การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะแรกเริ่มโดยเทคนิค PCR

จันทนา เมฆสีประหลาด, วทม. (จุลชีววิทยาการแพทย์)*

บทคัดย่อ การวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะแรกเริ่มด้วยการตรวจพบเชื้อหรือชิ้นส่วนของตัวเชื้อเลปโตสไปรา ถูกพัฒนาขึ้นโดยอาศัยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction, PCR) primer ที่เลือกใช้สำหรับเทคนิค PCR มี หลายชนิดเช่น primer A/B และ primer C/D ที่มีความจำเพาะกับ 16S rRNA ของเลปโตสไปรา primer G1/G2 และ primer B64-I/B64-II ที่มีความจำเพาะกับ pathogenic leptospiral DNA และ primer ชนิดอื่น ๆ ที่มีความจำเพาะกับเลปโตสไปราบาง serovar และ serovars ที่ใกล้เคียงกัน เทคนิค PCR ที่พัฒนาขึ้นเหล่านี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ และมีความไวสามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราได้ในปริมาณ 10 เซลล์ นอกจากนี้มีประโยชน์สำหรับตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรคเพื่อช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส

Abstract **Early diagnosis of leptospirosis by PCR technique**

Chantana Mekseepralard, M. Sc. (microbiology)*

An early diagnosis for *Leptospira spp.*, the causative agent of leptospirosis, was developed on the basis of the polymerase chain reaction (PCR). Various primers were used to amplify specific leptospiral DNA, for examples, primer A/B and primer C/D used for amplifying specific *Leptospira rrs* (16S rRNA) gene. Prime G1/G2 and B64-I/B64-II were used for amplifying specific pathogenic leptospiral DNA. The other primers could amplifying serovar-specific DNA and DNA of closely related serovars. The asssay was able to detect as few as 10 bacteria. In additioning, PCR technique was evaluated for the detection of leptospires in clinical samples from patients and animals with acute leptospiral infection. *(MJS 1997 ; 1 : 19 - 28)*

บทนำ

โรคเลปโตสไปโรซิส (leptospirosis) เป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน มีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียใน Genus *Leptopira* ชนิดที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งพบทั้งหมดมากกว่า 200 serovars ที่สามารถจำแนกได้ 6 species ได้แก่ *L. interrogans, L. borgpetersenii, L. weilii, L. noguchii, L santarosai*

* ภาควิชาจุลชีววิทยาการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinvirot University.

และ *L. inadai*[1] อุบัติการณ์ของโรคนี้จะพบสูงขึ้นในช่วงฤดูฝน-ต้นฤดูหนาว และพบมากในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมขัง เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อเลปโตสไปราจากปัสสาวะของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรคในน้ำท่วมขัง

โรคเลปโตสไปโรซิสจัดเป็น zoonosis อีกโรคหนึ่ง ซึ่งพบมากในผู้ป่วยที่มีอาชีพทำนาหรืออาชีพที่ต้องสัมผัสกับสิ่งสกปรกหรือผู้ป่วยที่มีประวัติย่ำน้ำที่ขังเป็นเวลานาน ๆ [2] เชื้อเลปโตสไปราจะไชเข้าสู่ร่างกายทางรอยขีดข่วนหรือบาดแผล อาการของโรคพบได้ตั้งแต่อาการน้อย ๆ จนถึงขั้นรุนแรงหรืออาจจะเสียชีวิตได้[3,5] เช่น fever, myalgia, muscle tenderness, headache, injected conjunctiva, hepatomegaly, renal failure และ jaundice เป็นต้น ซึ่งอาการเหล่านี้คล้ายคลึงกับอาการของโรคติดเชื้ออื่น เช่นโรคไทฟอยด์ (typhoid fever) โรคไวรัสตับอักเสบ (viral hepatitis) หรือโรคไข้เลือดออก (haemorrhagic fever) โดยเฉพาะอาการในระยะแรกของการติดเชื้อ ฉะนั้นการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรติสอย่างถูกต้องและรวดเร็ว จึงมีความสำคัญมากสำหรับตรวจรักษาโรคได้อย่างถูกต้อง และป้องกันอาการรุนแรงที่อาจจะเกิดขึ้นได้

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการของโรคติดเชื้อที่ดีที่สุดคือ การตรวจพบตัวเชื้อหรือชิ้นส่วนของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค การเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรคเลปโตสไปโรซิส ไม่ค่อยได้รับความนิยม เนื่องจากเชื้อเลปโตสไปราเป็น fastidious bacteria ที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ (EMJH medium)[4] ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 2-4 สัปดาห์ นอกจากนี้โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อได้จากเลือดผู้ป่วยค่อนข้างน้อย เพราะเชื้อเลปโตสไปราจะอยู่ในกระแสเลือดในช่วง 7-10 วันแรกของการติดเชื้อ จากนั้นจึงเดินทางไปอยู่ที่ไตบริเวณ convoluted tubules และสามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะผู้ป่วยในช่วงสัปดาห์ที่ 2-6 ของโรค การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเลปโตสไปราเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยในการวินิจฉัยโรค ซึ่งได้แก่ microscopic agglutination test (MAT)[5] ซึ่งเป็นวิธีมาตราฐานในการตรวจหาแอนติบอดี เพราะมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) แต่มีข้อเสียคือจะต้องใช้แอนติเจนที่เป็น live leptospira จำนวนหลายชนิดซึ่งจะยุ่งยากในการเตรียมและเก็บรักษาเชื้อที่จะใช้เป็นแอนติเจน, indirect immunofluorescence (IF)[6], indirect haemagglutination (IHA)[7], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[8], IgM dot ELISA[9] เป็นต้น แม้ว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเลปโตสไปราด้วยวิธีต่าง ๆ ที่มีการพัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะดียิ่งขึ้นก็ตาม แต่ปริมาณแอนติบอดีในร่างกายผู้ป่วยจะถูกตรวจพบได้หลังจากมีการติดเชื้อนานประมาณ 10 วัน

