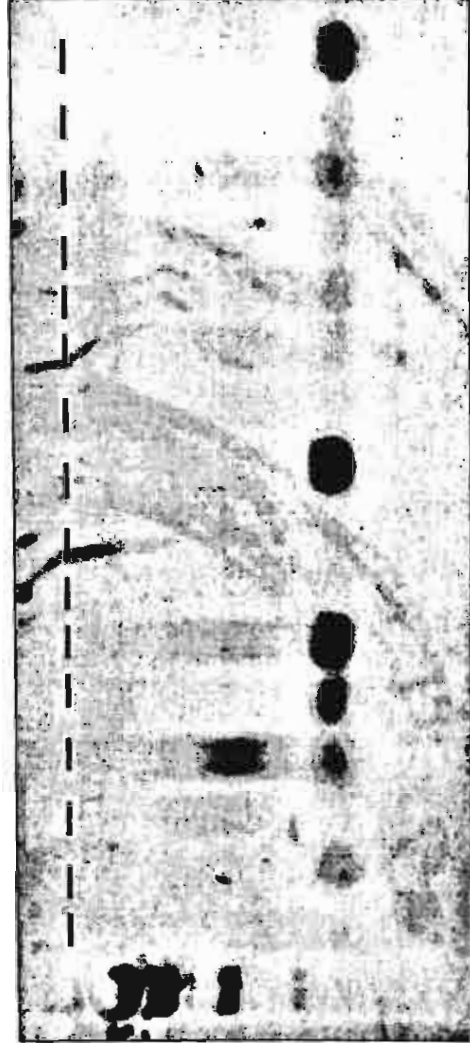
Primer C (+ strand) from nucleotide base 58-77

5' **CAA GTC AAG CGG AGT AGC AA** 3'

Primer F (- strand) from nucleotide base 206-223

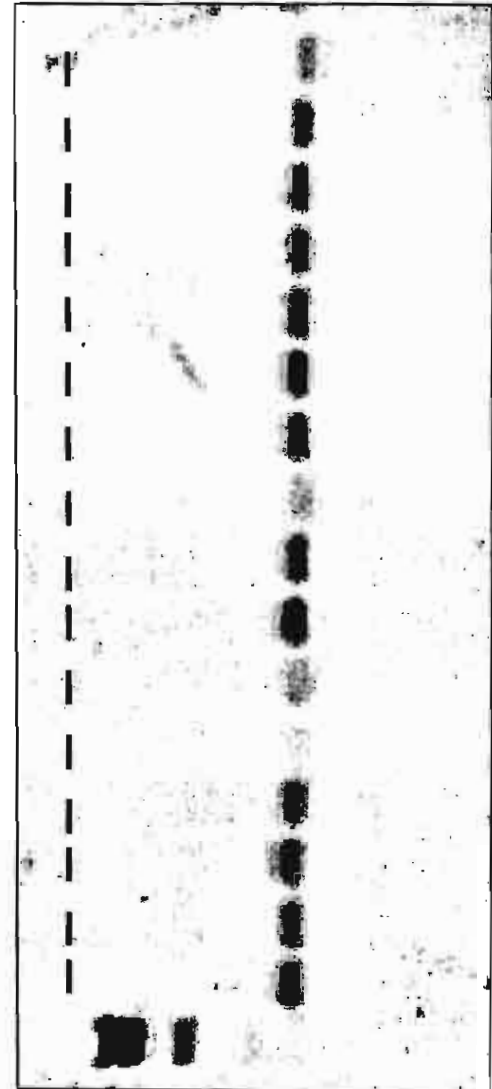
5' **CGC GGG CTC ACT TCC GAG** 3'

