

การตรวจเอกสาร

ประวัติการค้นพบโรคเลปโตสไปโรซิสและเชื้อเลปโตสไปรา

โรคเลปโตสไปโรซิสถูกค้นพบและรายงานเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1886 โดยนายแพทย์ชาวเยอรมันมีชื่อว่า Adolf Weil และตั้งชื่อโรคนี้ว่า Weil's disease โดยพบว่าผู้ป่วยโรคนี้ มักจะมีอาการม้ามโต ตัวเหลือง และอาการไตอักเสบ อย่างไรก็ตามก่อนหน้าการรายงานของ Weil เคยมีรายงานผู้ป่วยอาการคล้าย ๆ กันนี้ในคนทำงานเกี่ยวกับท่อระบายน้ำทิ้ง แต่ขณะนั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นโรคอะไร นอกจากนั้น โรคเลปโตสไปโรซิสยังเป็นโรคที่เกิดขึ้นในคนงานของประเทศจีนและญี่ปุ่นในช่วงฤดูหนาวหรือเก็บเกี่ยวข้าว ซึ่งเรียกว่า akiyami หรือ autumn fever นักวิทยาศาสตร์บางท่านสันนิษฐานว่า โรคเลปโตสไปโรซิสแพร่กระจายเข้าสู่ทวีปยุโรปตะวันตกในทศวรรษที่ 18 ก่อนมีการรายงานของ Weil โดยการนำพาของหนู *Rattus norvegicus* จากทวีปเอเชียที่มีพื้นที่ติดต่อกับทวีปยุโรป (Levett, 2001)

ในปี ค.ศ.1915 ได้มีนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นและเยอรมันทำการศึกษากันอย่างจริงจังเกี่ยวกับสาเหตุของโรค กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ได้ตรวจพบเชื้อสไปโรชีต (spirochetes) และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อสไปโรชีต (specific antibody) ในคนงานของประเทศญี่ปุ่นที่ป่วยมีอาการไข้ ตัวเหลือง ส่วนกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันซึ่งเป็นนายแพทย์ ได้ทำการศึกษาอาการป่วยเป็นไข้ของทหารเยอรมันที่ปฏิบัติหน้าที่อยู่ตามท่อระบายน้ำ ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศฝรั่งเศส โดยตรวจพบเชื้อสไปโรชีตในเลือดของหนูตะเภาที่ได้มีการฉีดเลือดของทหารป่วยเข้าไป จากการค้นพบเชื้อเลปโตสไปราทำให้เกิดการโต้เถียงกันในเรื่องระบบการเรียกชื่อ แต่ในความเป็นจริงแล้ว Stimson เป็นคนแรกที่ได้รายงานพบเชื้อเลปโตสไปราเป็นครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1907 โดยได้นำเนื้อเยื่อไตของผู้ป่วยเป็นโรคไข้เหลืองตาย มาทำการศึกษาโดยทำการตัด section แล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี silver staining โดยตั้งชื่อเชื้อนี้ว่า *Spirochaeta interrogans* เพราะว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับเครื่องหมายคำถาม แต่การค้นพบในขณะนั้นยังไม่ได้รับความสนใจ จากรายงานต่าง ๆ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1917 แสดงให้เห็นว่า อาชีพเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรค และหนูเป็นแหล่งแพร่เชื้อไปสู่คนที่สำคัญ รวมทั้งมีรายงานการเกิดโรคในสุนัขและปศุสัตว์ต่าง ๆ ด้วย สิ่งที่สำคัญคือเชื้อเลปโตสไปรา มีรายงานการระบาดในทุกทวีปทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ทำให้หน่วยงานต่าง ๆ ของรัฐหรือนักวิทยาศาสตร์ให้ความสำคัญและศึกษากันมากขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลองค์ความรู้ในการป้องกันและแก้ไขปัญหาของโรคที่เกิดขึ้น (Levett, 2001)

ลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อเลปโตสไปรา

เลปโตสไปราสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มสไปโรชีต มีลักษณะรูปร่างเป็นเกลียวบาง สามารถบิดรูปร่างได้ มีขนาดกว้างประมาณ 0.1 ไมครอน และมีความยาว 6-20 ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วโดยการหมุนหรือการโค้งงอ เคลื่อนที่ได้ดีในอาหารที่มีความหนืด โดยเคลื่อนในลักษณะคล้ายงู รongลงมาในอาหารเหลว และเคลื่อนที่ได้ช้าในอาหารแข็ง (เคลื่อนที่แบบคืบคลาน) โดยทั่วไปเชื้อเลปโตสไปรา มีลักษณะโค้งงอหรือคล้ายตะขอตรงบริเวณปลายทั้งสองด้านหรือด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เรียกว่า hook แต่ก็พบเชื้อเลปโตสไปราที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มี hook นอกจากนี้แล้ว ความสามารถในการทำให้เกิดโรคมีความสัมพันธ์กับขนาดของโคโลนีและลักษณะรูปร่างของเลปโตสไปรา โดยที่ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก ๆ ส่วนใหญ่แล้วเป็นชนิดที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง และไม่ก่อโรค (non-pathogenic) แต่ถ้าเป็นพวกที่มีโคโลนีขนาดใหญ่ และมีลักษณะโค้งงอหรือมี hook มักจะเป็นเชื้อชนิดที่ก่อโรค (pathogenic) (Faine and Vanderhoeden, 1964)

เลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และใช้กรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน อาศัยอยู่ในดิน โคลน แหล่งน้ำ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ เชื้อเลปโตสไปราชนิดไม่ก่อโรค เช่น *L. biflexa* ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด แต่เชื้อชนิดก่อโรค เช่น *L. interrogans* อาศัยเป็นปรสิตในสัตว์ป่า สัตว์เลี้ยง หรือคน ปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตของเลปโตสไปราประกอบด้วย อุณหภูมิ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 20-30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง อยู่ในช่วง pH 6-8 และความชื้น เชื้อเลปโตสไปราไม่สามารถอาศัยอยู่ได้ในที่แห้ง โดยผลจากการทดลองเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส เชื้อจะตายภายใน 10 นาที และ 10 วินาที ตามลำดับ ส่วนในสภาพที่มีความเป็นด่างสูงและในน้ำยามาเชื้อ เช่น คลอรีนอัตราส่วน 6 พีพีเอ็ม หรือไอโอดีนอัตราส่วน 5 พีพีเอ็ม สามารถทำให้เชื้อตายได้ภายใน 1 นาที (สำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิสและกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ, 2544) จากการเปรียบเทียบความไวต่ออุณหภูมิของเชื้อ *L. icterohaemorrhagiae* สายพันธุ์ก่อโรค (strain Field) กับสายพันธุ์ไม่ก่อโรค (strain Jackson) เมื่อเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสายพันธุ์ไม่ก่อโรคไม่สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือในซีรัมของหนูตะเภาที่ติดเชื้อ ส่วนการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อชนิดก่อโรคเจริญอย่างช้า ๆ แต่เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในการเลี้ยงเชื้อไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่เชื้อชนิดไม่ก่อโรคไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งสิ่งนั้นก็อาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่เชื้อชนิดก่อโรคอาศัยอยู่ได้ในสัตว์ที่ติดเชื้อ (Faine, 1959)

จากการที่อุณหภูมิต่ำเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโต ทำให้สามารถแยกเลปโตสไปราชนิดไม่ก่อโรคจากชนิดก่อโรคได้ด้วยวิธีการง่าย ๆ โดยที่อุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดก่อโรคอยู่ระหว่างอุณหภูมิ 13-15 องศาเซลเซียส แต่ชนิดไม่ก่อโรคเจริญอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าชนิดก่อโรค 5 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดลองถ่ายเชื้อ 8×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารทดสอบและเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส สามารถแยกเชื้อที่นำมาทดสอบชนิดไม่ก่อโรคออกจากชนิดก่อโรคได้ (Johnson and Harris, 1967) และจากการนำเชื้อเลปโตสไปราจำนวน 4 ชนิด มาทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อของบริษัทต่าง ๆ (commercial blood culture system) พบว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ร่วมกับการให้อากาศขณะเลี้ยง เชื้อเลปโตสไปราทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเพิ่มโอกาสในการแยกเชื้อจากผู้ป่วยได้ดีที่สุด (Palmer *et al.*, 2000)

การจัดกลุ่มเชื้อเลปโตสไปรา

เลปโตสไปราเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ถูกจัดอยู่ในคลาส (class) Shizomycetes อันดับ (order) Spirochaetales ตระกูล (family) Spirochaetaceae จีนัส (genus) *Leptospira* มีหลักเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม 2 อย่าง คือหลักในทางซีรัมวิทยา (base-on serology) และหลักในทางพันธุกรรม (base on DNA-DNA hybridization) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การจัดกลุ่มในทางซีรัมวิทยา

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1989 เชื้อแบคทีเรียในจีนัสเลปโตสไปรา ถูกแบ่งออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ที่ก่อโรคในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *L. interrogans* ส่วนอีกสปีชีส์ คือ ไม่ก่อโรคทั้งในคนและสัตว์ ได้แก่ *L. biflexa* เลปโตสไปราทั้งชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรค ได้ถูกจำแนกเป็นซีรัวร์ด้วยวิธี cross agglutination absorption test ซึ่งแยกได้โดยอาศัยไตเตอร์ของแอนติบอดีจากกระต่าย ถ้ามีค่าแตกต่างกันน้อยกว่าร้อยละ 10 ก็จะถือว่าอยู่ในซีรัวร์เดียวกัน (Dikken *et al.*, 1978; Dikken *et al.*, 1979) ปัจจุบันนี้มีรายงานพบ *L. interrogans* มากกว่า 200 ซีรัวร์ และ *L. biflexa* มีจำนวนอย่างน้อย 60 ซีรัวร์ (Levett, 2001) บางซีรัวร์สามารถพบได้มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ เนื่องจากแอนติเจนที่มีคุณสมบัติเฉพาะต่อซีรัวร์มีมากกว่าหนึ่งสปีชีส์ ในการจำแนกทางซีรัมวิทยานั้นขึ้นอยู่กับส่วนของ lipopolysaccharide antigen ซึ่งความจำเพาะอยู่ที่การจัดเรียงตัว และโมเลกุลน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ ซีรัวร์ที่มีแอนติเจนเหมือนกันสามารถเกิดปฏิกิริยา agglutination ได้กับแอนติบอดีชนิดเดียวกัน นำมาจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เรียกว่า “ซีโรกรุ๊ป” (serogroup) ดังนั้นการจำแนกทางซีรัมวิทยาอาจทำให้เกิดความสับสนกับหลักเกณฑ์การจำแนกทางพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตาม การจำแนกทางซีรัมวิทยายังมีความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา และความรุนแรงของโรค เป็นต้น