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคใหม่ล่าสุดในปัจจุบันที่นำมาตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค เป็นวิธีที่รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูงมาก โดยอาศัยหลักการของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA replication) ในหลอดทดลอง (in vitro) แบบซ้ำ ๆ กันหลายรอบ (repeated cycles) การศึกษาและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสด้วยเทคนิค PCR ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การตรวจหาชิ้นส่วนและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะสำหรับเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่ก่อให้เกิดโรค[14,15,19] (pathogenic leptospira) หรือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่มีความจำเพาะกับ 16S rRNA[13,18,23] ซึ่งเป็น conserved region ของ *Leptospira* หรือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละ serovar หรือบาง serovars ที่ใกล้เคียงกัน[16,17,23] โดยตรวจหาในสิ่งส่งตรวจชนิดต่าง ๆ จากผู้ป่วยหรือสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส ซึ่งพอจะรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ได้ดังนี้

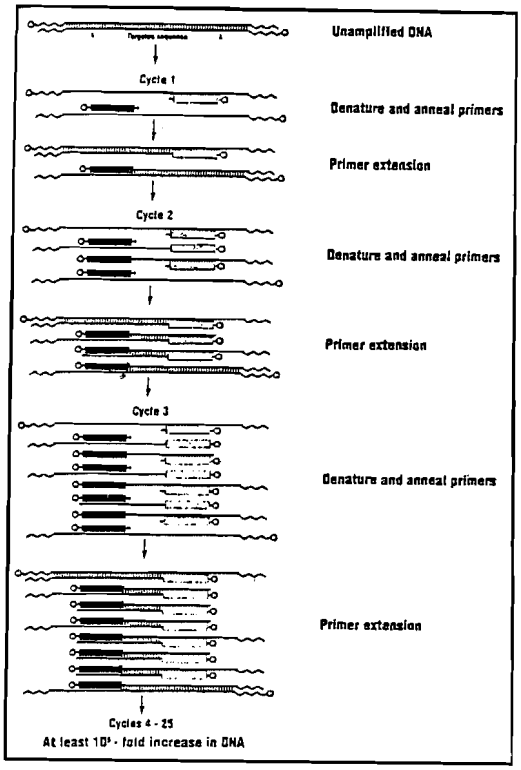
เทคนิค PCR ประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน[28]

1. Denaturation เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Single DNA) โดยอาศัยอุณหภูมิสูงประมาณ 90-95°C

2. Primer annealing เป็นปฏิกิริยาการเข้าจับของ primer 2 สาย กับ DNA template ที่เป็น single DNA โดยอาศัยอุณหภูมิประมาณ 50-60°C

3. Primer extension เป็นปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (ส่วนที่ต้องการ) โดยการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าทางปลาย 3' ของ primer โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่อุณหภูมิปานกลาง (72°C)

ขั้นตอนทั้งสามจะใช้เวลาเพียงสั้น ๆ เป็นนาที หรือส่วนของนาที และทำซ้ำปฏิกิริยา เป็นวงจร (cycle) ประมาณ 30-40 รอบ (ดังรูปที่ 1)



รูปที่ 1: หลักการของเทคนิค PCR

Primer และ PCR product

Primer ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ leptospiral DNA โดยเทคนิค PCR แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Primerที่มีลำดับของสายนิวคลิโอไทด์ที่มีความจำเพาะกับ *rrs* (16S rRNA) gene ของ Leptospira[13,18,22] ได้แก่ Primer A/B และ Primer C/D DNA sequences ที่สังเคราะห์ได้จาก primer A/B และ Primer C/D มีขนาด 331 และ 290 base pairs ตามลำดับ

A,5′ -^{38} G G C G G C G C G T C T T A A A C A T G^{57} -3′

B,5′ -^{348} T T C C C C C C A T T G A G C A A G A T T^{368} -3′

C,5′ -^{58} C A A G T C A A G C G G A G T A G C A A^{77} -3′

D,5′ -^{328} C T T A A C C T G C T G C C T C C C T A^{347} -3′

2. Primer ที่มีลำดับของสายนิวคลิโอไทด์ที่มีความจำเพาะกับ Pathogenic leptospiral gene[14,15,19] ได้แก่ Primer G1/G2 และ primer B64-I / B64-II ซึ่งเตรียมจาก recombinant plasmid pLIPs60 และ pBIM64 ตามลำดับ DNA sequence ที่สังเคราะห์ได้จาก primer G1/G2 มีขนาด 285 base pairs ส่วน target DNA ที่สังเคราะห์ได้จาก primer B64-I/B 64-II มีขนาด 563 base pair

G1, 5′-^{1} C T G A A T C G C T G T A T A A A A G T^{20} -3′

G2, 5′-^{226} G A A G G C T G G T A A A C A A A A G G^{285} -5′

B64-I,5′-^{1} A C T A A C T G A G A A A C T T C T A C^{20} -3′

B64-II,5′-^{554} A G T A T C C A A G C T G A A T T C C T^{563} -3′

3. Primer ที่มีลำดับของสายนิวคลิโอไทด์ที่มีความจำเพาะกับ leptospiral DNA แต่ละชนิด (serovar-specific) หรือในบาง serovars ที่ใกล้เคียงกัน[16,17,23] เช่น

3.1 Primer ที่จำเพาะกับ pLBEc 23s ซึ่งเตรียมจาก genomic library ของ *L. interrogans* serovar hardio, type hardjobovis, ชิ้นส่วน PCR ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 240 base pairs

5′-^{61} C G G T T C G T A A A A C G A G A C A A^{80} -3′

5′-^{280} A C T T T T C G C G A G C A A T A G C^{300} -3′

3.2 Primer (590-dir1/590-rev2) ที่จำเพาะกับ pL590 ซึ่งเตรียมจาก genomic library ของ *L.interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno ชิ้นส่วน PCR ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 570 base pairs

590-dir,5′-^{2} G T T G T C A G A G G T C T A A A C T G^{21}-3′

590-rev2, 5 -^{553} C G A A A C T C T G G C G A A T A T T T^{572}-3′

3.3 Primer (LP1/LP2) ที่จำเพาะกับ DNA sequence ของ *L.interrogans* ทุก serovars ที่พบได้ในประเทศเกาหลี ชิ้นส่วน PCR ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 274 base pairs.

