

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปรา
โดยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction

อลงกร อมรศิลป์^{1*} ไฉไล คูวัฒนานกุล¹ ธานิสร์ ดำรงวัฒนโกสิน¹ โสมทัต วงศ์สว่าง²

Abstract

Alongkorn Amonsin^{1*} Chailai Koowatananukul¹ Thanis Damrongwatanapokin¹ Somatat Wongsawang²

DNA FINGERPRINTING OF *LEPTOSPIRA* SPP. USING A REPETITIVE SEQUENCE-BASED POLYMERASE CHAIN REACTION

A DNA fingerprinting technique, repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR), was used to characterize 20 isolates of both pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. Rep-PCR differentiated 20 *Leptospira* isolates into 16 rep-PCR patterns with a high index of discrimination (D=0.963). The results of cluster analysis demonstrated that pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* belonged to separate clusters with at least 60% similarity. Overall, the results of our studies indicated that rep-PCR is useful for fingerprinting *Leptospira* species. The technique is simple, rapid, inexpensive and may be used for strain tracking in molecular epidemiological investigations of Leptospirosis outbreaks in the future.

Keywords : DNA fingerprints, *Leptospira* spp., repetitive sequence-based polymerase chain reaction

¹Department of Veterinary Public Health, ²Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330

*Corresponding author

¹ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข ²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

อลงกร อมรศิลป์^{1*} ไฉไล ภูวัฒนากุล¹ ฐานิสร์ คำรงค์วัฒนโกสิน¹ โสมทัต วงศ์สว่าง²

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่างจากเชื้อเลปโตสไปรา กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคและกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรคที่แยกได้จากสัตว์แทะและสิ่งแวดลอม โดยวิธี repetitive sequence based polymerase chain reaction (rep-PCR) พบว่า rep-PCR สามารถจำแนกเชื้อได้เป็น 16 แบบ (rep-PCR pattern) และพบว่าวิธี rep-PCR มีความสามารถในการจำแนกเชื้อสูง (D=0.963) ผลการศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี cluster analysis พบว่าเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 2 กลุ่ม อยู่ใน cluster ที่เหมือนกันอย่างน้อย 60% โดยสรุปการศึกษานี้พบว่าวิธี rep-PCR สามารถนำมาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ เชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธี rep-PCR เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และอาจนำมาใช้ในการหาแหล่ง ที่มาของเชื้อในการศึกษา ระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสต่อไป

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เชื้อเลปโตสไปรา repetitive sequence-based polymerase chain reaction

บทนำ

เชื้อเลปโตสไปรา (*Leptospira* spp.) เป็นเชื้อสไปโรจิต (spirochaete) ซึ่งเป็นแบคทีเรีย แกรมลบแบบเคลื่อนที่ได้ (motile) และต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligate aerobic) เชื้อนี้จัดอยู่ใน Genus *Leptospira* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่ม ที่ทำให้เกิดโรค (*Leptospira interrogans*) และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค (*Leptospira biflexa*) ตามการจำแนกเชื้อ โดยวิธีทางชีวเคมี เชื้อเลปโตสไปราสามารถจำแนกออกได้มากกว่า 200 serovars (Paster et al., 1991) เชื้อนี้สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเลปโตสไปโรซิส ในปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า และคน

โรคเลปโตสไปโรซิสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบได้ทั่วโลก อาการโดยทั่วไปของผู้ป่วย โรคเลปโตสไปโรซิส ได้แก่ อาการไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะและกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง หนาวสั่น ตาแดง และอาจมีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมด้วย (กรมควบคุมโรคติดต่อ, 1999) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซิสเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา จากรายงานการเฝ้าระวังโรคของกระทรวงสาธารณสุขพบว่าในปี 2541 และ 2542 มีผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรซิส จำนวน 2,168 ราย (เสียชีวิต 102 ราย) และ 4,680 ราย (เสียชีวิต 200 ราย) ตามลำดับ โดยร้อยละ 89.8 ของผู้ป่วยอยู่ในภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ (กรมควบคุมโรคติดต่อ, 1999; กองระบาดวิทยา, 2000) ดังนั้นจึงนับได้ว่าโรคเลปโตสไปโรซิสเป็น emerging disease ที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ในขณะนี้การศึกษาระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซิสสามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราตามวิธีการทางแบคทีเรียวิทยา วิธีการทางชีวเคมี หรือ microscopic agglutination test (MAT) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase Chain Reaction, PCR) โดยการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างเลือด หรือปัสสาวะจากคนและสัตว์ (Merien et al., 1992; Savio et al., 1994; Wagenaar et al., 1994; Zuerner and Bolin, 1997) นอกจากนี้การศึกษาระบาดวิทยายังสามารถทำได้โดยการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรม (DNA-based subtyping) หรือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของเชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งมีหลายวิธีโดยแต่ละวิธีมีประโยชน์ในการหาสายพันธุ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุในการระบาดของโรค ตัวอย่างของวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา เช่นวิธี DNA hybridization (Ramadass et al., 1992), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Ellis et al., 1988; Zuerner et al., 1993), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) และ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Perolat et al., 1994; Letocart et al., 1997; Pereira et al., 2000)

นอกจากนี้ยังมีวิธี Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่นำมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด (Woods et al., 1993; Versalovic et al., 1995; Amonsin et al., 1997) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการใช้วิธี rep-PCR ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราแต่อย่างใด

การศึกษาวัยครั้งนี้เป็นการนำเสนอข้อมูลใหม่ด้านการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ทางการศึกษา ระบาดวิทยาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อเลปโตสไปรา

รายละเอียดของเชื้อเลปโตสไปราในการวิจัยครั้งนี้จำนวน 20 ตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 เชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic *Leptospira*; *L. interrogans*) (n=10) แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากไตหรือปัสสาวะของสัตว์ทะเล เชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic *Leptospira*; *L. biflexa*) (n=10) ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน การตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Feltcher medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) ณ อุณหภูมิ 28-30°C. เป็นเวลา 3 ถึง 13 สัปดาห์ การทดสอบกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราทำได้โดยการทดสอบเชื้อทางแบคทีเรียวิทยา และการทดสอบโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา

การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform (Amonsin et al., 1997) รายละเอียดวิธีการสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วย การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Feltcher medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) ณ อุณหภูมิ 25°C. เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำมาต้มที่อุณหภูมิ 100°C. นาน 10 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และปั่นเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบนาน 5 นาที จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วย 50xTE (0.5 M Tris HCl, 50 mM EDTA [pH 8.0]) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และเติม Lysozyme (0.2 มก. ต่อ มล.) และ RNase A (0.3 มก. ต่อ มล.) แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 1 ชั่วโมงเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ เติม SDS (0.6% โดยปริมาตร) แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 65°C. นาน 10 นาที และเติม Proteinase K

(0.6 มก. ต่อ มล.) และแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 1 ชม. เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ จากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อสกัดโปรตีน และปั่นเพื่อแยกชั้นโปรตีนและดีเอ็นเอ ความเร็ว 15,000 รอบนาน 5 นาที จากนั้นเก็บสารละลายชั้นบน (supernatant) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และเติม 3.0 M ammonium acetate (0.1 เท่า) และ absolute ethanol (2.5 เท่า) แล้วแช่ที่อุณหภูมิ -20°C. นาน 12 ชม. เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำสารละลายมาปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ (pellet) และเติม 70% ethanol ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร และปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบ 15 นาที เพื่อล้างและเก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติม 1xTE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ระดับ 260/280 nm (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

การหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี repetitive sequence based-polymerase chain reaction (rep-PCR)

วิธีการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี rep-PCR ประกอบด้วย primer 1 คู่คือ ERIC IR -5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC (22 ลำดับเบส) และ ERIC II- 5'- AAGTAAGTGACT GGGGTGAGCG (22 ลำดับเบส) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลีเมอเรสโดยวิธี rep-PCR จะใช้สารเคมีในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1 x PCR buffer II (Fermentas, Hanover, MD), 1 mol of each primer (ERIC IR และ ERIC II) (Genset Biotech, Pte Ltd, Singapore), 200 µm of dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Fermentas), 3.5 mM of MgCl₂ (Fermentas) และ 2.5 U of Amplitaq DNA polymerase (Fermentas) ในแต่ละการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจะใช้ดีเอ็นเอประมาณ 100 ng หลังจากผสมสารเคมีจะทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ Thermal cycler (Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK) ด้วยการตั้ง PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่ 94°C. นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94°C. นาน 30 วินาที annealing ที่ 45°C. นาน 3 นาที extension ที่ 72°C. นาน 2 นาที จากนั้นตามด้วย final extension ที่ 72°C. นาน 7 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว นำ PCR product มา

ตรวจสอบใน 2.0% agarose gel electrophoresis (FMC Bioproducts, rockland, ME) และบันทึกภาพโดย gel documentation system (Vilbur Lourmat, La Vallee Cedex, France)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relatedness) ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี cluster analysis

ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส rep-PCR เมื่อนำมาตรวจสอบใน 2.0% agarose gel electrophoresis จะได้ banding pattern หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา จากนั้นนำ banding pattern ของเชื้อแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Molecular Analyst Finger-printing Plus (Bio-Rad, Hercules, CA) โดยวิธี cluster analysis

Cluster analysis ได้จากการคำนวณค่า percentage of similarity ในแต่ละคู่ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยยึดหลักการเปรียบเทียบขนาดของ band การคำนวณค่า percentage of similarity ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ Dice coefficient (SD) โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร (Dice, 1945; Sneath and Sokol, 1973)

$$SD = \frac{2nAB}{nA + nB}$$

nAB คือ จำนวน band ที่พบใน A และ B (number of bands common for A and B) nA คือ จำนวน band ที่ พบใน A (total number of bands in fingerprint A) และ nB คือ จำนวน band ที่พบใน B (the total number of bands in fingerprint B) ค่า S_D มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1.00 ค่า 0 หมายถึง total dissimilarity between the fingerprints และค่า 1.00 หมายถึง complete identity between the fingerprints

หลังจากคำนวณค่า percentage of similarity แล้ว cluster analysis ระหว่างเชื้อ สามารถทำได้โดยใช้วิธี unweighted pair-group arithmetic average clustering (UPGMA) (Sneath and Sokol, 1973) จากนั้นสามารถนำเสนอความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram)

การคำนวณความสามารถในการจำแนกของวิธี rep-PCR (Discrimination index)

ความสามารถในการจำแนก (Discrimination index) ของวิธีการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถคำนวณได้จากสูตร (Hunter and Gaston, 1988)

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

N คือ จำนวนเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบ (total number of strains) s คือ จำนวนแบบ (pattern) ที่จำแนกได้ (total number of types) และ n_j คือ จำนวนเชื้อในแต่ละแบบ (number of strains in the jth type) ค่าความสามารถในการจำแนกมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 หากวิธีใด มีค่าความสามารถในการจำแนกเท่ากับ 1.0 ถือว่าวิธีนั้นๆ มีความสามารถในการจำแนกชนิดของเชื้อสูง หรือเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ผล

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี rep-PCR พบว่าวิธี rep-PCR สามารถใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา และให้ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่หลากหลาย (polymorphism) จำนวน band โดยเฉลี่ยของลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือ 9.6 bands (6-15) ขนาดของ band ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีตั้งแต่ 50 bp ถึง 1300 bp รูปที่ 1 แสดงผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค โดยใช้ 100 bp marker เป็นขนาด ดีเอ็นเอมาตรฐาน (molecular weight standard) รูปที่ 2 แสดงผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค ซึ่งจะเห็นได้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราในกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรคมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลายกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรค

ผลการหาความสัมพันธ์ของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่างพบว่าวิธี rep-PCR สามารถจำแนกเชื้อได้ 16 แบบ (rep-PCR pattern) และสามารถแสดงผลการศึกษาในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram) (รูปที่ 3) จากโครงสร้างความสัมพันธ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ถูกนำเสนออยู่ในแนวตั้งด้านขวา และโครงสร้างความสัมพันธ์ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อในรูปของ percentage similarity อยู่ในแนวตั้งด้านซ้าย ซึ่งจะเห็นได้ว่า เชื้อเลปโตสไปราที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันจะอยู่ใน rep-PCR

pattern เดียวกัน และเชื้อที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอใกล้เคียงกันจะอยู่กลุ่ม(cluster) เดียวกัน ผลการศึกษาพบว่า 100% (10/10) ของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรคจะอยู่ในกลุ่ม A (cluster A) ซึ่งประกอบด้วย 6 rep-PCR patterns (pattern 11-16) ส่วน 60% (6/10) ของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรคจะอยู่ในกลุ่ม B (6 rep-PCR patterns; pattern 1-6) และ 40% (4/10) จะอยู่ในกลุ่ม C (4 rep-PCR patterns; pattern 7-10) จะเห็นได้ว่าเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือลักษณะทางพันธุกรรมที่แยกจากกัน โดยถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเหมือนกันอย่างน้อย 60% นอกจากนี้การจัดกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา อาจสามารถนำเสนอได้ในรูปของ matrix ของ percentage of similarity (รูปที่ 4) ผลการศึกษาค้นนี้จะพบว่า เชื้อเลปโตสไปราถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 4

ความสามารถในการจำแนก (discrimination index) ของวิธี rep-PCR ในการศึกษาวิจัย ครั้งนี้ ได้จากการคำนวณจากสูตร ซึ่งผลการศึกษาพบว่าวิธี rep-PCR มีความสามารถในการจำแนกเท่ากับ 0.963 หรือ 96.3% แสดงว่าวิธี rep-PCR โดยการใช้ primer ERIC IR และ ERIC II มีความสามารถในการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราสูง และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราได้เป็นอย่างดี

วิจารณ์

วิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger-printing) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธี rep-PCR ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา จากการสืบค้นเอกสารอ้างอิงในปัจจุบันพบว่า ยังไม่มีรายงานการใช้วิธี rep-PCR ในการหาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราแต่อย่างใด (Levett, 2001) ซึ่งวิธี rep-PCR นี้มีประโยชน์ในด้านการศึกษาระบาดวิทยาระดับโมเลกุล (molecular epidemiology) ของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญในด้านการแพทย์ เช่น Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (Dunne and Wang, 1997) หรือ Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (Depano et al., 2000) และเชื้อที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น avian *Escherichia coli* (Moura et al., 2001) หรือ *Salmonella enterica* (Johnson et al., 2001)

การวิจัยครั้งนี้พบว่าการใช้วิธี rep-PCR ด้วย primer ERIC IR และ ERIC II เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราให้ผลเป็นที่น่าพอใจ (รูปที่ 1 และ 2) ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรามีความหลากหลาย (high polymorphism) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PCR restriction endonuclease analysis (Brown and Levett, 1997) เมื่อคำนวณหาค่าความสามารถในการจำแนก (discrimination index) พบว่าวิธี rep-PCR มีค่าความสามารถในการจำแนกที่สูง (0.963) ซึ่งโดยปกติค่าความสามารถในการจำแนกของวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หากมีค่ามากกว่า 0.80 ถือว่าเป็นที่ยอมรับได้ (Swanminathan and Matar, 1993) ดังนั้นวิธี rep-PCR จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราได้

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยวิธี cluster analysis พบว่าเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 2 กลุ่มแยกจากกันอย่างเด่นชัด (อย่างน้อย 60% similarity) (รูปที่ 3 และ 4) ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลของการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สอดคล้องกับการศึกษาของ Perolat et al., 1994 ที่ว่าเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 2 กลุ่มสามารถแยกจากกัน ได้อย่างชัดเจนโดยวิธี Map Restriction Site Polymorphism (MRSP) นอกจากนี้ยังอาจกล่าวได้ว่าวิธี rep-PCR อาจนำมาช่วยในการตรวจพิสูจน์เชื้อ จำแนกกลุ่มของเชื้อ และแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อได้ในขณะเดียวกัน