แต่ปัญหาของการจัดกลุ่มด้วยวิธีนี้ คือ ต้องใช้เวลามาก มีความยุ่งยาก และราคาแพง จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในทางชีวเคมีที่ง่ายขึ้น เช่น การใช้เทคนิค enzyme-link immunosorbent assays (ELISA) การใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี และเทคนิคการจัดจำแนกโดยใช้สารพันธุกรรมก็เริ่มมีการพัฒนาขึ้น เช่น การใช้เทคนิค DNA hybridization ด้วย DNA probe ที่มีความจำเพาะต่อเลปโตสไปราสปีชีส์ต่าง ๆ เป็นต้น (Terpstra *et al.*, 1985a; Terpstra *et al.*, 1985b; Terpstra *et al.*, 1987; Terpstra *et al.*, 1986)

การจัดกลุ่มในทางพันธุกรรม

จากการศึกษาด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization และเทคนิคอื่น ๆ ทำให้มีการกำหนดเชื้อที่จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน จะต้องมีความเหมือนกันอย่างน้อยร้อยละ 70 ในส่วนของดีเอ็นเอที่เหมือนกันนั้น ต้องมีส่วนที่เป็น divergence หรือแตกต่างไม่เกินร้อยละ 5 ทำให้ระยะแรกสามารถจำแนกเลปโตสไปราได้ทั้งหมด 10 สปีชีส์ (Yasuda, 1987) ต่อมาภายหลังได้มีการศึกษากันอย่างจริงจังจากหน่วยงานต่าง ๆ จนปัจจุบันนี้ สามารถจำแนกเลปโตสไปราได้ 16 สปีชีส์ ประกอบด้วยชนิดก่อโรค จำนวน 12 สปีชีส์ คือ *L. interrogans*, *L. nugarum*, *L. sentarosai*, *L. borgpetersenii*, *L. weillii*, *L. inadai*, *L. kirschneri* และอีกจำนวน 5 สปีชีส์ ที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ ส่วนชนิดไม่ก่อโรคมีจำนวน 4 สปีชีส์ คือ *L. biflexa*, *L. myeri*, *L. wolbachii* และ *Leptonema illini* (สำนักงานโครงการควบคุมโรคเลปโตสไปโรซิสและกองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ, 2544) ซึ่งมีสปีชีส์ *L. parva* ได้ถูกจัดจำแนกใหม่เป็นชื่อ *Turneriella parva* (Levett *et al.*, 2001)

การแบ่งออกเป็นสปีชีส์ไม่ได้มีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางชีววิทยา ซีโรวาร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรคก็จัดอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นการใช้หลักเกณฑ์การแบ่งเป็นซีโรวาร์หรือซีโรกรุ๊ป ก็ไม่สามารถที่จะแสดงถึงสปีชีส์ของเชื้อเลปโตสไปราในการจัดแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมได้ ในปัจจุบันการจัดกลุ่มโดยใช้หลักเกณฑ์ทางพันธุกรรมเป็นวิธีที่มีความถูกต้องเป็นที่ยอมรับมากกว่าในทางชีววิทยา และเหมาะสมควรใช้เป็นหลักเกณฑ์สำหรับในอนาคต

โครงสร้างและลักษณะที่สำคัญของเชื้อเลปโตสไปรา

โครงสร้างของเลปโตสไปราคล้ายกับพวกแบคทีเรียแกรมลบทั่ว ๆ ไป ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ถัดเข้าไปข้างในเป็นชั้น protoplasmic cylinder ซึ่งประกอบด้วยชั้นเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (inner membrane) ทำหน้าที่ห่อหุ้มไซโทพลาซึม (cytoplasm) ของเซลล์ไว้ ภายในไซโทพลาซึมประกอบด้วย นิวเคลียส ไรโบโซม และอินคลูชันบอดีส์ชนิดต่าง ๆ โครงสร้างที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบ คือตำแหน่งของแฟลกเจลลา (flagella) แทรกอยู่ในบริเวณ periplasmic space ของเซลล์ และมีชั้นเพปติโดไกลแคนอยู่ติดกับเยื่อ

หุ้มเซลล์ชั้นใน เหมือนกับพวกแบคทีเรียแกรมบวก โดยที่ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อเลปโตสไปรากับเชื้อสไปโรชีตชนิดอื่น ๆ ได้ แต่ถ้าทราบแล้วว่าเป็นเลปโตสไปรา อาจจะใช้ส่วนของ hook หรือรูปร่างแยกระหว่างชนิดก่อโรคออกจากชนิดไม่ก่อโรคได้ รายละเอียดโครงสร้างหลัก ๆ ที่สำคัญของเลปโตสไปรา มีดังนี้