LP1, 5′-^{1} A T A C A A C T T A G G A A G A C A T^{20} -3′

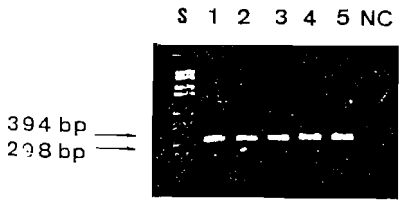
LP2, 5′-^{255} G C T T C T T T G A T A T A G A T C A A^{274} -3′

สิ่งส่งตรวจ (clinical specimen)

เชื้อเลปโตสไปราเข้าสู่ร่างกายโดยไชผ่านทางรอยขีดข่วนหรือบาดแผล ในระยะแรกเลปโตสไปราจะอยู่ในกระแสเลือดนานประมาณ 7 วัน จากนั้นจึงเดินทางไปที่ไตบริเวณ convoluted tubule ซึ่งเป็น target organ ดังนั้นการเก็บสิ่งส่งตรวจอย่างถูกต้องและเหมาะกับเวลาเพื่อตรวจหาตัวเชื้อหรือชิ้นส่วนของเชื้อจึงมีความสำคัญสำหรับการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส สิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่เป็นโรคที่ใช้ในการตรวจโดยเทคนิค PCR อาจเป็นเลือด[13,14,15,16,18] หรือ ปัสสาวะ[13,14,15,17,18] ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการผิดปกติของอวัยวะอื่นร่วมด้วย อาจจะสามารถตรวจพบเชื้อได้ในสิ่งส่งตรวจชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid)[13,18] หรือน้ำในตา (aqueous humor)[18]

ความจำเพาะ (specificity) และ ความไว (sensitivity)

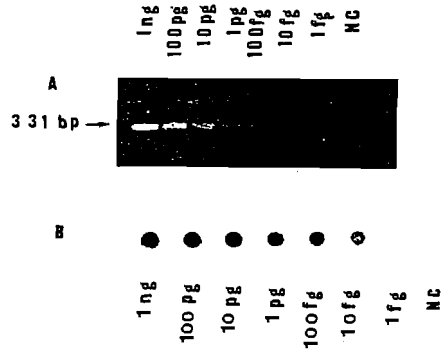
จากการศึกษาของ Merien F. และ คณะ[13] พบว่า oligonucleotide primer A/B ที่ใช้ในเทคนิค PCR มีความจำเพาะและสามารถเพิ่มจำนวน (amplify) leptospiral *rrs* (16S rRNA) gene ซึ่งมีขนาด 331 base pairs จาก pathogenic leptospira (20 serovars) (รูปที่ 2) และ non-pathogenic leptospira (*L. biflexa* serovar patoc) โดยตรวจดูขนาดของ target DNA fragment ด้วย agarose gel electrophoresis แต่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) จากแบคทีเรียอื่น ๆ เช่น *B. burgdorferi, B. hermsii, T. denticola, T. pallidum, S. aurantia, E. coli, Sh. flexneri, S. enteritis, P. mirabilis, K. pneumoniae, Streptococcus group D, S. aureus* และ *M. tuberculosis* อย่างไรก็ตามเคยมีรายงาน[20] การเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross-reaction) ของ serodiagnosis ระหว่าง *Leptospira spp.* และ *B. burgdorferi* ที่เป็นสาเหตุของ Lyme disease



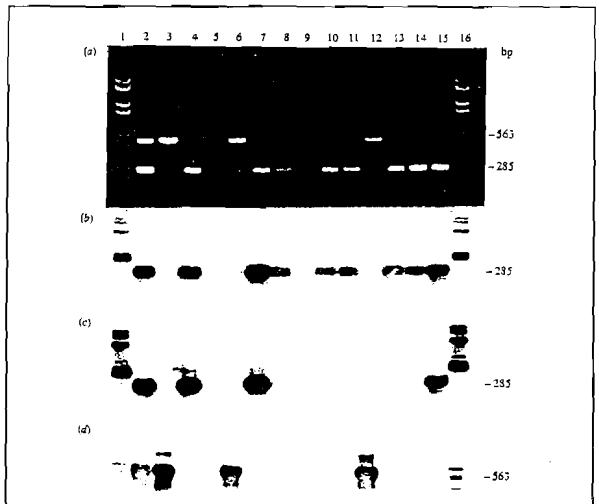
รูปที่ 2: Examples of PCR amplification of five *L. interrogans* serovars demonstrated by agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining. One nanogram of template DNA was used in the PCR (30 cycles with primer A/B). Lane : 1-5;*L.interrogans* serovar castellonis strain Castello 3 , serovar australis strain Ballico , serovar tarassovi strain Mitis Johnson , serovar bataviae strain Van Tienen , serovar sejroe strain M84 ,respectively ; NC , negative control without DNA ; S ,pBR328 cleaved with *Bgl* I and *Hinf* I used as a DNA size marker (in base pairs).