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



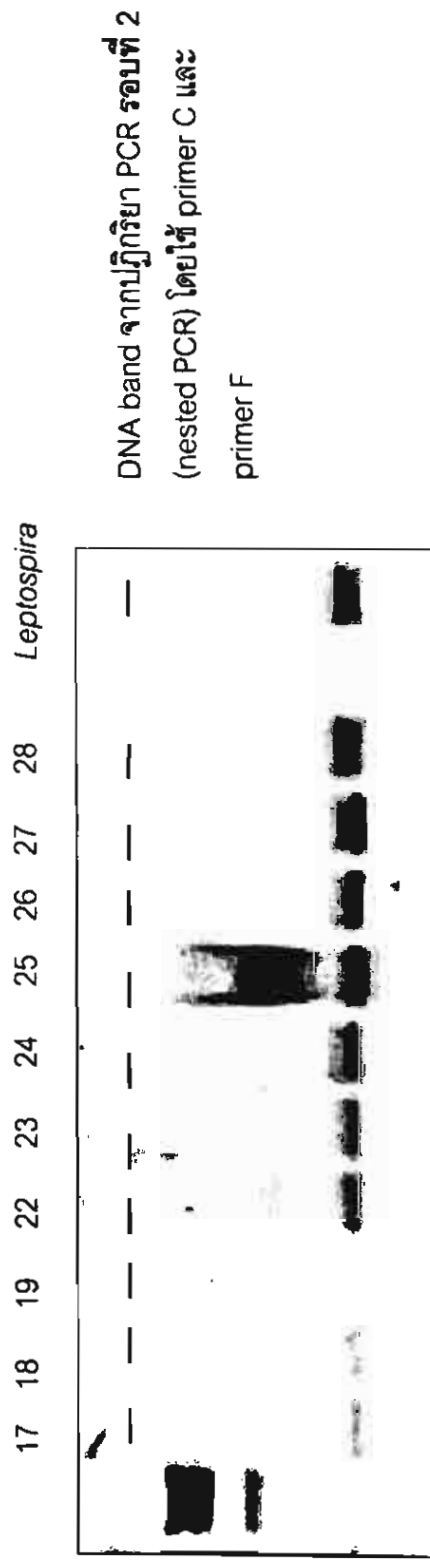
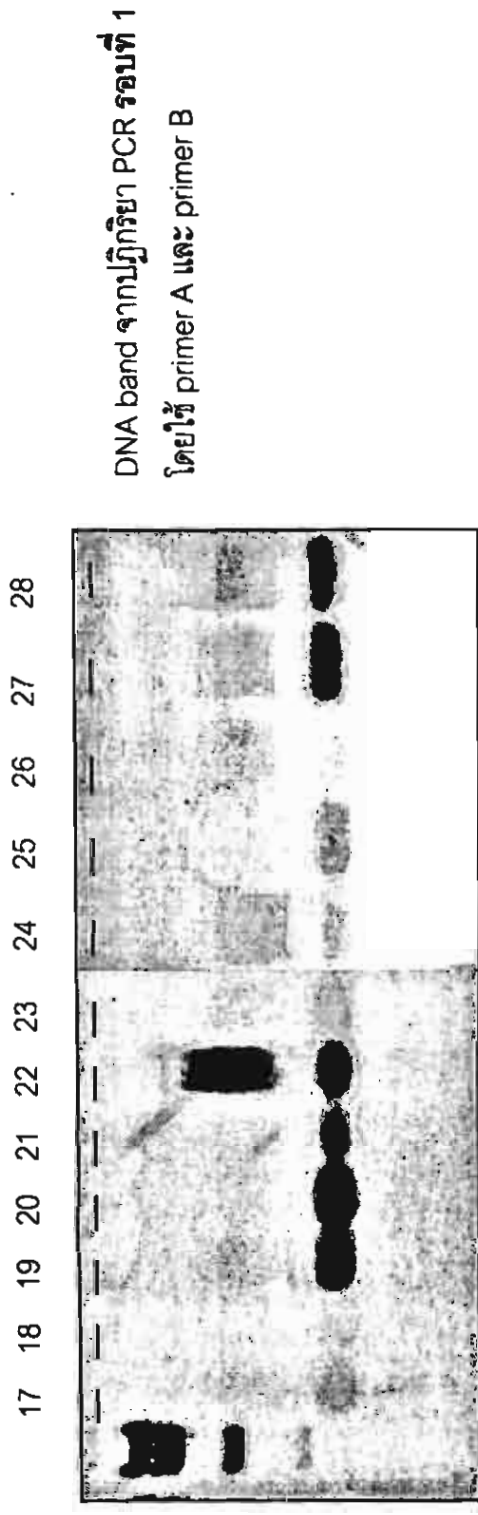
DNA band จากปฏิกิริยา PCR รอบที่ 1
โดยใช้ primer A และ primer B