แฟลกเจลลา

โดยทั่วไปแล้วเลปโตสไปรา มีแฟลกเจลลาจำนวน 2 เส้น แต่ละเส้นแยกอยู่บริเวณปลายของเซลล์แต่ละด้าน มีลักษณะแตกต่างจากแฟลกเจลลาของแบคทีเรียทั่ว ๆ ไป เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่สอดแทรกอยู่ภายในระหว่างส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกกับชั้น periplasmic cylinder จึงเรียกว่า เอนโดแฟลกเจลลา (endoflagella) โดยมีจุดกำเนิดมาจากส่วนขั้วเซลล์ และก้านของแฟลกเจลลาพันรอบ periplasmic cylinder เข้ามายังบริเวณกลางของตัวเซลล์ (Birch-Andersen *et al.*, 1973) มีขนาดใกล้เคียงกับแฟลกเจลลาของแบคทีเรียทั่วไป มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 18 นาโนเมตร (Nauman *et al.*, 1969) ในขณะที่สไปโรชีตชนิดอื่น ๆ ก็มีขนาดไม่แตกต่างมากนัก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15-21 นาโนเมตร (Bharier *et al.*, 1971; Hovind-Hougen *et al.*, 1982; Listgarten and Socransky, 1964; Mudd *et al.*, 1943) การวัดความยาวของแฟลกเจลลาจากสภาพที่แท้จริงภายในเซลล์ให้มีความแม่นยำทำได้ยาก เนื่องจากบางส่วนของแฟลกเจลลาอาจแตกหักและขาดหายไปจากวิธีการสกัด โครงสร้างของแฟลกเจลลาประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ๆ คือ ส่วนของก้านแกนกลางที่ถูกล้อมรอบด้วย sheath (core and sheath) เมื่อแยกเอาส่วนที่ห่อหุ้มหรือ sheath ออก ก้านแกนกลางมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-16 นาโนเมตร ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Pomona มีส่วนของ sheath จำนวน 3 ชั้น (Birch-Andersen *et al.*, 1973) จากการทดสอบเซลล์กับสารพวกคอมพลีเมนต์และแอนติบอดี พบว่าส่วนของ core และ sheath เกิดการแตกหักเป็นท่อนเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 0.4 นาโนเมตร โครงสร้างอีกส่วนคือ insertion apparatus ส่วนนี้พัฒนาไปเป็นส่วนที่เรียกว่า terminal knob ซึ่งประกอบด้วย proximal hook และ insertion disk ส่วนของ proximal hook คือช่วงที่มีลักษณะเป็นตะขอ โดยปกติแล้วมีความหนาแน่นมากกว่าส่วนแรก (14-17 นาโนเมตร) มีความยาวแตกต่างกันตั้งแต่ 40-70 นาโนเมตร เป็นส่วนที่ทำให้มีลักษณะโค้งงอบริเวณปลาย และถัดเข้าไปติดกับ proximal hook ภายใน protoplasmic cylinder เป็นส่วนที่เรียกว่า insertion disk โดยเฉลี่ยแล้วมีความหนา 9 นาโนเมตร เลปโตสไปรา มี insertion disk จำนวน 3-5 ชั้น วางเรียงซ้อนใกล้เคียงกัน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-26 นาโนเมตร โดยที่สไปโรชีตชนิดอื่น ๆ มีเพียง 3 ชั้น แต่ละชั้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าเลปโตสไปรา (Listgarten and Socransky, 1964)

เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมของเลปโตสไปราสามารถแยกเป็นส่วน ๆ เพื่อนำมาศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา ทางด้านเคมีและทางด้านเคมีภูมิคุ้มกันได้ เทคนิคในการสกัดชั้นแรก แยกส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของตัวเซลล์ออกมาก่อนด้วย *n*-butanal หรือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วทำให้เซลล์แตกเพื่อแยกส่วนเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมออกมา วิธีการทำให้เซลล์แตกสามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น ใช้สารพวก detergent การทำ freeze-thawing หรือการใช้ ultrasound เป็นต้น จากนั้นนำมาทำให้เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมีความบริสุทธิ์ด้วยวิธี density gradient centrifugation ในสารละลาย KBr CsCl₂ หรือ RbCl หรือ การสกัดผ่าน diethyl amino ethyl column (Chang and Faine, 1970; Kelson *et al.*, 1988; Nauman *et al.*, 1969) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ เป็นพวกโปรตีน และจากการวิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ พบว่ามีกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophan) คล้ายกับแบคทีเรียทั่วไปมาก (Chang *et al.*, 1969; Iino, 1969; Martinez *et al.*, 1967) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมีความไวต่อสารเคมีที่ทำลายพันธะไฮโดรเจน และทำให้โปรตีนเสียสภาพ ในขณะที่เอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) และโปรตีเอส (protease) มีผลเล็กน้อย

เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมมีหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนที่ แต่หน้าที่ในการรักษาให้มีลักษณะรูปร่างเป็นเกลียวยังไม่ทราบแน่ชัด (Li *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2000b) จากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *flab* ใน *L. biflexa* แสดงให้เห็นความไม่ชัดเจน ในหน้าที่ที่แท้จริงของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมเพราะว่าในกลุ่ม *flab* gene mutant ไม่พบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นเกลียวและเคลื่อนที่ได้ รวมทั้งไม่พบเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและส่วน hook เกิดขึ้น ในขณะที่เชื้อปกติยังคงมีรูปร่างเป็นเกลียว เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมยังทำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อโรคและมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (Kelson *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตาม ยังคงต้องมีการศึกษากระบวนการสังเคราะห์เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และกลไกที่สำคัญในการเคลื่อนที่ในทิศทางไปข้างหน้าและกลับหลังของเลปโตสไปรา

