บทคัดย่อ

T141371

ในการวินิจฉัยโรค Leptospirosis ผู้วิจัยเลือกยีนส์จาก *rfb* locus ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ O-antigen ของ lipopolysaccharide ซึ่งคาดว่าน่าจะ conserved ครอบคลุม *Leptospira* species ได้เป็นส่วนมาก ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือก primers ที่ออกแบบจาก *orf14* ทั้งนี้ primer คู่นี้ จะครอบคลุม *Leptospira* serovar ต่างๆ ยกเว้น *L. interrogans* serovar wolffi ผู้วิจัยยังนำระบบ nested PCR มาใช้เพื่อจะเพิ่มความไวในการตรวจ สำหรับปฏิกริยา cross reactivity ที่เกิดกับ bacteria บาง species ได้แก้ปัญหาโดยเพิ่มอุณหภูมิ annealing ของ PCR รอบที่ 2 จาก 55°C เป็น 62°C ทั้งนี้จะป้องกัน non-specific product และไม่สามารถตรวจพบทั้งจาก gel electrophoresis และหลังจากกระบวนการ Southern hybridization โดยใช้ probe จาก nested primers คู่ใน จากการใช้ PCR test นี้กับ serum ผู้ป่วย Leptospirosis จะไม่สามารถเห็น PCR product อะไรเลยจาก agarose gel electrophoresis แต่จะเห็นได้หลังจากปฏิกริยา Southern Hybridization เท่านั้น

สำหรับจุดมุ่งหมายในการใช้ยีนส์ *orf14* จำแนก *Leptospira* ออกเป็น serovar จำเพาะนั้น พบว่าไม่สามารถใช้ได้กับ serovar ส่วนมากที่เป็นสมาชิกของ *L. interrogans* อย่างไรก็ตามใน serovar hardjoprajitno และ serovar hardjobovis ซึ่ง *rfb* organization แตกต่างจาก *L. interrogans* จะมี *orf14* sequence ที่แตกต่างกัน ซึ่งผู้วิจัยนำส่วนที่แตกต่างกันมาใช้ออกแบบ primer ที่มีความจำเพาะกับ serovar hardjo ได้แล้ว

Abstract

TE141371

To develop the PCR diagnosis for Leptospirosis, the oligo primers are selected from the *rfb* locus that involved in biosynthesis of O-antigen. It is expected to have the primers that is conserved enough to cover most of the pathogenic *Leptospira*, but still possess the specificity. The oligo primers designed from *orf14* sequence gave the promising results as they could amplify most of the *Leptospira* DNA panel except *L. interrogans* serovar wolffi. The nested PCR process was used to increase sensitivity of the test. The cross reactivity is still found with a few species of bacteria, however it could be prevented by increasing the annealing temperature of the second round nested-PCR from 55 °C to 62 °C. With this procedure none of the cross-reactivity product could be view by both gel electrophoresis and Southern hybridization,while the specific PCR-product from *Leptospira* remain.

In another aspect to use the variation within *orf14* sequence as the signature sequence to identify the Leptospiral serovar is the wrong hypothesis, since the recent *orf14* sequence of *L. interrogans* serovars from database revealed that they are quite conserved. However *orf14* sequence of serovar hardjoprajitno that belong to *L. interrogans* has a far distance - variation to other *L. interrogans* and the specific primers designed from this variation has already been obtained.