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



DNA band จากปฏิกิริยา PCR รอบที่ 2
(nested PCR) โดยใช้ primer C และ
primer F

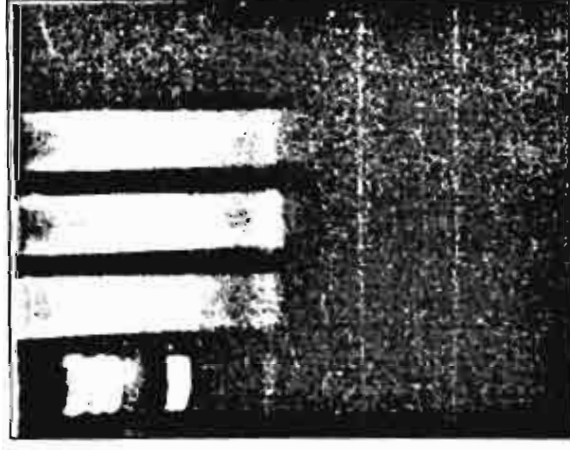
รูปที่ 3.1 Agarose gel electrophoresis ของ DNA band จากปฏิกิริยา PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 จาก
primer ที่ออกแบบจาก 16S rRNA ของ *Leptospira* sp. โดยใช้ DNA template จาก bacteria ต่างๆ
เบอร์ 1-16 ดังที่อธิบายตามตารางที่ 2



รูปที่ 3.2 Agarose gel electrophoresis ของ DNA band จากปฏิกิริยา PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 จาก primer ที่ออกแบบจาก 16S rRNA ของ *Leptospira* sp. โดยใช้ DNA template จาก bacteria ต่างๆ เบอร์ 17-28 ดังที่เพิ่มเติมตามตารางที่ 2 DNA band ที่เกิดจาก *Leptospiral* DNA แสดงใน lane สุดท้าย

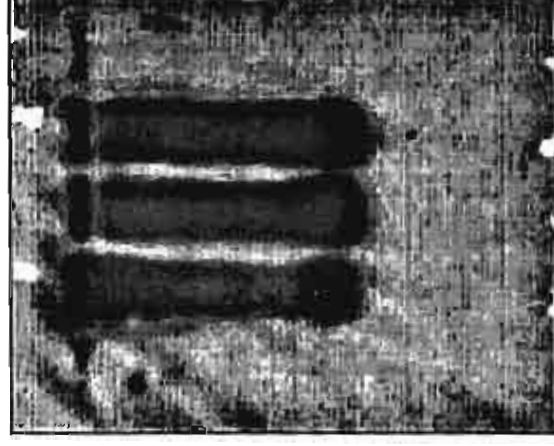
(I)

(a) (b) (c) (d)



(II)

(a) (b) (c) (d)



รูปที่ 4 การศึกษาวิธีการเก็บเลือดจากผู้ป่วยมีผลต่อกระบวนการสกัด *Leptospiral* DNA และการเกิด PCR product อย่างไร โดยการ inoculate *leptospiral* cells ลงในเลือดทำให้มีความเข้มข้นประมาณ $\sim 10^7$ cells/ml ต่อจากนั้นนำไปใส่ในหลอดเก็บเลือดชนิดต่างๆ แล้วจึงสกัด DNA จาก serum หรือ plasma แล้วจึงนำ DNA เหล่านี้ไปเพิ่มจำนวน โดยกระบวนการ PCR รูปที่ I คือ PCR product จาก agarose gel electrophoresis; รูปที่ 2 คือ Southern Hybridization ของ PCR product นั้น