เยื่อหุ้มเซลล์

เลปโตสไปรามีเยื่อหุ้มเซลล์ 2 ชั้น คือเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน การแยกและจำแนกส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกและส่วนอื่น ๆ ของผิวเซลล์ มีความสำคัญต่อการนำไปสู่ความรู้ความเข้าใจในระดับโมเลกุลของโครงสร้างและหน้าที่ วิธีการแยกเยื่อหุ้มเซลล์ของเลปโตสไปราแตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป เพราะชั้นเพปติโดไกลแคนของเลปโตสไปราอยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในมากกว่าชั้นนอก วิธีการสกัดเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมีหลายวิธี เช่น การใช้ sodium dodecyl sulfate (SDS) หรือ sakosyl (Nicholson and Prescott, 1993) และการใช้ triton x-114 ส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกมักจะนำไปใช้ทำวัคซีนป้องกันโรค (Auran *et al.*, 1972) จากการศึกษาในตัวอย่างเชื้อ *L. kirschneri* ซีโรวาร์ Grippotyphosa พบว่ามีอัตราส่วนโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein; OMP) ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และพบว่าเลปโตสไปราชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรค

มีจำนวน OMP 443 และ 990 โมเลกุลต่อตารางไมครอน ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ และทั้งสองมีจำนวนต่ำกว่าที่พบใน *Escherichia coli* ประมาณ 10-100 เท่า โดยรวมแล้วผิวของเซลล์ เลปโตสไปรา มีประจุลบ (Haake *et al.*, 1991) เลปโตสไปรา มักจะถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนที่เติมลงไป ในอาหารเพาะเลี้ยงและเมื่อเลี้ยงไประยะเวลา นานขึ้นไม่สามารถแยกออกจากกันได้

สามารถจำแนก OMP ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม transmembrane ประกอบด้วย OmpL1 ซึ่งเป็น OMP ชนิดแรกที่ถูกค้นพบ (Haake *et al.*, 1993) คาดว่าโครงสร้างที่เป็น β -sheet transmembrane องค์ประกอบและมีคุณสมบัติเป็น porin (Shang *et al.*, 1996) กลุ่มที่สอง คือ ไลโปโปรตีน (lipoproteins) ซึ่งเป็นกรดไขมันเชื่อมติดอยู่กับส่วนปลายทางด้าน N-terminal ของโปรตีน ซึ่งเป็นส่วนที่ติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเลปโตสไปรา ไลโปโปรตีนที่มีการจำแนกได้แล้ว ประกอบด้วย LipL32, LipL36, LipL41, LipL21 และ LipL48 (Haake, 2000; Haake *et al.*, 2000; Haake *et al.*, 1998; Haake and Matsunaga, 2002; Shang *et al.*, 1996) LipL32 เป็นไลโปโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดและมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนในคนที่เป็โรคเลปโตสไปโรซิส รวมทั้งยังมีส่วนช่วยในการเกิด hemolysis โดยทำงานร่วมกับ sphingomyelinase H (SphH) ซึ่งพบใน *SphH* ได้ในเลปโตสไปราชนิดก่อโรค (Lee *et al.*, 2002) LipL41 ที่เชื่อมรวมกับ OmpL1 ให้ผลเสริมกันในการใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Haake *et al.*, 1999) OMP กลุ่มสุดท้าย คือ peripheral membrane protein ประกอบด้วย P31_{LipL45} (Matsunaga *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบโปรตีน ligA และ ligB ที่จัดเป็น surface-exposed proteins ที่มีหน้าที่สำคัญในการจับกับเซลล์ของโฮสต์และบุกรุกเข้าไปภายในเซลล์ช่วงระหว่างการเกิดโรคเลปโตสไปโรซิส (Matsunaga *et al.*, 2003)

ส่วนของผนังเซลล์ชั้นในพบว่าประกอบด้วย LipL31, ImpL63 (Haake and Matsunaga, 2002) และโปรตีน Lag42 ซึ่งบริเวณที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนอยู่ทางด้านปลาย C-terminal อีกทั้งยังพบ ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน Lag42 เฉพาะในเลปโตสไปราชนิดก่อโรคเท่านั้น (Koizumi and Watanabe, 2003) ผนังเซลล์ชั้นในยังเป็นจุดกำเนิดของเอนโดแฟลกเจลลาร์และโปรตีน penicillin-binding protein (PBP) พบแทรกอยู่ในชั้นนี้ร่วมกับชั้นเพปติโดไกลแคนอีกด้วย (Brenot *et al.*, 2001) ชั้นเพปติโดไกลแคนเหมือนกับพวกแบคทีเรียแกรมบวกมาก อยู่ด้านนอกและติดกับผนังเซลล์ชั้นใน และคาดว่าชั้นเพปติโดไกลแคนมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) และผลิตสารพวก cytokine เช่น TNF- α โดย human monocyte cell (Cinco *et al.*, 1996)