ข้อได้เปรียบของวิธี rep-PCR คือ วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วย primers ที่จำเพาะต่อ repetitive sequence ของเชื้อแบคทีเรียทำให้สามารถหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์ได้ ขณะเดียวกันการใช้ primer ที่มีความจำเพาะทำให้ผลการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความคงตัว (reproducibility) โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับ วิธี RAPD ซึ่งใช้ primer ที่ไม่จำเพาะ และ PCR condition ที่ annealing temperature ต่ำ (low stringency) (Corney et al., 1993) นอกจากนี้วิธี rep-PCR ยังถือว่าเป็นวิธีที่ง่าย และรวดเร็ว (rapid DNA fingerprinting)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของวิธี rep-PCR รวมถึงวิธีการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเออื่นๆ เช่น PFGE, RFLP, RAPD มีความจำเป็นต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการเปรียบเทียบผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การเปรียบเทียบผลอาจทำได้โดยการเปรียบเทียบโดยผู้วิจัย (visual analysis) ซึ่ง

ตารางที่ 1 เชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่าง ที่ใช้ในการศึกษา

Isolate	Source	Culture ^a	PCR ^b	rep-PCR pattern ^c
34	สิ่งแวดล้อม	NP ^d	NP	1
5	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	2
10	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	3
11	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	4
1	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	5
2	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	6
4	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	7
19	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	8
37	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	9
23	สิ่งแวดล้อม	NP	NP	10
237	สัตว์แพะ	P ^e	P	11
238	สัตว์แพะ	P	P	11
286	สัตว์แพะ	P	P	12
246	สัตว์แพะ	P	P	13
217	สัตว์แพะ	P	P	14
218	สัตว์แพะ	P	P	14
245	สัตว์แพะ	P	P	14
255	สัตว์แพะ	P	P	14
229	สัตว์แพะ	P	P	15
289	สัตว์แพะ	P	P	16

^a Culture: ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อโดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา

^b PCR: ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA gene

^c rep-PCR pattern: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี rep-PCR

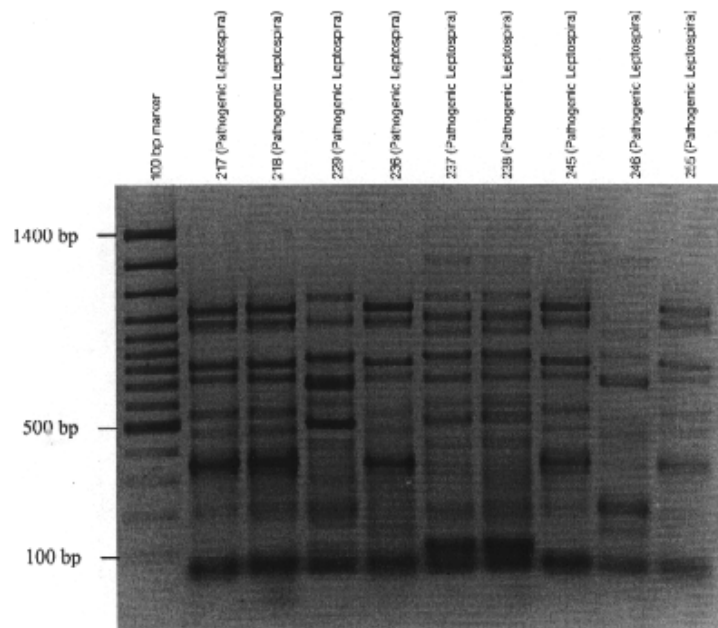
^d NP: Non-pathogenic *Leptospira* spp.

^e P : Pathogenic *Leptospira* spp.