PCR เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจหา leptospiral DNA ในปริมาณ 1 พิโคแกรม และ 10 เฟ็มโตแกรม โดย agarose gel electrophoresis และ DNA-DNA hybridization ตามลำดับ ซึ่งเทียบได้เท่ากับจำนวนแบคทีเรีย 2 เซลล์ และสามารถตรวจพบ target DNA จากเลือดหรือปัสสาวะของผู้ป่วยรวมทั้งในน้ำไขสันหลัง (จากผู้ป่วยที่มีอาการ meningeal syndrome) และ aqueous humor (จากผู้ป่วย acute anterior uveitis associated with interstitial keratitis หรือ iridocyclitis) โดยตรวจ PCR signal ได้ในเลือดผู้ป่วยที่เริ่มมีการติดเชื้อ (วันที่ 2) แม้ว่าผู้ป่วยนั้นได้รับยาปฏิชีวนะแล้วก็ตามซึ่งโดยปกติแล้วในระยะนี้จะไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี เพราะยาปฏิชีวนะมีผลทำให้การสร้างแอนติบอดีลดลง[21]

ในปี 1993 Gravekamp C. และคณะได้ทำการศึกษาด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization พบว่า pLIPs 60 ซึ่งเป็น recombinant clone ของ *L.interrogans* serovar icterohae-morrhagiae strain RGA มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของ pathogenic leptospira ทุก species ตามที่ Yasuda และ คณะ[1] จำแนกชนิดของ Leptospira ไว้ ยกเว้น *L. kischneri* ซึ่งจะให้ปฏิกิริยาจำเพาะกับ pBIM64 recombinant clone ของ *L. kirschneri* serovar bim strain 1051 เมื่อนำ primer G1/G2



รูปที่ 3: Comparison of sensitivity of the PCR assay (30 cycles with primer A and B) for purified *L. interrogans* serovars icterohaemorrhagiae strain 140 DNA after agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (A) and dot blot hybridization with a digoxygenin labeled probe(B). The amount of DNA used in each PCR are shown above and below the lanes. NG , Negative control without DNA.



รูปที่ 4: (a) Agarose gel electrophoresis (2 % w/v) of PCR products obtained from various strains of pathogenic and non-pathogenic leptospira species using primer G1/G2 and B64-I/B64-II. Lanes: 1 , molecular mass markers ; 2 , mixture of DNA from *L interrogans* serovar copenhageni strain M20 and *L. kirschneri* strain 1051 (positive control) ; 3, DNA from *L noguchii* strain 1161U ; 14 , *L. borgpetersenii* strain Mus127 ;15 , *L. interrogans* serovar bratislava strain Jez Bratislava ; and 16 , molecular mass markers. DNA fragments of 285 base pairs are PCR products generated with G1/G2 primer , 563 base pairs fragments are generated with B64-I/B64-II primer. Hybridization was an amplicon DNA probe derived from strain Wijnberg under low (b) and high (c) stringency conditions and from members strain 1051 under high stringency (d) with PCR products various (รูปที่ 4 a) of pathogenic and non-pathogenic leptospira species.

ที่เลือกมาจาก pLIPs60 มาใช้กับเทคนิค PCR พบว่าสามารถตรวจสอบ และ amplified leptospiral DNA ขนาด 285 base pairs ของ pathogenic leptospira ทุก species ยกเว้น *L.kirschneri* ที่ถูก amplified ด้วย primer B64-I/B64-II ที่เตรียมจาก pBIM64 และถ้าใช้ primer G1/G2, B64-I/B64-II ร่วมกันจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ pathogenic leptospira ได้ทุกชนิด (รูปที่ 4 a) นอกจากนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *L. meyeri* strain ICF ซึ่งจัดเป็น non-pathogenic leptospira (ตามการจัดกลุ่มของ Yasuda) ด้วย ผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาของ Hookey ในปี 1992[23] จึงเห็นได้ว่าการจัด *L.meyeri* ทุกสายพันธุ์เป็น non-pathogenic leptospira ตาม Yasuda ยังคงสรุปเป็นที่แน่นอนไม่ได้ การจำแนกชนิดของเลปโตสไปรานี้ขัดแย้งกับ International Committee on Systemic Bacteriology, Subcommittee on Taxonomy of Leptospira ที่จัด *L. meyeri* strain ICF เป็น pathogenic leptospira และ strain Veldrat Semarang 173 เป็น non-pathogenic leptospira

แต่อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR ของ Gravekamp สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ non-pathogenic leptospira (*L.inadia* strain 10 และ *L. meyeri* strain Veldrat Semarang 173) ที่มีขนาด 285 basepairs เช่นกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่ DNA fragment นี้ไม่ทำปฏิกิริยากับ specific probe ของ pathogenic leptospira ในทำนองเดียวกัน probe ที่เตรียมจาก G1/G2 generated PCR product ของ pathogenic *L. interrogans* strain Wijnberg จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับ PCR product ที่ได้จาก pathogenic *L. interrogans* บาง serovars เท่านั้น เช่น icterohaemorrhagiae, copenhageni และ bratislava (รูปที่ 4 c) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า DNA sequence ของ PCR product ที่เกิดขึ้นจากแต่ละสายพันธุ์ของ pathogenic leptospira อาจจะมีความแตกต่างกันบ้าง (DNA polymorphism) แม้ว่าจะสร้างมาจาก primer ชุดเดียวกันก็ตาม

เทคนิค PCR นี้สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราได้ในปริมาณ 1-10 เซลล์ในน้ำเหลืองผู้ป่วย 1 มิลลิลิตร และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อจากเลือดผู้ป่วยที่สงสัยโรคเลปโตสไปโรซิส 79 ตัวอย่างพบว่า PCR ให้ผลบวก 39 ตัวอย่าง (50 %) ในขณะที่เพาะเชื้อเลปโตสไปราได้ 28 ตัวอย่าง (35 %) (ตารางที่ 1) ในทางตรงกันข้าม PCR ให้ผลลบจากการตรวจเลือดของคนปกติและผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่นๆ รวม 80 ราย ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พอจะสรุปได้ว่า PCR เทคนิคที่ใช้ primer G1/G2 และ B64-I/B64-II เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะมาก สามารถตรวจหา pathogenic leptospira ทุก serovars ที่เป็นสาเหตุของโรค