จากการศึกษาวิเคราะห์จีโนมของ *L. interrogans* สามารถตรวจพบยีนที่คาดว่าสร้าง OMP ชนิดใหม่หลายชนิดที่จัดเป็น TolB-dependent OMPs ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่างเช่น โปรตีน BtuB ทำหน้าที่เกี่ยวกับการนำวิตามินบี 12 เข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังพบโปรตีน TolC ซึ่งจับรวมกันอยู่กับพวก ATP-binding cassette (ABC) transporter proteins เพื่อทำหน้าที่ส่ง hemolysin และสารอื่น ๆ ที่อยู่ในไซโทพลาซึมออกนอกเซลล์ จีโนมของเลปโตสไปรายังมียีนที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งออกนอกเซลล์แบบ three-component effector system (Type III) ที่ประกอบด้วย โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น outer membrane effector (OMF), membrane fusion protein (MFP) และ inner membrane transporters ดังเช่น CzcA เป็น inner membrane transporter ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำลายความเป็นพิษของโลหะหนักที่เข้าสู่เซลล์ (Nascimento *et al.*, 2004b)

ไขมัน (Lipids)

เลปโตสไปราทั้งชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรคมีจำนวนอัตราส่วนกรดไขมันสูงและมีกรดไขมันที่พบยากหลายชนิด (Cacciapuoti *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1969) กรดไขมันชนิดที่มีสายยาว (long-chain fatty acid) มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเลปโตสไปรา เพราะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาใช้เองได้ จึงจำเป็นต้องเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง จากการศึกษเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันของเชื้อเลปโตสไปรา สปีชีส์ก่อโรค 5 สปีชีส์ และไม่ก่อโรค 6 สปีชีส์ หลังจากสกัดด้วย chloroform-methanol พบว่าเลปโตสไปราทั้งสปีชีส์ก่อโรคและไม่ก่อโรคมีไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 15–20 ของน้ำหนักแห้ง ในจำนวนนี้มีไขมันจำพวกฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ร้อยละ 60–70 ส่วนที่เหลือเป็นกรดไขมันอิสระ (free-fatty acid) ชนิดของฟอสโฟลิปิดที่พบประกอบด้วย phosphatidyl ethanolamine (ร้อยละ 80–90), phosphatidyl glycerol (ร้อยละ 5–20), diphosphatidyl glycerol (ร้อยละ 1–5) และ lysophosphatidyl ethanolamine (พบในบางครั้งร้อยละ 0.3) ชนิดของกรดไขมันที่พบมากได้แก่ hexadecanoic acid, hexadecenoic acid และ octadecenoic acid เลปโตสไปราสามารถสังเคราะห์ hexadecenoic acid ได้ทั้งที่เป็นโครงสร้างแบบ cis-9-hexadecenoic acid และโครงสร้างแบบ cis-11-hexadecenoic acid นอกจากนี้แล้ว เลปโตสไปราสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา β -oxidation เพื่อลดความอึดตัวของกรดไขมันได้ด้วยกระบวนการใช้ออกซิเจน (Johnson *et al.*, 1970)

อย่างไรก็ตาม จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบไขมันของสไปโรชีตทั้ง 3 จินัส (*Leptospira Spirochaeta* และ *Treponema*) พบว่ามีความแตกต่างในลักษณะของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมกรดไขมัน สมาชิกในจินัส *Leptospira* sp. มีไขมันที่พบมากได้แก่ phosphatidyl ethanolamine แต่ไม่พบ glycolipid หรือ phosphatidyl choline ซึ่งแตกต่างกับจินัส *Treponema* sp. ที่มี phosphatidyl choline เป็นฟอสโฟลิปิดที่พบมาก และไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันและทำให้

กรดไขมันสายยาวเกิดปฏิกิริยา β -oxidation ได้ ส่วนจีโนม *Spirochaeta* sp. สามารถสังเคราะห์กรดไขมันได้ แต่ไม่พบทั้ง phosphatidyl ethanolamine และ phosphatidyl choline นอกจากนั้น ยังพบ monoglycosyl diglyceride และน้ำตาลเฮกโซสที่เป็นองค์ประกอบของ glycolipid แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ (Livermore and Johnson, 1974)

องค์ประกอบของเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจน

ไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide: LPS)

LPS เป็นองค์ประกอบที่พบมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก เป็นส่วนสำคัญในการส่งเสริมให้เกิดโรค และเป็นแอนติเจนในการจับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ทำให้เซลล์เลปโตสไปราถูกกลืนกิน สลายไปได้โดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Farrelly *et al.*, 1987) จากการใช้ LPS บริสุทธิ์สามารถ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ (Midwinter *et al.*, 1990) การเปลี่ยนแปลงในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LPS เป็นสาเหตุทำให้เลปโตสไปราแบ่งได้เป็นหลายซีรัวร์ ซึ่งได้นำมาใช้ จัดกลุ่มในทางซีรุ่มวิทยา (de la Pena-Moctezuma *et al.*, 1999)

