The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 33
Issue 1 *March, 2003*

Article 3

3-1-2003

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

Alongkorn Amonsin

Chailai Koowatananukul

Thanis Damrongwatanapokin

Somatat Wongsawang

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Amonsin, Alongkorn; Koowatananukul, Chailai; Damrongwatanapokin, Thanis; and Wongsawang, Somatat (2003) "DNA FINGERPRINTING OF LEPTOSPIRA SPP. USING A REPETITIVE SEQUENCE-BASED POLYMERASE CHAIN REACTION," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 33: Iss. 1, Article 3.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol33/iss1/3

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction

อลงกร อมรศิลป์[1*] ไฉไล คูวัฒนานุกูล[1] ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน[1] โสมทัต วงศ์สว่าง[2]

Abstract

Alongkorn Amonsin[1*] Chailai Koowatananukul[1] Thanis Damrongwatanapokin[1] Somatat Wongsawang[2]

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 squence-based polymerase chain reaction

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

[*]Corresponding author

[1]ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข [2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพ 10330

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

อลงกร อมรศิลป์[1*] ไฉไล คูวัฒนานุกูล[1] ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน[1] โสมทัต วงศ์สว่าง[2]

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี repetitive sequence-based polymerase chain reaction

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 20 ตัวอย่างจากเชื้อเลปโตสไปรา กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคและกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรคที่แยกได้จากสัตว์แทะและสิ่งแวดล้อม 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% โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้พบว่าวิธี rep-PCR สามารถนำมาใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ เชื้อเลปโตสไปรา ซึ่งวิธี rep-PCR เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ประหยัด และอาจนำมาใช้ในการหาแหล่ง ที่มาของเชื้อในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซีสต่อไป

คำสำคัญ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เชื้อเลปโตสไปรา repetitive squence-based polymerase chain reaction

บทนำ

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

โรคเลปโตสไปโรซีสเป็นโรคติดต่อจากสัตว์สู่คนที่พบได้ทั่วโลก อาการโดยทั่วไปของผู้ป่วย โรคเลปโตสไปโรซีสได้แก่ อาการไข้เฉียบพลัน ปวดศีรษะและกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง หนาวสั่น ตาแดง และอาจมีอาการเยื่อหุ้มสมองอักเสบร่วมด้วย (กรมควบคุมโรคติดต่อ, 1999) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคเลปโตสไปโรซีสเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา จากรายงานการเฝ้า ระวังโรคของกระทรวงสาธารณสุขพบว่าในปี 2541 และ 2542 มีผู้ป่วยด้วยโรคเลปโตสไปโรซีส จำนวน 2,168 ราย (เสียชีวิต 102 ราย) และ 4,680 ราย (เสียชีวิต 200 ราย) ตามลำดับ โดยร้อยละ 89.8 ของผู้ป่วยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (กรมควบคุมโรคติดต่อ, 1999; กองระบาดวิทยา, 2000) ดังนั้นจึงนับได้ว่าโรคเลปโตสไปโรซีสเป็น emerging disease ที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญทางด้านสาธารณสุข ในขณะนี้การศึกษาระบาดวิทยาของโรคเลปโตสไปโรซีสสามารถทำได้โดยการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราตามวิธีการทางแบคทีเรียวิทยา วิธีการทางซีรั่มวิทยา หรือ microscopic agglutination test (MAT) และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (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

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการนำเสนอข้อมูลใหม่ด้านการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ทางด้านการศึกษา ระบาดวิทยาต่อไป

วัสดุและวิธีการ

เชื้อเลปโตสไปรา

รายละเอียดของเชื้อเลปโตสไปราในการวิจัยครั้งนี้จำนวน 20 ตัวอย่างแสดงไว้ในตารางที่ 1 เชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic *Leptospira; L. interrogans*) (n=10) แยกได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากไตหรือปัสสาวะของสัตว์แทะ เชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ไม่ทำให้ เกิดโรค (non-pathogenic *Leptospira; L. biflexa*) (n=10) ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อจากสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน การตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Feltcher medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) ณ อุณหภูมิ 28-30°ซ. เป็นเวลา 3 ถึง 13 สัปดาห์ การทดสอบกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปราทำได้โดยการทดสอบเชื้อทางแบคทีเรียวิทยา และการทดสอบโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา

การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform (Amonsin et al., 1997) รายละเอียดวิธีการสกัดดีเอ็นเอประกอบด้วย การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ Feltcher medium (Difco Laboratories, Detroit, MI) ณ อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำมาต้มที่อุณหภูมิ 100°ซ. นาน 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 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°ซ. นาน 1 ชั่วโมง เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ เติม SDS (0.6% โดยปริมาตร) แล้วแช่ที่อุณหภูมิ 65°ซ. นาน 10 นาที และเติม Proteinase K (0.6 มก. ต่อ มล.) และแช่สารละลายที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 1 ช.ม. 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°ซ. นาน 12 ช.ม. 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°ซ. หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยเครื่อง spectrophotometer ที่ระดับ 260/280 λ (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

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

วิธีการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี rep-PCR ประกอบด้วย primer 1 คู่คือ ERIC IR -5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC (22 ลำดับเบส) และ ERIC II- 5'- AAGTAAGTGACT GGGGTGAGCG (22 ลำดับเบส) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ โพลิเมอเรสโดยวิธี 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 $MgCl_2$ (Fermentas) และ 2.5 U of Amplitaq DNA polymerase (Fermentas) ในแต่ละการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจะใช้ดีเอ็นเอประมาณ 100 ng หลังจากผสมสารเคมีจะทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้ Thermal cycler (Hybaid limited, Ashford, Middlesex, UK) ด้วยการตั้ง PCR condition ดังนี้ initial denaturation ที่ 94°ซ. นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation ที่ 94°ซ. นาน 30 วินาที annealing ที่ 45°ซ. นาน 3 นาที extension ที่ 72°ซ. นาน 2 นาที จากนั้นตามด้วย final extension ที่ 72°ซ. 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 Cedes, France)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relatedness) ของเชื้อเลปโตสไปรา โดยวิธี cluster analysis

ผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส rep-PCR เมื่อนำมาตรวจสอบใน 2.0% agarose gel electrophoresis จะได้ banding pattern หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรา จากนั้นนำ banding pattern ของเชื้อแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ 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)

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

*n*AB 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 *n*B 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 *j*th type) ค่าความสามารถในการจำแนกมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1.0 หากวิธีใด มีค่าความสามารถในการจำแนกเท่ากับ 1.0 ถือว่าวิธีนั้นๆ มีความสามารถในการจำแนกชนิดของเชื้อสูง หรือเท่ากับ 100 เปอร์เซนต์

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 แสดงผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค โดยใช้ 100 bp marker เป็นขนาด ดีเอ็นเอมาตรฐาน (molecular weight standard) รูปที่ 2 แสดงผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค 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) ของเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรคจะอยู่ ในกลุ่ม 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 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือลักษณะทางพันธุกรรรมที่แยกจากกัน โดยถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเหมือนกันอย่างน้อย 60% นอกจากนี้การจัดกลุ่มของเชื้อเลปโตสไปรา อาจสามารถนำเสนอได้ในรูปของ matrix ของ percentage of similarity (รูปที่ 4) ผลการศึกษาครั้งนี้จะพบว่า 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 และERIC II มีความสามารถในการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราสูง และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปราได้เป็นอย่างดี

วิจารณ์

วิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger-printing) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษา เปรียบเทียบลักษณะทางพันธุ-กรรมของเชื้อแบคทีเรีย 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 วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส 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 patternc
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	สัตว์แทะ	P[e]	P	11
238	สัตว์แทะ	P	P	11
286	สัตว์แทะ	P	P	12
246	สัตว์แทะ	P	P	13
217	สัตว์แทะ	P	P	14
218	สัตว์แทะ	P	P	14
245	สัตว์แทะ	P	P	14
255	สัตว์แทะ	P	P	14
229	สัตว์แทะ	P	P	15
289	สัตว์แทะ	P	P	16

[a] Culture: ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อโดยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา

[b] PCR: ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ที่จำเพาะต่อ 16S rRNA gene