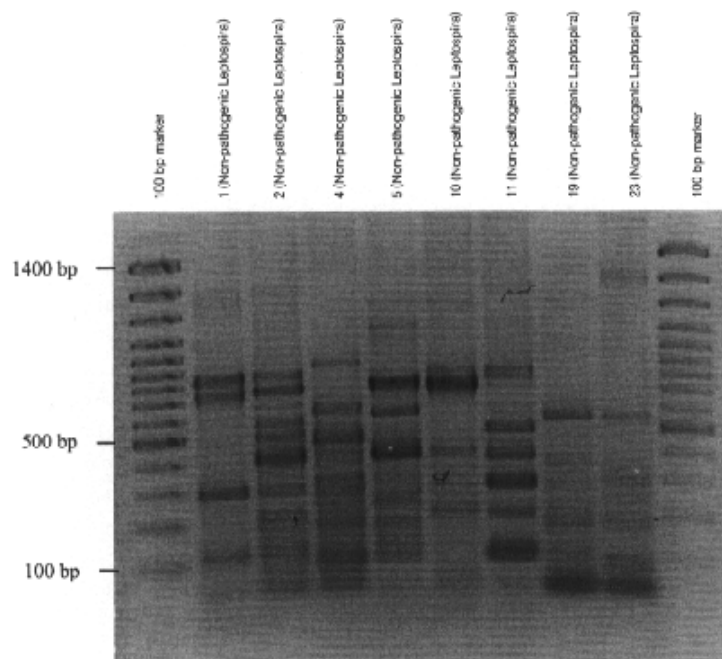
สามารถทำได้ในกรณีที่จำนวนตัวอย่างน้อย หากจำนวนตัวอย่างในการศึกษามาก จำเป็นต้องใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์มาช่วยในการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อลดความผิดพลาดในการแปลผลระหว่างเจล (gel to gel variation) ซึ่งจะให้ผลที่แน่นอน และสามารถแสดงผลในรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ซึ่งง่ายต่อการแปลผล และเข้าใจในความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งนี้ไม่ได้นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับซีโรวาร์ อย่างไรก็ตามประโยชน์ของวิธี

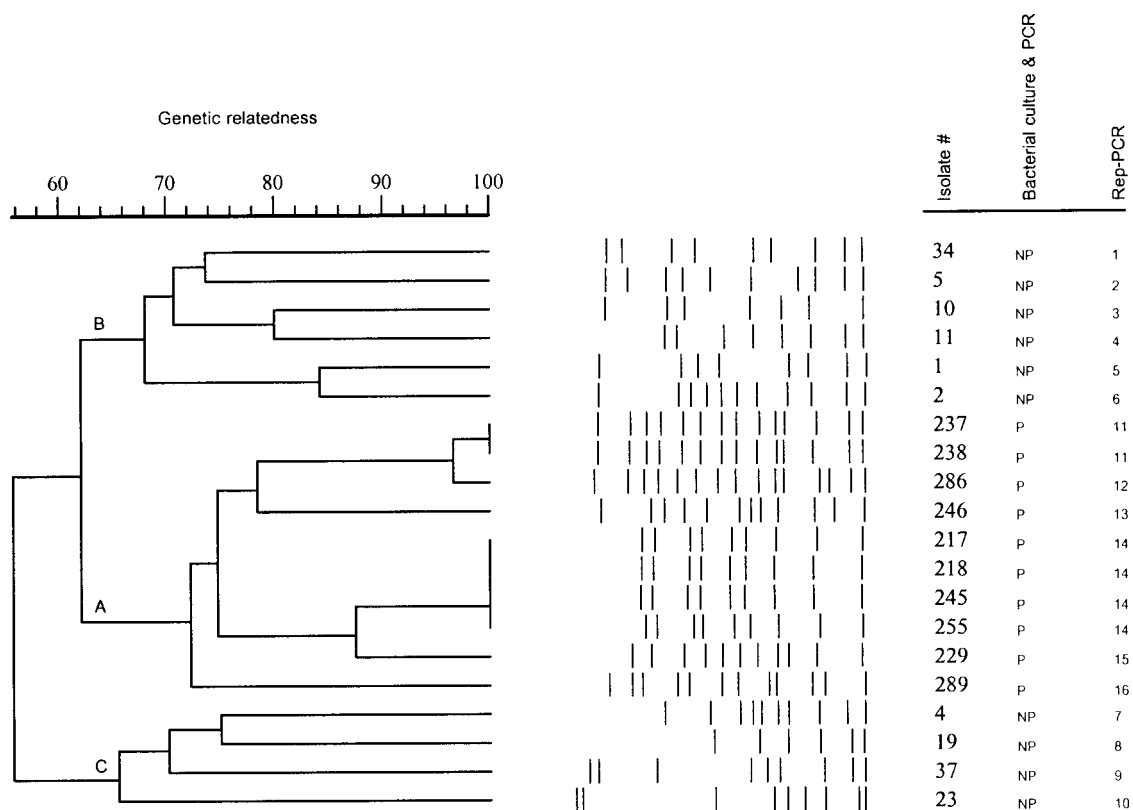
rep-PCR ในอนาคต คือการนำวิธี rep-PCR มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา ในระดับซีโรวาร์ ซึ่งคาดว่าจะสามารถกระทำได้เนื่องจากวิธี rep-PCR มีความสามารถในการจำแนกสูง (0.936) ประกอบกับหากมีการทดสอบวิธี rep-PCR กับเชื้อซีโรวาร์ต่างๆ ต่อจำนวนตัวอย่างที่มากพอจะสามารถสร้างฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (fingerprint database) ของเชื้อแต่ละซีโรวาร์ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบต่อไป