- a) ตัวอย่าง serum แยกจากหลอดที่มีลูกแก้ว (bead)
- b) ตัวอย่าง serum แยกจากหลอดที่ไม่มีลูกแก้ว
- c) พลาสมาแยกจากหลอดที่เคลือบด้วย EDTA
- d) พลาสมาแยกจากหลอดที่เคลือบด้วย heparin

(a) (b) (c) (d)

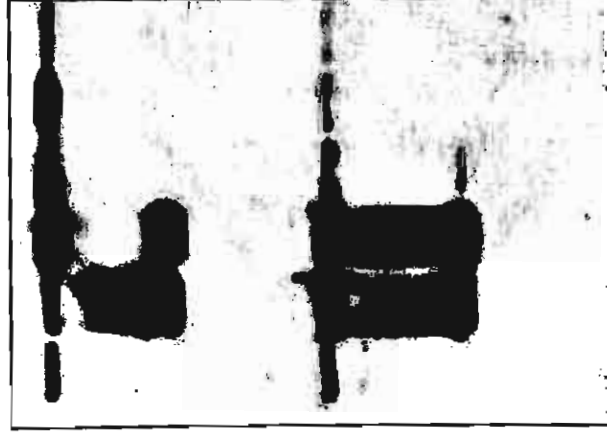


รูปที่ 5. การทดสอบความไวของกระบวนการ nested PCR โดยการใส่ Leptospiral cells ลงในซีรัมคนปกติ ที่จำนวนต่างๆ โดยทำเจือจางลง 10 เท่า ตามลำดับ โดยกำหนดว่า ซีรัมปริมาณ 300 ul ที่นำมาสกัดจะมีจำนวนเชื้อดังนี้

- a) 10^3 cells
- b) 10^2 cells
- c) 10 cells
- d) 1 cell

DNA สกัดจากตัวอย่างเหล่านี้้นำไปทำ nested PCR จะตรวจไม่พบใน agarose gel แต่เมื่อนำ PCR product ไปทำ Southern hybridization ค่อยจะตรวจพบ และตรวจได้ก็อย่างต่ำคือ 10 cells

100 ng
10 ng
1 ng



1st round PCR

2nd round PCR

รูปที่ 6. การทดสอบความไวของกระบวนการ nested PCR และต่อด้วย Southern Hybridization โดยการใช้ genomic DNA ของ *Leptospira* เริ่มจาก 100 ng และทำเจือจางลง 10 เท่าตามลำดับ พบว่าหลังจาก nested PCR รอบที่ 1 จะตรวจได้ตัวอย่างต่ำที่ 10 ng แต่หลังจาก nested PCR รอบที่ 2 จะตรวจได้ตัวอย่างต่ำที่ 1 ng ฉะนั้น nested PCR รอบที่ 2 จะเพิ่มความไวขึ้น 10 เท่า

E₈ E₉ E₁₀ E₁₁ F₁ F₂ F₃ F₄ F₅ F₆ F₇ F₈ F₉ F₁₁ F₁₂ F₁₃



รูปที่ 7. แสดงตัวอย่างผล PCR product จากคนไข้ Leptospirosis โดย PCR product จากผู้ป่วยเหล่านี้
ไม่สามารถมองเห็นจาก agarose gel แต่จะเห็นได้หลังจากกระบวนการ Southern
hybridization

ตารางที่ 1 ความจำเพาะของยีนส์ *orf 14* จาก serovar Hardjoprajitno (*orfH 14*)

และ *orf 14* จาก serovar Copenhagenii (*orfC 14*) ต่อ genomic DNA ต่างๆของ *Leptospira* spp.

