

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
LEPTOSPIRA SPECIES ISOLATES IN THAILAND**

PIYADA WANGROONGSARB

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2006

ISBN 974-04-7025-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเลปโตสไปราในประเทศไทยโดยเทคนิคอณูชีววิทยา
(MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA* SPECIES ISOLATES IN THAILAND)

ปิยะดา หวังรุ่งทรัพย์ 4537227 TMTM/D

ปร.ด (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ชาริรัตน์ กะลัมพะเหติ, Ph.D. (MICROBIOLOGY),
วิภาวี จำปาเงิน Ph.D Med Sc., ยูวดี มหาคุณกิจเจริญ, Ph.D. (PATHOLOGY,
MICROBIOLOGY, AND IMMUNOLOGY)

บทคัดย่อ

การพัฒนาทางอณูชีววิทยาเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เลปโตสไปรา นั้นได้พบว่าแอนติเจนที่สำคัญของเลปโตสไปราคือไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยเฉพาะ O-antigen ที่เกี่ยวข้องกับการจำแนก serogroup การศึกษา 16SrRNA และ *orf14* ยีนที่อยู่ใน *rfb* locus ซึ่งมีหน้าที่เป็น O-Ag polymerase การศึกษาทั้งสองยีนนี้ใช้วิธี PCR-RFLP และหาลำดับเบสจาก PCR product ซึ่งที่เพาะเลี้ยงจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและไตของหนูจะนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อเลปโตสไปรามาตรฐาน ผลการศึกษาของ 16SrRNA PCR-RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI*, *HpaII* และ *orf14* PCR-RFLP ตัดด้วยเอนไซม์ *AluI*, *DraI* นำมาคำนวณด้วยโปรแกรม Gene tool และ Gene directory (Syngene Co.Ltd.) และ binary data มาคำนวณโดยใช้โปรแกรม PHYLIP 3.6 (2001) การศึกษาพบว่าผลของวิธี *orf14* PCR-RFLP ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อเลปโตสไปราได้ดีกว่าวิธี 16SrRNA PCR-RFLP เนื่องจากวิธี PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่ง่ายใช้ DNA น้อยเหมาะสำหรับเชื้อที่เจริญเติบโตช้าและการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างยากแต่ก็ยังมีข้อจำกัดเรื่องคุณสมบัติของเอนไซม์ สำหรับผลของการหาลำดับเบส 16SrRNA ยีนสามารถจำแนกสปีชีส์เชื้อเลปโตสไปราโดยส่วนใหญ่เชื้อที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยและหนูมีความสัมพันธ์กับ *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri* ส่วนผลการศึกษาลำดับเบส *orf14* ยีนนั้นพบว่าสามารถจำแนกเชื้อเลปโตสไปราออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Interrogans, Hardjo และ Bataviae type *orf14* ยีนเป็นทางเลือกที่ใช้ในการจำแนกเชื้อเลปโตสไปราโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *LEPTOSPIRA* SPECIES ISOLATES IN THAILAND

PIYADA WANGROONGSARB 4537227 TMTM/D

Ph.D. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D.(MICROBIOLOGY),
WIPAWEE JAMPANGERN, Dr. Med Sc., YUVADEE MAHAKUNKIJCHAROEN,
Ph.D. (PATHOLOGY, MICROBIOLOGY, AND IMMUNOLOGY)

ABSTRACT

Attempts have been made to develop a molecular system for differentiation of *Leptospira* spp. LPS (O-antigen) is a key antigen involved in serogroup typing. These studies employed the 16SrRNA gene and the *orf14* gene from the *rfb* locus that has a putative role as O-Ag polymerase. PCR-RFLP and direct sequencing of PCR products were performed on the two targets, 16SrRNA gene and *orf14*. These two target genes were aimed to characterize unknown leptospiral isolates, in comparison to leptospiral reference strains.

The result of 16SrRNA PCR-RFLP digested with *HinfI* and *HpaII* and the result of *orf14* PCR-RFLP digested with *AluI* and *DraI* were computed by Gene tool and Gene directory software (Syngene Co.Ltd.) and the binary data were reanalyzed with PHYLIP 3.6 program (2001). The outcome of *orf14* PCR-RFLP revealed distinguishing patterns which can differentiate individual *Leptospira* serovars better than when using 16SrRNA PCR-RFLP. *Orf14* PCR-RFLP for differentiation of *Leptospira* spp. is a fast technique and requires small amounts of genomic DNA. It is suitable for some slow-growing and fastidious leptospiral isolates which yield a small amount of cell mass. However, there was limited discrimination power of the RFLP pattern due to the limited restriction enzyme sites which could not cut the PCR products. The 16SrRNA sequences can differentiate species, and it was found that most human and rat isolated cultures related to *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri* could not be related to any reference strains. *Orf14* sequencing data could be used to categorize leptospiral strains into 3 types, *i.e.* Interrogans, Hardjo and Bataviae types and it could be applied as another target gene for molecular typing of *Leptospira* spp.

KEY WORDS : *LEPTOSPIRA*/ MOLECULAR TYPING/ LPS/ *Orf14*/ PCR/ RFLP

221 P. ISBN 974-04-7025-4