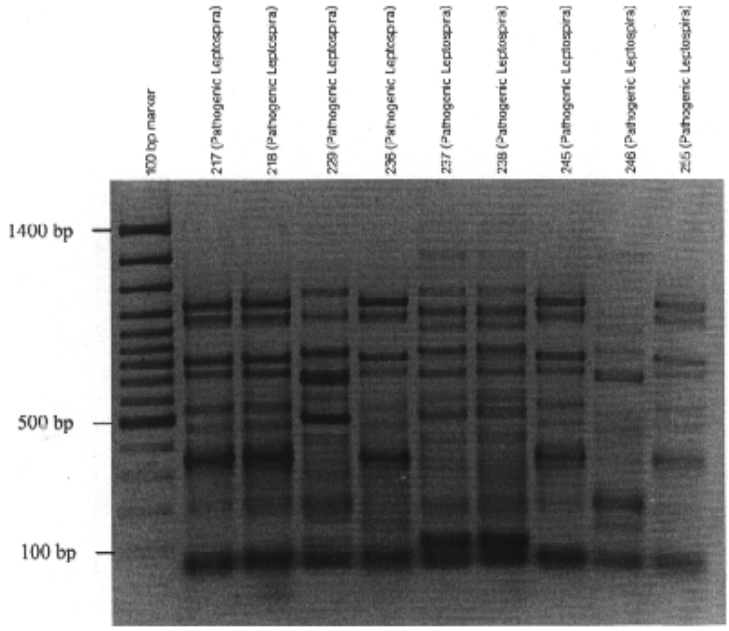
[c] rep-PCR pattern: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี rep-PCR

[d] NP: Non-pathogenic *Leptospira* spp.

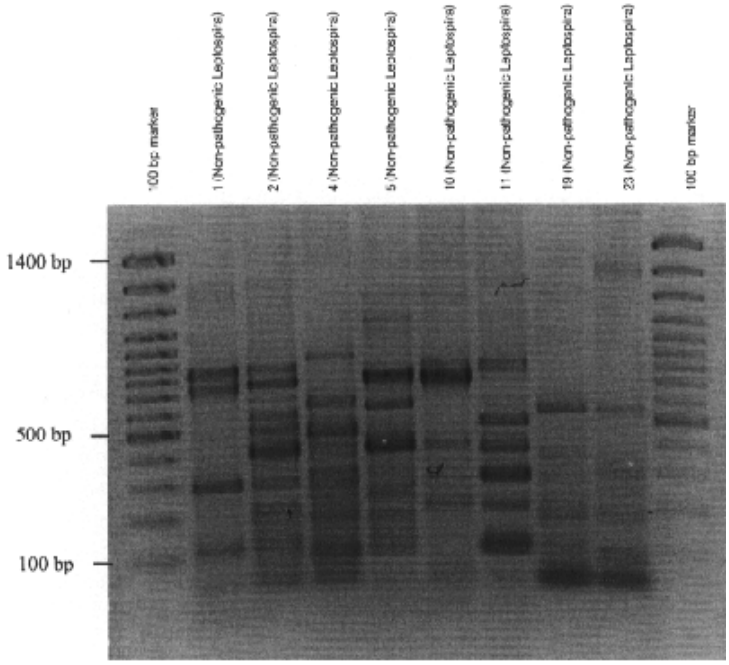
[e] P : Pathogenic *Leptospira* spp.