การสกัดสารพวกคาร์โบไฮเดรตจากเลปโตสไปรา สามารถใช้ตัวทำลายหลายชนิด เช่น ฟีนอล อัลคาไลต์ และอะซิโตน ทำให้มีการเรียกชื่อแอนติเจนแตกต่างกัน ดังเช่น TM antigen (type-specific main antigen) (Shinagawa and Yanagawa, 1972) ESS (erythrocyte-sensitivity substance) (Chang and Mc, 1954) และ LLS (LPS-like substance) (Shimizu *et al.*, 1987) เป็นต้น ทั้งหมดล้วนแล้วแต่มีส่วนของ LPS เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างของ LPS ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากการวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมี แสดงให้เห็นว่า คล้ายกับ LPS ของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีน้ำตาลเฮกโซส อะมิโนเฮกโซส เพนโทส และเฮปโทสเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้แล้ว ยังพบน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) หรือน้ำตาลชนิดที่พบได้ยาก เช่น xylose arabinose (Vinh *et al.*, 1986) และยังมีรายงานพบน้ำตาล ที่หมู่ methyl และหมู่ acetyl เกาะอยู่ด้วย ในส่วนของน้ำตาล Kdo (2-keto-3-deoxyoctonates) ที่เป็น ส่วนประกอบของ LPS ใน *L. interrogans* ซีรัวร์ Copenhageni กับ *L. borgpetersenii* ซีรัวร์ Hardjo มีความเหมือนกันสูงและคล้ายกับพวกแบคทีเรียแกรมลบ (Yanagihara *et al.*, 1983)

จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม พบว่าบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LPS เรียกว่า *rfb* locus หรือ *O*-antigen gene cluster ในบริเวณนี้มียีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นไซม์ที่ใช้ในการ เปลี่ยนแปลงน้ำตาล การสังเคราะห์น้ำตาล การขนส่งน้ำตาล และยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ *O*-antigen processing นอกจากนี้พบว่าบริเวณนี้มียีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์ Wzx-flippase

และ Wzy-polymerase ซึ่งเกี่ยวข้องในการขนส่งโอลิโกแซ็กคาไรด์ออกนอกเซลล์ และการเชื่อมต่อกันให้เป็น LPS ตามลำดับ ยีนที่เป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์ lipid A (*lpxD* gene) และการขนส่ง (*msbA* gene) ของเลปโตสไปราบางชนิดมี insertion elements (*IS1533*) แทรกอยู่ด้วย (de la Pena-Moctezuma *et al.*, 1999) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ระหว่าง *L. interrogans* กับ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo โดยทั่วไปแล้วมีความเหมือนกัน แต่ *L. interrogans* ไม่มีส่วน *IS*-element ซึ่งทั้งสองไม่สามารถแยกความแตกต่างในทางซีรัมวิทยาได้ และจากการเปรียบเทียบตำแหน่ง *rfb* locus ใน *L. interrogans* จำนวน 14 ซีโรวาร์ พบว่ามีการอนุรักษ์ในบริเวณ ORF11-ORF31 แต่ทางด้าน upstream ของ ORF11 มีความจำเพาะที่แตกต่างกันในแต่ละซีโรวาร์ ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็นรหัสสำหรับสร้างเอ็นไซม์หลายชนิด (de la Pena-Moctezuma *et al.*, 2001) และสอดคล้องกับรายงานเปรียบเทียบ predicted coding sequence ระหว่าง *L. interrogans* ซีโรวาร์ Copenhageni กับซีโรวาร์ Lai ซึ่งพบว่า บริเวณนี้มีความแตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่ซีโรวาร์ Copenhageni มียีน aminotransferase จำนวน 2 ชุด (LIC12197 และ LIC12198) แต่ไม่มียีนที่เป็นรหัสสำหรับเอ็นไซม์ galactoside-O-acetyltransferase (LA1622) ซึ่งพบเฉพาะในซีโรวาร์ Lai (Nascimento *et al.*, 2004a)

LPS ของเลปโตสไปรามีคุณสมบัติเป็นเอนโดทอกซินต่ำเมื่อเทียบกับ LPS ของแบคทีเรียแกรมลบ (De-Souza and Koury, 1992) มีรายงานว่า LPS ของเลปโตสไปรากระตุ้นเซลล์ผ่านทาง toll-like receptor 2 (TLR2) ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ต่อแบคทีเรียแกรมบวก (Werts *et al.*, 2001) คาดว่าการที่ LPS ของเลปโตสไปราไม่มีความเป็นเอนโดทอกซินต่ำ และกลไกการกระตุ้นเซลล์แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมลบเป็นเพราะว่าโครงสร้างของ lipid A ที่เป็นองค์ประกอบมีความแตกต่างกัน