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลของ PCR กับ การเพาะเชื้อ (culture) เลปโตสไปราจากเลือดผู้ป่วย

	PCR		
	Positive	Negative	Total
Culture positive	20	8	28
Culture negative	19	32	51
Total	39	40	79

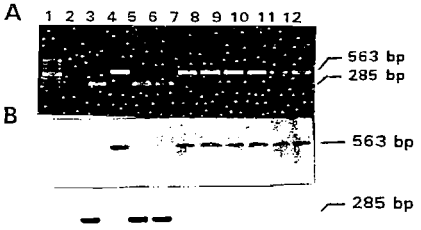
ในปี ค.ศ.1995 Bal A.E. และคณะได้นำเทคนิค PCR ที่ใช้ primer G1/G2 และ B64-I/B64-II ไปประยุกต์ใช้ตรวจหา specific leptospiral DNA ในปัสสาวะผู้ป่วยพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในปริมาณ 1-10 เซลล์ในปัสสาวะ 1 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) ซึ่งมีความไวเท่ากับการตรวจในน้ำเหลืองผู้ป่วยที่ศึกษาโดย

รูปที่ 5: Threshold of detection of leptospires in urine by PCR. DNA was extracted from the pellets of serial dilution of urine samples that was seeded with *L.interrogans* strain Wijnberg. PCR products were generated with primer G1/G2. Southern blot analysis was performed by using DIG-labeled oligonucleotides G195-28 as the probe. Lanes: 1-8 , serial dilution in urine containing 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 , 1 and 10^{-1} leptospire (s)/ml respectively ; 9 , negative control urine sample. Similar results were obtained with urine samples seeded with *L. kirschneri* duyster by using primer B64-I/B64-II for PCR amplificatio and oligonucleotide B88-29 as a probe.

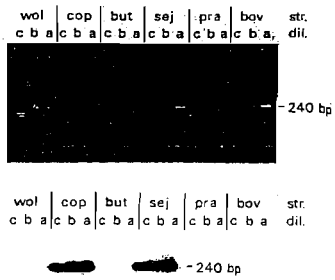
Gravekamp ในปี ค.ศ. 1993 และได้ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคนี้กับการเพาะเชื้อจากปัสสาวะผู้ป่วย ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า PCR เทคนิคให้ผลบวก (12/15) มากเป็น 2 เท่าของผลการเพาะเชื้อ (6/15) และเทคนิคนี้สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในปัสสาวะ 26 ตัวอย่างจาก 29 ตัวอย่าง (90%) โดยที่ปัสสาวะ 2 ใน 26 ตัวอย่างเก็บหลังจากมีการติดเชื้อนานกว่า 1 ปี และ 6 ใน 26 ตัวอย่างเป็นปัสสาวะจากผู้ป่วยที่ได้รับยา จึงเห็นได้ว่า PCR เทคนิคนี้มีประโยชน์สำหรับช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิส แม้ว่าผู้ป่วยจะได้รับยาแล้ว และอาจจะมีประโยชน์ช่วยติดตามผลการรักษาได้ อย่างไรก็ตามจากผลที่ได้พบว่าปัสสาวะ 1 ตัวอย่างที่เพาะเชื้อได้ให้ผลลบด้วยเทคนิค PCR ทั้งนี้เนื่องจาก leptospira ที่เป็นสาเหตุของโรคในผู้ป่วยรายนี้ที่เพาะเชื้อได้คือ *L.wrilii* strain Celledoni ซึ่งเป็น strain ที่ให้ผลบวกแบบไม่ชัดเจน (weakly positive) เมื่อถูก amplified ด้วย Primer G1/G2 และ B64-I/B64-II

ในปีเดียวกัน Brown P.D. และคณะ ได้นำเทคนิคเดียวกันนี้ตรวจหา leptospiral DNA ในเลือด และปัสสาวะของผู้ป่วย (รูปที่ 6) เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อปรากฏว่า PCR เทคนิคให้ผลบวก 62% (44/71 ราย) การเพาะเชื้อให้ผลบวก 48% (34/71 ราย) โดยที่ 13 ใน 44 ราย ตรวจพบ PCR product ก่อนที่จะตรวจพบแอนติบอดี และ 2 รายตรวจไม่พบแอนติบอดีจนกระทั่งผู้ป่วยเสียชีวิต

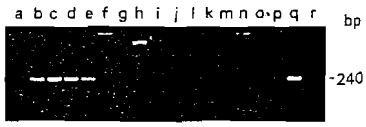
Van Eys G. J. J. M. ศึกษาเทคนิค PCR โดยเลือก primer ที่เตรียมจาก clone pLBEc 23s ของ *L. interrogans* serovar hardjo (type hardjobovis) ซึ่งเป็น clone ที่มีความจำเพาะอย่างมากกับ homologous serovar และ serovars balcanica, sejroe, plonica, dikkeni, nyanza และ saxkoebing ด้วยวิธี Southern blot analysis ผลของ PCR product จากขบวนการ primer annealing และ DNA extension ซึ่งมีขนาด 240 base pairs เกิดขึ้นอย่างชัดเจนและมีความจำเพาะกับ target DNA ของ *Leptospira* serovar hardjo type hardjobovis และ serovars ใกล้



รูปที่ 6: Agarose gel electrophoresis (A) and southern blot (B) analysis of PCR amplification of DNA extracted from serum and urine samples using primer G1/G2 (285 bp. product) or B64-I/B64-II (563 bp. product). Lane 1 , mol.wt. marker (mixture of digests : pUC BM 21.*Hpa* II and pUC MB21.*Dra* I + *Hind* III ; Boehringer Mannheim); 2 ,blank (no DNA) ; 3 , DNA from copenhageni amplified by using primer G1/G2; 4 , DNA from bim amplified by using primer B64-I/B64-II ; 5 and 6 , DNA from samples amplified by using primer G1/G2 ;7-12 , DNA from samples amplified by using primer B64-I/B64-II. Southern blot hybridization (at 55 c) using DIG- labeled oligonucleotide probes derived from the PCR fragments generated by primer G1/G2 or by primer B64-I/B64-II.