PCR probe		OrfH14	L9-L10	OrfC14	L22-L23
Leptospira serovars	Leptospira species	PCR	Southern	PCR	Southern
1. Autumnalis / Akiyami	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
2. Australis / Ballico	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
3. Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>	N	N	N	N
4. Bangkoki	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
5. Bataviae	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
6. Bratislava	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
7. Canicola	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
8. Celledoni	<i>L. weilli</i>	N	N	P	P
9. Copenhageni	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
10. Djasiman	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
11. Grippityphosa	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
12. Hardjo(prajitno)	<i>L. interrogans</i>	P	P	N	N
13. Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
14. Hyos or Tarassovi	<i>L. borgpetersenii</i>	N	N	N	N
15. Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
16. Javanica	<i>L. borgpetersenii</i>	N	N	N	N
17. Patoc	<i>L. biflexa</i>	N	N	N	N
18. Pomona	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
19. Pyrogenes	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
20. Rachmati	<i>L. interrogans</i>	N	N	P	P
21. Saigon		N	N	N	N
22. Sejroe	<i>L. borgpetersenii</i>	N	N	N	N
23. Wolffii	<i>L. interrogans</i>	N	N	N	N
24. New		N	N	P	P
25. Ranarum	<i>L. meyeri</i>	N	N	N	N
26. Sarmin	<i>L. weilli</i>	N	N	N	N

N, Negative

P, Positive

ตารางที่ 2 ความจำเพาะของ PCR primers ที่ออกแบบจาก 16S rRNA gene
ทดสอบกับแบคทีเรียสปีชีส์ต่างๆ

Pair of oligo primers used	A and B	A and B	C and F
<i>Bacterial species</i>	PCR	Southern	nested PCR
1 . <i>Salmonella</i> Typhi	N	N	P
2 . <i>Salmonella</i> Stanley	N	N	P
3 . <i>Yersinia enterocolitica</i>	N	N	P
4 . <i>Aeromonas hydrophila</i>	N	N	P
5 . <i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	N	P
6 . <i>Salmonella</i> Typhimurium	N	N	P
7 . <i>Salmonella</i> Paratyphi	N	N	P
8 . <i>Salmonella</i> Albany	N	N	P
9 . <i>Salmonella</i> Worthington	N	N	P
10 . <i>Salmonella</i> Schwazoninam	N	N	P
11 . <i>Salmonella</i> Blockley	N	N	P
12 . <i>Salmonella</i> Lexington	N	N	P
13 . <i>Staphylococcus aureus</i>	N	N	P
14 . <i>Citrobacter freundii</i>	N	N	P
15 . <i>Citrobacter diver</i>	N	N	P
16 . <i>E. coli</i> ATCC 25922	N	N	P
17 . <i>Salmonella</i> Choleraesuis	N	N	P
18 . <i>Shigella flexneri</i>	N	N	P
19 . <i>Salmonella</i> Enteritidis (D)	N	N	P
20 . <i>Salmonella</i> Panama (D)	N	N	P
21 . <i>Salmonella</i> Rissen	N	N	P
22 . <i>Salmonella</i> Anatum (E)	N	N	P
23 . <i>Salmonella</i> Agona (E)	N	N	P
24 . <i>Salmonella</i> Weltevreda(E)	N	N	P
25 . <i>Salmonella</i> Chio	N	N	P
26 . <i>Shigella sonnei</i> (D)	N	N	P
27 . <i>Vibrio cholerae</i> O17SR	P	P	P
28 . <i>Vibrio cholerae</i> 569B	P	P	P
29 . <i>Pseudomonas</i> sp.	P	P	P

การทดสอบนี้ใช้ จุลินทรีย์ ในปฏิกิริยา annealing ของกระบวนการ PCR ที่ 65°C
ส่วนจุลินทรีย์ ในกระบวนการ hybridization ที่ 65°C เช่นกัน

