

**CHARACTERIZATION OF *Leptospira* SEROVARS BY
PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS**

PATCHAREE PRASAJAK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2006

ISBN 974-04-7359-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาลักษณะของซีโรวารของเชื้อเลปโตสไปราโดยวิธี PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS
(CHARACTERIZATION OF *Leptospira* SEROVARS BY PULSED-FIELD GEL
ELECTROPHORESIS)

พัชรี ปราศจาก 4636427 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อุไรวรรณ โฉมิตานนท์, Ph.D., สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, Ph.D.,
ดวงพร พูลสุขสมบัติ, M.Sc.

บทคัดย่อ

เลปโตสไปโรซิสเป็นโรคซึ่งเกิดจากเชื้อเลปโตสไปราชนิดก่อโรคโดยมีสัตว์เป็นพาหะ โรคนี้เป็นโรคเฉพาะถิ่นโรคหนึ่งในประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อสืบค้นการแพร่กระจายของเชื้อเลปโตสไปราจากหนูสู่คนในช่วงการระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปีพ.ศ. 2542-2543

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* สามารถจำแนกลักษณะของเชื้อเลปโตสไปรา 27 ซีโรวารได้เป็น 26 แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และมีความสามารถในการจำแนกซีโรวารเท่ากับ 0.99 แต่ละซีโรวารใน 27 ซีโรวารให้แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเฉพาะ ยกเว้นซีโรวาร Copenhageni และ Icterohaemorrhagiae ซึ่งพบว่ามีแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกัน

เชื้อทุกตัวอย่างจากหนูซึ่งได้จำแนกด้วยวิธีทาง serology นำมาจำแนกต่อไปด้วยวิธี PFGE เชื้อ 40 ตัวอย่างประกอบด้วย 2 ตัวอย่างซีโรวาร Australis, 4 ตัวอย่างซีโรวาร Autumnalis, 8 ตัวอย่างซีโรวาร Bataviae และ 26 ตัวอย่างซีโรวาร Pyrogenes แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อเลปโตสไปราที่แยกได้จากหนูพบว่ามี 5 แบบ แบบที่ I, II และ III เป็นแบบของซีโรวาร Pyrogenes, Bataviae, Autumnalis ตามลำดับ แบบ IV & V เป็นแบบของซีโรวาร Australis แบบ I คล้ายกับเชื้อซีโรวาร Pyrogenes strain Salinem ที่แยกได้จากผู้ป่วย ที่ similarity ร้อยละ 70 แบบ II ซึ่งเหมือนกับเชื้อซีโรวาร Bataviae strain Van Tienam สายพันธุ์มาตรฐาน ที่ similarity ร้อยละ 100 แบบ III พบว่าไม่เหมือนกับ ซีโรวาร Autumnalis strain Akiyami A สายพันธุ์มาตรฐาน ที่ similarity ร้อยละ 28 แบบ IV และ V พบว่าไม่เหมือนกับ ซีโรวาร Australis strain Ballico สายพันธุ์มาตรฐาน ที่ similarity ร้อยละ 37 แสดงให้เห็นว่า เชื้อซีโรวาร Autumnalis ในหนูไม่ใช่ strain Akiyami A เช่นเดียวกันกับเชื้อซีโรวาร Australis ในหนูไม่ใช่ strain Ballico ซึ่งไปกว่านี้พบว่าเชื้อซีโรวาร Autumnalis, Bataviae และ Pyrogenes ที่แยกได้จากหนูต่างก็มี clone ที่ให้ลักษณะเฉพาะต่อซีโรวารอื่นๆ ยกเว้นในซีโรวาร Australis พบว่ามี 2 clones ที่แตกต่างกัน

ผลการทดสอบโดย PFGE ให้ผลสอดคล้องกับวิธี ribotyping ร้อยละ 100 นอกจากนี้ยังพบว่าแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของซีโรวาร Pyrogenes และ Autumnalis ที่แยกได้จากหนูมีแบบที่เหมือนกันกับเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยเลปโตสไปโรซิส แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีการกระจายของเชื้อเลปโตสไปราที่ก่อโรคได้ในกลุ่มหนูซึ่งเป็นแหล่งรังโรคสำหรับถ่ายทอดเชื้อเลปโตสไปราสู่คนได้ในช่วงระบาด

ผลสรุป PFGE เป็นวิธีการศึกษาด้านอนุพันธุศาสตร์ที่มีประโยชน์เพื่อใช้ในการจำแนกความแตกต่างของ clone ที่พบในแต่ละซีโรวารของเชื้อเลปโตสไปรา นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาได้เช่นเดียวกัน

CHARACTERIZATION OF *Leptospira* SEROVARS BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS

PATCHAREE PRASAJAK 4636427 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS : URAIWAN KOSITANONT, Ph.D.,
SUWANNA TRAKULSOMBOON, Ph.D., DUANGPORN PHULSUKSOMBATI, M.Sc.**ABSTRACT**

Leptospirosis is a wide spread zoonotic disease caused by pathogenic leptospire. This disease is endemic in certain regions, especially in the northeastern region of Thailand. The aim of this study was to investigate the clonal spread of leptospire from rats to humans during the outbreak in the northeastern region of Thailand in 1999-2000.

NotI restriction enzyme successfully differentiated 26 PFGE patterns from 27 serovars. The discriminatory power of these strains was 0.99. Each of the 27 serovars gave a unique pattern, except serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae, which had the same pattern. In addition, all strains had an individual single clone.

All rat isolates were identified by serotypic methods and further characterized by PFGE. The Forty rat isolates consisted of 2 isolates as serovar Australis, 4 isolates as serovar Autumnalis, 8 isolates as serovar Bataviae and 26 as serovar Pyrogenes. Fingerprints of these isolates showed 5 major patterns. Patterns I, II and III were produced for serovars Pyrogenes, Bataviae and Autumnalis. Patterns IV and V were yielded by serovar Australis. Pattern I was similar to serovar Pyrogenes strain Salinem from human isolate, at 70% similarity, and pattern II was similar to reference serovar Bataviae strain Van Tienam, at 100% similarity. Patterns III and IV & V were different from reference serovars Autumnalis strain Akiyami A, at 28% similarity, and Australis strain Ballico, at 37% similarity, respectively. These findings indicated that serovars Autumnalis and Australis among rat isolates were not strains Akiyami A and Ballico, respectively. Moreover, the findings revealed that rat isolates of serovars Autumnalis, Bataviae and Pyrogenes each have their own clone circulating among field rats, excluding serovar Australis which was found to have 2 distinct clones.

The results of serovar characterization among 40 rat isolates by PFGE and ribotyping showed 100% concordance. In addition, the same banding patterns of serovars Pyrogenes and Autumnalis of leptospire isolated from field rats and from human leptospirosis cases were observed. This suggested that there was a clonal spread of pathogenic leptospire among field rats, and field rats may have served as reservoirs for transmission of leptospire to humans during the outbreak.

In conclusion, PFGE is a powerful tool for differentiating clonal difference between *Leptospira* serovars. Moreover, this technique can be used in epidemiological studies as well.

KEY WORDS : LEPTOSPIRA / SEROVAR CHARACTERIZATION / PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS / RIBOTYPING

85 P. ISBN 974-04-7359-8