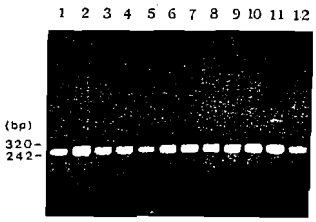


รูปที่ 7: Agarose gel electrophoresis of PCR amplification of several serovar DNAs and their Southern blot analysis using pLBEc 23s as probe. Serial dilution (10 [a] , 1 [b] , and 0.1 [c] ng) of DNAs were subjected to PCR. Bands on the agarose gel are weak for serovar wolffi (wol) and hardjo type hardjoprajitno (pra). No bands were observed for serovars copenhageni (cop) and butembo (but), belonging to serogroup Icterohaemorrhagiae and autumnalis , respectively. Relatively strong bands on the agarose gel are observed for serovar hardjo, type hardjobovis (bov) and sejroe (sej.). A strong hybridization is found only for hardjobovis and the closely related serovar sejroe. bp. Base pairs ; str. strain ; dil. , dilution.



รูปที่ 8: Agarose gel electrophoresis of PCR amplification . DNAs isolated from *Leptospira* serovara hardjo , type hardjobovis (two isolated : b and e) , sejroe (two isolated ,d and e) , and balcanica (q) , and on bacteria other than leptospires :(f)*Mycobacterium bovis* , (g) *M. avium* , (h) *M. peregrinum* , (i) *E. coli* , (j) *Salmonella* sp. group B , (k) *Y. enterocolitica* , (l) *S. pneumoniae* , (p) *Treponema reiteri*. Lanes (a and r) were negative controls. The high band observed for *M. peregrinum* is more thean 1 kilobase in size and dose not hybridize with pLBEc 23s.

เคียงอย่างเช่น balcanica และ sejroe แต่ให้ PCR product อย่างไม่ชัดเจนหรือไม่เกิดขึ้นเมื่อ target DNA เป็น *Leptospira* serovars อื่นรวมทั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วย แม้ว่าจะเพิ่มปริมาณของ target DNA มากขึ้นเป็น 100 เท่า (10 นาโนแกรม) (รูปที่ 7 และ 8) เมื่อนำเทคนิค PCR ที่พัฒนาได้ไปตรวจหาเชื้อในปัสสาวะของวัวที่ป่วยเป็นโรค (*Leptospira* serovar hardjo type hardjobovis เป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อโรคเลปโตสไปโรซิสในวัว) พบว่าให้ผลบวกจากทุกตัวอย่างตรวจที่เพาะเชื้อขึ้นหรือตรวจพบแอนติบอดี การศึกษาของ Van Eys อยู่ในระยะของการพัฒนาเทคนิค PCR มาช่วยวินิจฉัยโรคเลปโสดไปโรซิส ซึ่งจะเห็นได้ว่า primer ที่เลือกใช้ค่อนข้างมีความจำเพาะเฉพาะกับ homologous serovar ที่ใช้เตรียม primer หรือ serovars ที่ใกล้เคียงเท่านั้น ไม่ครอบคลุมทุก serovars

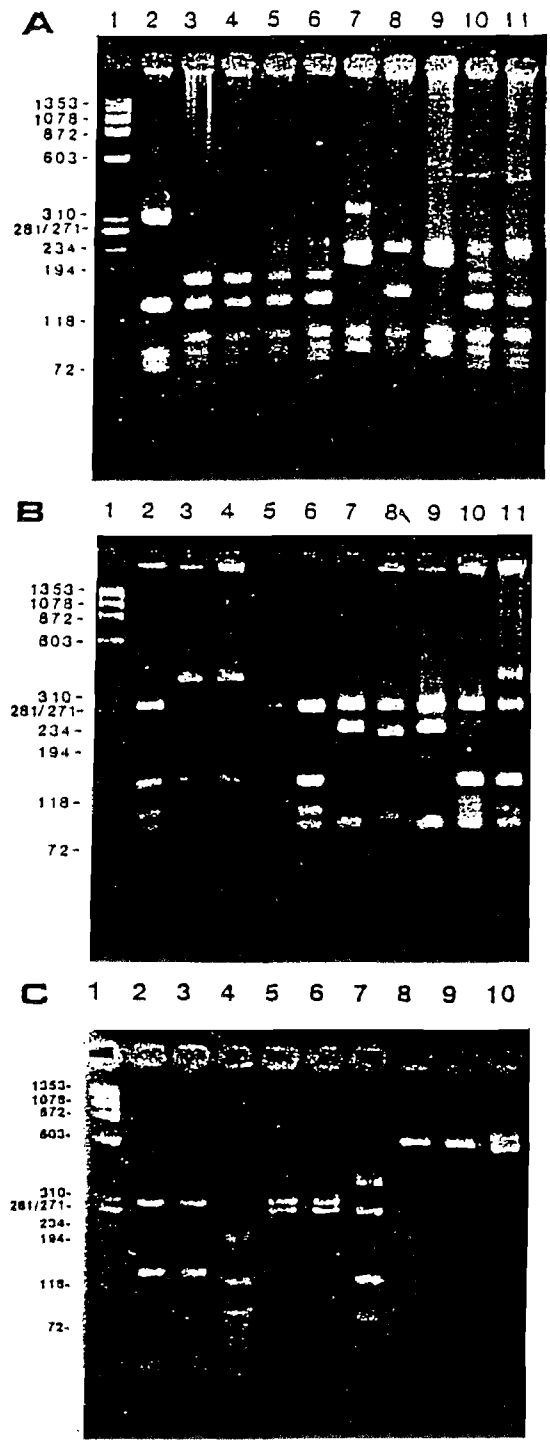


รูปที่ 9: PCR amplification of the target DNA from 12 strains of *L. interrogans* isolated in Korea. Lanes : 1, WH20 ; 2 ,HY20 ; 3, HM4 ; 4 ,KH1 , 5, KH2 ; 6 , HH14; 7 , 22R; 8, AP3 ; 9 , HM3 ; 10 , 18R ; 11 , 30R ; 12 ,HS7.

