

Abstract

Leptospirosis is an infectious disease caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. The leptospires can be classified into several hundreds groups of serogroup and serovar by serological method. However, it needs numerous specific monoclonal antibodies of each serovar or serogroup for the identification. A simple and reliable genotypic classification by using molecular biology techniques is then required. The 97 *Leptospira* isolates, obtained mainly from the Northeast Thailand composed of 8 serovars (Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Grippotyphosa, Javanica, Sejroe, Medanensis and Hebdomadis) and 5 unknown serovars, were classified by three molecular biology techniques including ribotyping using *EcoRI* or *HindIII*, arbitrarily prime polymerase chain reaction (AP-PCR) and mapped restriction sites polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes (MRSP). Each method could not classify leptospires in good correlation with serovars. However, when 3 techniques were combined, 97 leptospires isolates were classified into 36 groups, of which all serovar can be differentiated except Hebdomadis. For a practical usage, *HindIII* ribotyping combined with AP-PCR using primer KF can classify 92 known serovars into 27 groups with the same power of differentiation. Two unknown from the Northeast can be identified as serovar Autumnalis and Javanica. Nevertheless, 3 unknown from the South could not be identified as their genotyping patterns showed unique patterns, of which also the case for all isolates from the South. The correlation between genotype and severity of the disease was not observed. However, it indicated an important type (H1F1) that remains endemic in the Northeast for at least 5 years. The application of *HindIII*-KF typing with leptospires from reservoir hosts may lead to the control of the disease in the future.

บทคัดย่อ

โรค Leptospirosis เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Leptospira* ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อที่พบได้โดยวิธีทาง serology ซึ่งแยกได้เป็นหลายร้อย serogroups และ serovar แต่การจำแนกจำเป็นต้องอาศัยโมโนโคลนแอนติบอดีจำนวนมาก จึงทำให้การจำแนกด้วยวิธีทาง serology มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นการจำแนกโดยอาศัยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการจำแนก โดยได้ทดสอบเชื้อ *Leptospira* จำนวน 97 isolates ที่แยกได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นหลัก ที่มีทั้งสิ้น 8 serovars คือ Autumnalis, Pyrogenes, Bataviae, Grippotyphosa, Javanica, Sejroe, Medanensis และ Hebdomadis และมี 5 serovars ที่ไม่ทราบ มาจำแนกโดยใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 3 วิธี คือ ribotyping ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* or *HindIII*, arbitrarily prime polymerase chain reaction (AP-PCR) และ mapped restriction sites polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes (MRSP) ผลพบว่าไม่มีการจำแนกวิธีใดที่สอดคล้องไปกับวิธีทาง serology แต่เมื่อนำทั้ง 3 วิธีมาประกอบกัน พบว่าเชื้อทั้ง 97 isolates สามารถแบ่งเป็น 36 กลุ่มที่สัมพันธ์กับ serovars ยกเว้น Hebdomadis และเพื่อให้ง่ายต่อการใช้ เมื่อใช้ *HindIII* ribotyping ร่วมกับ AP-PCR ด้วย primer KF จะสามารถจำแนก 92 serovars ที่ทราบแล้วเป็น 27 groups ด้วยประสิทธิภาพในระดับเดียวกัน และ 2 isolate ที่ไม่ทราบ จำแนกได้เป็น serovar Autumnalis และ Javanica แต่อย่างไรก็ดี อีก 3 isolates ที่แยกได้จากภาคใต้ซึ่งไม่ทราบ serovar นั้นไม่สามารถจำแนกได้ เนื่องจากเชื้อทางภาคใต้มีแบบแผนที่แตกต่างจากเชื้อจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบว่ามีแบบแผนใดที่สัมพันธ์กับความรุนแรงในการก่อโรค และพบว่า type H1F1 ยังคงอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจนถึง 5 ปี โดยสรุปแล้ว การนำ *HindIII*-KF typing ไปใช้ โดยเฉพาะนำไปศึกษาเชื้อที่แยกได้จากพาหะประกอบกับเชื้อจากผู้ป่วย น่าจะสามารถนำไปสู่การควบคุมโรคได้ในอนาคต