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค โดยวิธี rep-PCR



รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค โดยวิธี rep-PCR

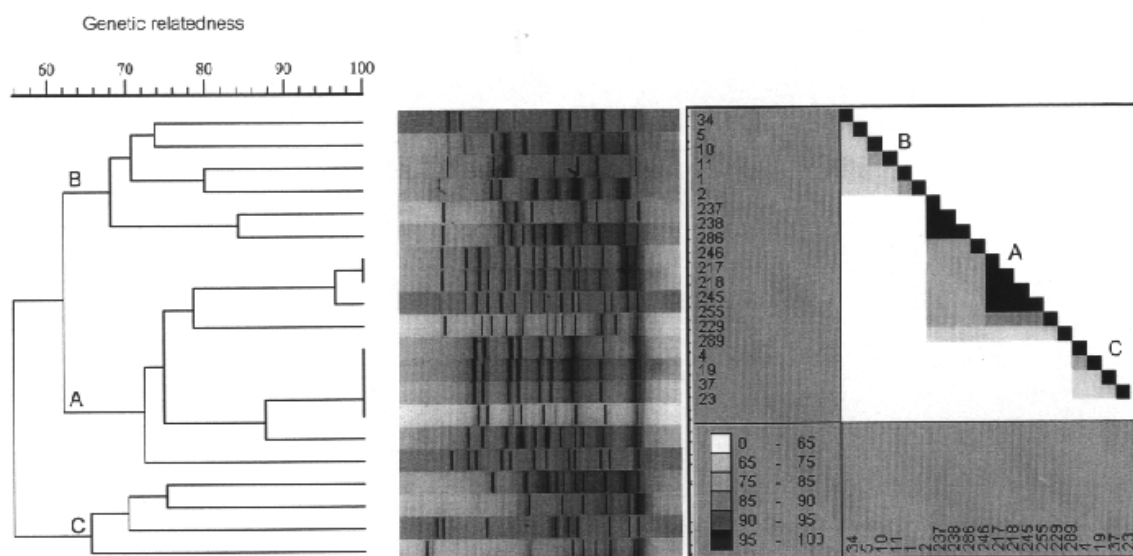


รูปที่ 3 โครงสร้างความสัมพันธ์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่าง

โดยสรุปคณะผู้วิจัยสามารถหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี rep-PCR และพบว่าวิธี rep-PCR มีความสามารถในการจำแนกสูง นอกจากนี้ผลของการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่างพบว่าเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันอย่างน้อยร้อยละ 60%