ที่ก่อให้เกิดโรค จึงอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับนำไปช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อเลปโตสไปราหลากหลายชนิด

ในปี ค.ศ. 1994 Sun-Ho Kee ตรวจหา leptospiral DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยเลือก primer LP1/LP2 ที่เตรียมจาก highly conserved DNA ของ *L. interrogans* serogroup icterohaemorrhagiae serovar lai WH20 โดยมุ่งหวังว่า primer LP1/LP2 นี้จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *L. interrogans* ทุกชนิดที่พบในประเทศเกาหลี (จนถึงปี ค.ศ. 1992) ผลงานวิจัยนี้บรรลุวัตถุประสงค์ เนื่องจาก primer LP1/LP2 นี้สามารถให้ PCR product ขนาด 274 base pairs จากการตรวจหาดีเอ็นเอของ *L. interrogans* 12 ชนิดที่พบในประเทศเกาหลี (รูปที่ 9) และให้ PCR product ขนาดเดียวกันในการทดสอบกับ 14 serogroups จาก 17 serogroup reference strains, 11 ใน 15 serovar reference strains ของ serogroup icterohaemoorrhagiae และ 3 ใน 6 serovar reference strains ของ serogroup canicola แต่ไม่พบ PCR product เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เมื่อนำ PCR เทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้สามารถตรวจพบเชื้อเลปโตสไปราในเลือดสัตว์หลังจากติดเชื้อได้ 2 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ยังไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี จึงพอสรุปได้ว่า primer LP1/LP2 ชุดนี้มีความจำเพาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *L. interrogans* มีประโยชน์ช่วยวินิจฉัยโรคเลปโตส-ไปโรซิสที่เกิดในประเทศเกาหลีได้อย่างถูกต้อง

ในปีเดียวกัน Savio M.L. และคณะได้พัฒนาเทคนิค PCR เพื่อตรวจหา target DNA ของ *L. interrogans* โดยเลือก primer 590-dir 1/590-rev2 ที่เตรียมจาก recombinant clone ของ genome *L. interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno primer ชุดนี้มีความจำเพาะและสามารถเพิ่มปริมาณ leptospiral DNA ในส่วนของ fragments 'e' (ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วย repetitive sequences เป็นส่วนใหญ่) ของ *L. interrogans* serovar australis, bratislava, lora, pomona, icterohaemorrhagiae, copenhageni, bataviae, canicola, canicola, zanoni, trarssovi และ hardjo (type hardjobovis) PCR product ที่สร้างขึ้นประกอบด้วย 1 หรือ 2 แถบ (band) ที่มีขนาดประมาณ 570 base pairs แต่ไม่ให้ PCR product เมื่อทดสอบกับ serovars castellonis, javanica, mini, saxkoebing, cynopteri, grippotyphosa, gorgas และ shermani ตลอดจน nonpathogenic *L. biflexa* (serovar andamana) และแบคทีเรียชนิดอื่นๆในงานชนิดเดียวกันนี้ Savio ได้ผสมผสานเทคนิค PCR เข้ากับ restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis เข้าด้วยกันเพื่อประโยชน์ในการตรวจหา leptospiral DNA และศึกษา DNA polymorphisms ทำให้สามารถจำแจกชนิดของเชื้อเลปโตสไปราที่ตรวจพบได้จากสิ่งส่งตรวจ



รูปที่ 10: (A and B) Gel electrophoresis performed in 4 % Nusieve (FMG) agarose gel of PCR- amplified products from serovars australis (lane 2) , bratislava (lane 3) , lora (lane 4) , icterohaemorrhagiae (lane 5) , copenhageni (lane 6) , pomona (lane 7) , bataviae (lane 8) , canicola (lane 9) , zanoni (lane 10) and hardjo type hardjoprajitno (11) . The samples were digested with either *Hinf* I (A) or *Dde* I (B). (C) Gel electrophoresis performed in a 4 % Nusieve (FMC) agarose gel of PCR products from serovars hardjo type hardjobovis (lanes 2,5 and 8) , tarassovi (lane 3,6 and 9) and hardjo type hardjoprajitno (lane 4,7 and 10). The samples were digested with *Hinf* I (lane 2,3 and 4) or *Dde* I (lane 5, 6 and 7) or were left undigested (lane 8, 9 and 10). *Hae* III-digested bacteriophage x174 DNA marker was loaded onto the first lane of each gel.

โดยนำ PCR products มาย่อยด้วย restriction enzymes ชนิดต่างๆ พบว่าการย่อยด้วย *Hinf I* จะให้ DNA polymorphic profiles ที่แตกต่างกัน 6 รูปแบบ คือ รูปแบบเฉพาะสำหรับ serovars australis, pomona, canicola, bataviae, zanoni และ hardjo type hardjoprajitno และรูปแบบที่ 7 ที่จำเพาะกับ serovars lora, bratislava, icterohaemorhagiae และ copenhageni (รูปที่ 10 A) ในทำนองเดียวกันถ้าย่อยด้วย *Dde I* จะได้ 4 DNA polymorphic profiles คือ serovars australis, bataviae, zanoni และ hardjo type hardjoprajitno และอีก 3 รูปแบบร่วมกันของ serovars

bratislava กับ lora, icterohaemorrhagiae กับ copenhageni และ pomona กับ canicola (รูปที่ 10 B)