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

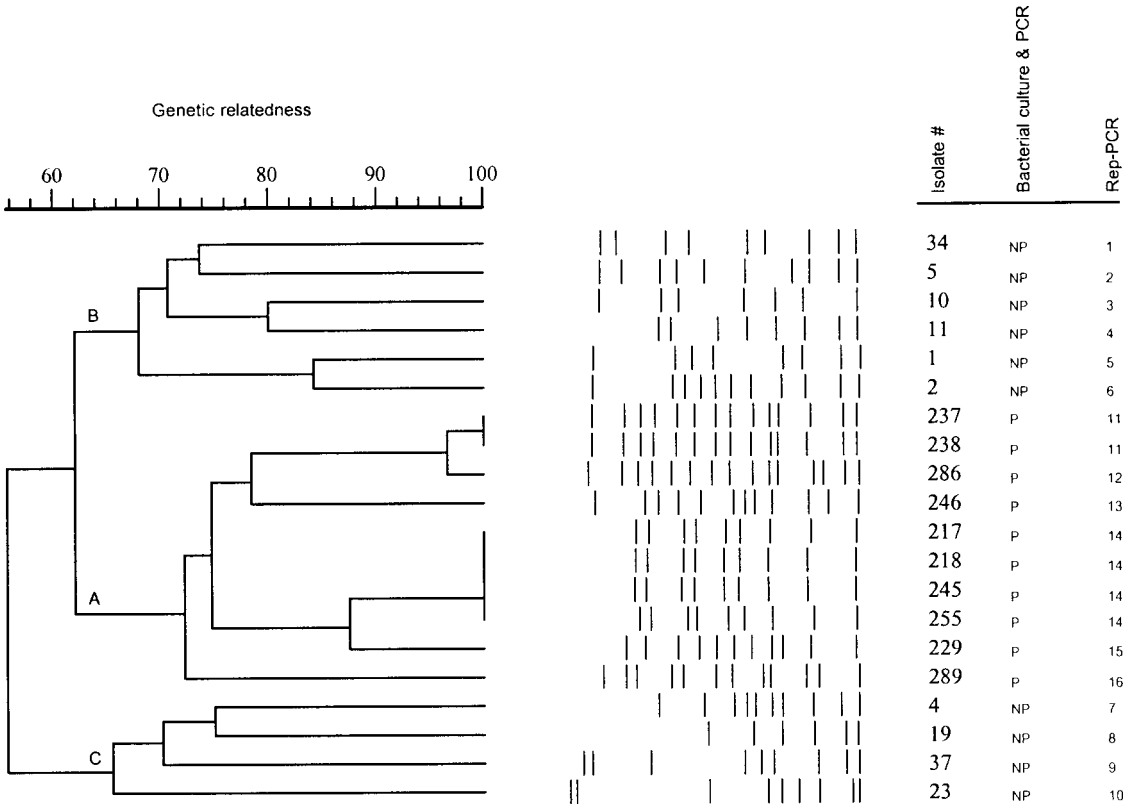
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งนี้ไม่ได้นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อในระดับซีโรวาร์ อย่างไรก็ตามประโยชน์ของวิธี rep-PCR ในอนาคต คือการนำวิธี rep-PCR มาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อเลปโตสไปรา ในระดับซีโรวาร์ ซึ่งคาดว่าสามารถกระทำได้เนื่องจากวิธี rep-PCR มีความสามารถในการจำแนกสูง (0.936) ประกอบกับหากมีการทดสอบวิธี 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 ตัวอย่าง พบว่าเชื้อเลปโตสไปรากลุ่มที่ทำให้เกิดโรค และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันอย่างน้อยร้อยละ 60%

เอกสารอ้างอิง

กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข. 2542 (1999). คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซีส. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 104 หน้า.

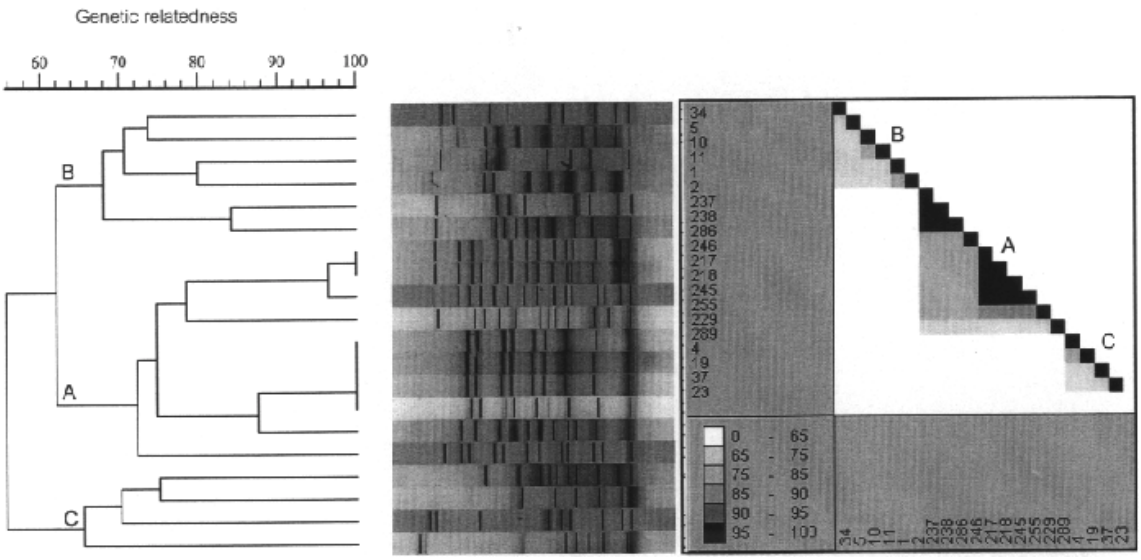
กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข. 2543(2000). ข้อมูลรายงานการเฝ้าระวังโรคเลปโตสไปโรซีสในประเทศไทย พ.ศ. 2542.

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 *Entero-coccus faecium* isolates in metro-politan 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.