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2542 (1999). คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 104 หน้า.
- กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. 2543(2000). ข้อมูลรายงานการเฝ้าระวังโรคเลปโตสไปโรซิสในประเทศไทย พ.ศ. 2542.
- Amonsin, A., Wellehan, J. F., Li, L. L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R. A. and Kapur, V. 1997. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J. Clin. Microbiol. 35(11): 2894-2898.
- Brown, P. D. and Levett, P. N. 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR- restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. J. Med. Microbiol. 46(2): 173-181.
- Corney, B. G., Colley, J., Djordjevic, S. P., Whittington, R. and Graham, G. C. 1993. Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 31(11): 2927-2932.
- Depano, A., Schuermans, A., Van Eldere, J., Witte W., Meugnier H., Etienne J., Grundmann H., Jonas D. and



รูปที่ 4 Matrix ของ percentage of similarity จากการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา

- Noordhoek G.T. 2000. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. The European study group on epidemiological marker of the ESCMID. J. Clin. Microbiol. 38: 3527-3533.
- Dice, L.R. 1945. Measurement of the amount of etiologic association between species. Ecology. 26: 297-302.
- Dunne, W.M. and Wang, W. 1997. Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in metropolitan Detroit, Michigan. J. Clin. Microbiol. 35: 388-92.
- Ellis, W.A., Thiermann, A. B., Montgomery, J., Handsaker, A., Winter, P. J. and Marshall, R. B. 1988. Restriction endonuclease analysis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* isolates from cattle. Res. Vet. Sci. 44(3): 375-379.
- Hunter, P. R. and Gaston, M. A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26(11): 2465-2466.
- Johnson J.R., Clabots, C., Azar, M., Boxrud, D. J., Besser, J. M. and Thurn, J. R. 2001. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 39: 3452-60.
- Letocart, M., Baranton, G. and Perolat, P. 1997. Rapid identification of pathogenic *Leptospira* species (*Leptospira interrogans*, *L. borg-petersenii*, and *L. kirschneri*) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. J. Clin. Microbiol. 35(1): 248-253.
- Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14(2): 296-326.
- Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G. and Saint Girons, I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J. Clin. Microbiol. 30(9): 2219-2224.
- Moura, C. A.C., Irino, K. and Vidotto, M. C. 2001. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic panlidromic polymerase chain reaction. Avian Dis. 45: 173-181.

- Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Weisburg, W. G., Tordoff, L. A., Fraser, G. J., Hespell, R. B., Stanton, T. B., Zablen, L., Mandelco, L. and Woese, C. R. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* 173(19): 6101-6109.
- Pereira, M. M., Matsuo, M. G., Bauab, A. R., Vasconcelos, S. A., Moraes, Z. M., Baranton, G. and Saint Girons, I. 2000. A clonal subpopulation of *Leptospira interrogans sensu stricto* is the major cause of leptospirosis outbreaks in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 38(1): 450-452.
- Perolat, P., Merien, F., Ellis, W. A. and Baranton, G. 1994. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR and mapped restriction site polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 32(8): 1949-1957.
- Ramadass, P., Jarvis, B. D., Corner, R. J., Penny, D. and Marshall, R. B. 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int J. Syst. Bacteriol.* 42(2): 215-219.
- Savio, M. L., Rossi, C., Fusi, P., Tagliabue, S. and Pacciarini, M. L. 1994. Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.* 32(4): 935-941.
- Sneath, P.H.A. and Sokol, R.R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman and Co. 230-234.
- Swanminathan, B. and Matar, G. M. 1993. Molecular typing methods. In: Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. D.H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover and T.J. White (eds.). Washington, D.C.: American Society for Microbiology. 26-50.
- Versalovic, J., Kapur, V., Koeuth, T., Mazurek, G.H., Whittam, T.S., Musser, J. M. and Lupski, J.R. 1995. DNA fingerprinting of pathogenic bacteria by fluorophore-enhanced repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med.* 119: 23-29.
- Wagenaar, J. A., Segers, R. P. and Van der Zeijst, B. A. 1994. Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. *Mol. Biotechnol.* 2(1): 1-14.
- Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. 1993. Whole-cell repetitive element sequence based polymerase chain reaction allows rapid assessment of cloning relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1927-1931.
- Zuerner, R. L., Ellis, W. A., Bolin, C. A. and Montgomery, J. M. 1993. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *J. Clin. Microbiol.* 31(3): 578-583.
- Zuerner, R. L. and Bolin, C. A. 1997. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 35(10): 2612-2617.