ต่อมา Savio ได้นำเทคนิค PCR และ RELPs มาทดลองศึกษากับเชื้อเลปโตสไปรา 25 strains ที่แยกได้จากไตของหมูที่ป่วยเป็นโรคและได้พิสูจน์เชื้อแล้วว่าเป็น *L. interrogans* serovar pomona โดย Southern blot และ monoclonal[25] พบว่าเชื้อเลปโตสไปราทั้ง 25 strains มี DNA profile เหมือนกับ *L. interrogans* serovar pomona Mezzano 1 reference strain จึงเห็นได้ว่างานของ Savio น่าสนใจและมีประโยชน์อย่างมากเพราะเป็นการรวมเอาเทคนิค PCR ที่มีความไวและความจำเพาะสูงกับเทคนิค RFLPs ที่สามารถแยกชนิดของเชื้อเลปโสตไปราด้วย DNA polymorphism เข้าด้วยกัน ทำให้ทั้งสองเทคนิคนี้มีประโยชน์สำหรับวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในขณะเดียวกันสามารถศึกษาระบาดวิทยาของโรคที่เกิดขึ้น

สรุป

เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูง สามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราได้ในระดับ 1-10 เซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร การเลือกใช้ primer แต่ละชนิดมีความสำคัญขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการตรวจในแต่ละพื้นที่ว่า primers นั้นสามารถครอบคลุมการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราทุกชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคหรือไม่ ข้อดีของเทคนิค PCR นอกจากจะมีความไวและความจำเพาะสูง ยังสามารถตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราที่เป็นสาเหตุของโรคเลปโตสไปโรซิสได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยหรือสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคในช่วงระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งระยะนี้ไม่สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อตัวเชื้อและการได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาโรคเลปโตสไปโรซิสไม่มีผลต่อการตรวจด้วยเทคนิค PCR แต่อย่างไรก็ตาม ข้อพึงระวังที่เป็นปัจจัยสำคัญอย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือการเลือกเก็บชนิดของสิ่งส่งตรวจอย่างถูกต้องเหมาะสมกับเวลาที่มีอาการของโรค (localization ของเชื้อในร่างกาย) นอกจากนี้การประยุกต์เอาเทคนิค PCR และ RFLPs เข้าด้วยกันน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเสริมให้เทคนิค PCR มีประโยชน์มากยิ่งขึ้นสำหรับการวินิจฉัยโรคเลปโตสไปโรซิสในระยะเริ่มแรกพร้อมทั้งศึกษาระบาดวิทยาของโรคในเวลาเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira species*. Int J Syst Bacteriol 1987 ; 37 : 407-15.
2. Waikins SA. Update on leptospirosis. Br Med J 1985 ; 290 : 1502-3.
3. Sitprija V, Moolaor P, Suwangool P, Charoonruangrit S. Leptospirosis : Clinical manifestations and pathogenesis. proceeding international symposis : Seoul, 1985.
4. Johnson RC, Harrsis VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires I : Growth at low temperature. J Bacteriol 1967 ; 94 : 27-31.
5. Faine S. Guidelines for leptospirosis control : Geneva, 1982.
6. Torten M, Shenberg E, Van der Hoeden J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by a genus-specific antigen. J Infect Dis 1966 ; 116 : 537-43.
7. Palit A, Gulasekharm J. Genus-specific leptospiral antigen and its possible use in laboratory diagnosis. J Clin Pathol 1973 ; 26 : 7-16.
8. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ. ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. J Gen Microbiol 1985 ; 131 : 377-85.
9. Pappas MG, Ballon WR, Gray MR, Takafuji ET, Miller RN, Hockmeyer WT. Rapid serodiagnosis of leptospirosis using the IgM-specific dot ELISA : Comparison with the microscopic agglutination test. Am J Trop Med Hyg 1985 ; 34 (2) : 346-54.
10. Deamler GJ, Buffone J, Schimbor CM, May RA, Detection of cytomegalovirus in urine from newborn by using polymerare chain reaction DNA amplification. J Infect Dis 1988 ; 158 : 1177-85.
11. Hay PE, Clarke JR, Strugne RA, Taylor-Robinson D, Goldheimer D. Use of the polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. FEMS Microbiology Letters 1990 ; 68 : 428-32.
12. Hartskeerl RA, De Wit MYL, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol 1989 ; 135 : 2357-64.
13. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in Clinical samples. J Clin Microbiol 1992 ; 30 (9) : 2219-2224.
14. Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, et al. Evaluation of the polymerase chain rection for early diagnosis of Leptospirosis. J med Microbiol 1995 ; 43 : 110-4.
15. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ. Detection of leptospirosis in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 1894-98.
16. Kee S, Kim I, Choi M, Chang W. Detection of Leptospiral DNA by PCR. J Clin Microbiol 1994 ; 32 (4) : 1035-39

17. Van Eys GJJM, Gravekamp C, Geritsen MJ, et al. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989 ; 27 (10) : 2258-62.
18. Merien F, Baranton G, Perolat P. Comparion of polymease chain reaction with microagglutination test and colture for diagnosis of Leptospirosis. JID 1995 : 172 : 281-5.
19. Gravekamp C, Van de kemp H, Franzen M, et al. Detection of sev en species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J Gen Microbiol 1993 ; 139 : 1691-700.
20. Raoult D, Hechemy KE, Baranton, Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis, and leptospirosis. J Clin Microbiol 1989 ; 27 : 2152-5.
21. Feigin RD, Anderson DC. Human leptospirosis. CRC Crit Rew Clin Lab Sci 1975 ; 5 : 413-67.
22. Hookey JV. Detection of Leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. FEMS Microbiology Letters 1992 ; 90 : 267-74.
23. Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML. Detection and identiication of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Clin Microbiol 1994 ; 32 (4) : 935-41.
24. เพทาย เย็นจิตโสมนัส. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR. ใน : วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และ มนตรี อัตถทิพพหลคุณ : ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว, 2536 ; 57-64.
25. Savio ML, Paceiarini ML, Cinco M, Tagliabue S. Identification of *Leptospira interrogans* strains by monoclonal antibodies and genomic analysis. Microbiologica 1993 ; 16 : 315-22.