ตารางที่ 3 ค.บ. ลำดับเบส PCR primers สำหรับ Leptospiral rfb genes v3017/11 genomic DNA ของ Leptospira spp. ต่างๆ

Focus gene	oriC1	conserved oriC33		conserved oriC14		oriC17		Southern Hyb	
	outer	inner	outer	inner	outer	inner	outer	inner	
pair of primers	L7-L8	L11-L18	L43-L44	L28-L29	L47-L48	L22-L53	L54-L55	L56-L57	L56-L57 probe
annealing Temp used (C)	55	55	55	55	55	55	55	55	65
product size (bp)	757	424	1073	465	878	513	827	488	488
1) Antunidis / Akiyama	F	P	P	P	P	P	ND	P	P
2) Australis / Halicio	F	P	P	P	P	P		P	P
3) Bullum	N	P	P	P	P	P		N	N
4) Hangothi	F	P	P	P	P	P		P	P
5) Halavac	F	P	N	P	P	P		N	N
6) Hrahaava	F	P	P	P	P	P		N	N
7) Canicola	N	P	N	N	P	P		P	P
8) Coliclori	F	P	N	N	P	P		P	P
9) Copenhagani	F	P	N	N	P	P		P	P
10) Diasman	F	P	P	P	P	P		P	P
11) Gripephos 1	F	P	N	N	P	P		P	P
12) Harjo (prajitno)	F	P	N	N	P	P		P	P
13) Hebdomadis	F	P	N	N	P	P		P	P
14) Hyos or Tarssovi	N	P	P	P	P	P		N	P
15) Icter haemorrhagiae	F	P	N	N	P	P		P	P
16) Javanica	F	P	N	N	P	P		P	P
17) Palor	N	P	N	N	P	P		N	N
18) Pomona	F	P	N	N	P	P		P	P

ตารางที่ 4 ความจำเพาะของ PCR primers จาก Leptospiral rDNA genes ทดสอบกับ genomic DNA ของ แบคทีเรียสปีชีส์ ต่างๆ

bacterial species	orf1		conserved orf 33		conserved crfC 14		orfC17		Southern Hyb
	outer	inner	outer	inner	outer	inner	outer	inner	
pair of primers	L7-L8	L17-L18	L43-L44	L28-L29	L47-L48	L22-L53	L54-L55	L56-L57	L56-L57 probe
annealing Temp used (°C)	55	55	55	55	55	55	55	55	65
product size (bp)	767	424	1073	465	878	513	827	488	488
1. <i>Salmonella typhi</i>	N	P	N	P	N	P	N all	N all	N
2. <i>Salmonella stanley</i>	N	P	N	N	N	N			P
3. <i>Yersinia enterocolitica</i>	N	P	N	P	N	P			N
4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	N	N	N	P	N	P			N
5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	N	N	N	N	N			N
6. <i>Salmonella typhimurium</i>	N	N	N	N	N	N			N
7. <i>Salmonella paratyphi</i>	N	P	N	N	N	P			N
8. <i>Salmonella albanus</i>	N	N	N	N	N	N			N
9. <i>Salmonella worthington</i>	N	N	N	N	N	N			N
10. <i>Salmonella schwarzengrund</i>	N	P	N	N	N	N			N
11. <i>Salmonella blockley</i>	N	N	N	N	N	N			N
12. <i>Salmonella lexington</i>	N	N	N	N	N	N			N
13. <i>Staphylococcus aureus</i>	N	N	N	N	N	N			N
14. <i>Citrobacter freundii</i>	N	P	N	N	N	N			N
15. <i>Citrobacter diver</i>	N	N	N	N	N	N			N
16. <i>E. coli</i> ATCC 25922	N	N	N	N	N	N			N
17. <i>Salmonella choleraesuis</i>	N	N	N	N	N	N			P