โปรตีนและไลโปโปรตีน

มีการค้นพบโปรตีนที่เป็นแอนติเจนหลายชนิด ที่แยกได้จากเลือดของผู้ป่วยที่อยู่ในระยะพักฟื้น และจากการวิเคราะห์พิเศษเซลล์ ด้วย SDS-PAGE แต่เรียกในลักษณะโดยรวมไม่มีการระบุชื่อ (particular cell component) ต่อมาการใช้วิธี immunoprecipitation ศึกษาจำแนกโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ เลปโตสไปรา ทำให้ค้นพบโปรตีน OmpL1 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการผ่านเข้าออกของสาร มีโครงสร้างในรูปแบบ trimeric form บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (Haake *et al.*, 1993; Shang *et al.*, 1995) ต่อมาพบไลโปโปรตีนอีก 2 ชนิด คือ LipL36 และ LipL41 ใน *L. kirschneri* พบว่า LipL36 มีปริมาณมากในช่วงระยะแรกของ long phase ของการเจริญเติบโต แต่ไม่พบเมื่อเลี้ยงให้เจริญในไตของหนูทดลอง (Haake *et al.*, 1998) ในขณะที่ LipL32 OmpL1 LipL41 และ LPS มีการแสดงออกในระหว่างการเจริญในไตของหนู (Barnett *et al.*, 1999; Haake, 2000; Haake *et al.*, 2000)

LipL41 และ OmpL1 เป็นส่วนประกอบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีการอนุรักษ์ไว้สูงในเลปโตสไปราชนิดก่อโรค (Shang *et al.*, 1996) และเป็นครั้งแรกที่ได้นำแอนติเจนคู่นี้เชื่อมรวมกัน ซึ่งสามารถใช้ป้องกันการตายของหนูตะเภาที่ฉีดเชื้อเลปโตสไปราชนิดที่เป็น virulent (Haake *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ไลโปโปรตีนในแบคทีเรียแกรมลบมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์สำหรับใช้ในกระบวนการขนส่งและกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ แตกต่างจากไลโปโปรตีนในสไปโรชีต (Haake, 2000)

แฟลกเจลลา

จากการวิเคราะห์แฟลกเจลลาของเลปโตสไปรา พบจุดที่มีขนาดประมาณ 33-34 kDa บน polyacrylamine gel electrophoresis เกิดปฏิกิริยาได้กับ anti-leptospiral และ anti-flagella ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของแกนกลางของแฟลกเจลลา (Kelson *et al.*, 1988) ต่อมาพบว่าโปรตีนทั้งหมด 7 ชนิด ที่แตกต่างกัน เช่น โปรตีนที่มีขนาด 34 kDa ซึ่งอยู่ร่วมกับแกนกลางของแฟลกเจลลา และโปรตีนที่มีขนาด 36 kDa ซึ่งอยู่ร่วมกับส่วนของ sheath filament เป็นต้น (Trueba *et al.*, 1992) สามารถโคลนยีน *Flab* จากเชื้อ *L. borgpetersenii* ซีโรวาร์ Hardjo และสามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* โดยพบว่าโปรตีน FlaB มีขนาด 32 kDa ลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน FlaB homologues ของ *T. pallidum* แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก (Mitchison *et al.*, 1991) และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FlaB* ในซีโรวาร์ Hardjobovis Hardjoprajitno และ Grippotyphosa แสดงให้เห็นว่ามีความเหมือนกันสูง โดยที่โปรตีน FlaB สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับ anti-Grippotyphosa และ anti-Hardjobovis (Woodward and Redstone, 1994)

Heat shock proteins

heat shock proteins เป็นโปรตีนที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่าปกติ หรือมีสภาวะเครียด โดยทั่วไปแล้วมีคุณสมบัติเป็น immunogen ในเลปโตสไปรา มีการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เรียบร้อยแล้วจำนวน 2 โอเพอรอน (operon) ที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง heat shock proteins คือ GroE และ DnaK (Ballard *et al.*, 1998; Ballard *et al.*, 1993) เป็นที่น่าสนใจมาก เกี่ยวกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในโอเพอรอนดังกล่าว โดยมีลักษณะการควบคุมทั้งของแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก โปรตีน GroEL มีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนเจน ที่พบในระหว่างการติดเชื้อของคนและสัตว์ แต่ในขณะเดียวกันไม่ได้มีบทบาทหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อต่อต้านการติดเชื้อ

สารพันธุกรรมของเชื้อเลปโตสไปรา

จีโนมของเลปโตสไปรา

การคำนวณหาขนาดของจีโนมของเลปโตสไปราเริ่มแรกมาจากการทำ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ของดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* *NheI* และ *ApaI* ซึ่งพบว่า มีขนาดประมาณ 5 เมกะเบส (megabase) (Baril and Saint Girons, 1990) ต่อมา ก็มีการศึกษามากขึ้น โดยการทำ physical map และ genetic map ของเชื้อ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Pomona ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NotI* และ *SstI* ซึ่งพบว่าจีโนมประกอบด้วยดีเอ็นเอวงแหวนสายคู่ 2 วง มีขนาดต่างกัน รวมกันแล้วมีจีโนมขนาดโดยประมาณ 4.5 เมกะเบส และขนาดใกล้เคียงกับซีโรวาร์ *Icterohaemorrhagiae* (Zuerner, 1991) แต่ในปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งจีโนมของ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Lai และ Copenhageni สำเร็จ ซึ่งซีโรวาร์ Lai โครโมโซมขนาดใหญ่ (CI) มีขนาด 4,332,741 คู่เบส และโครโมโซมขนาดเล็ก (CII) มีขนาด 358,943 คู่เบส มียีนรวมกันอยู่ประมาณ 4,768 ยีน (Ren *et al.*, 2003) ส่วนซีโรวาร์ Copenhageni โครโมโซมใหญ่มีขนาด 4,277,185 คู่เบส โครโมโซมเล็กมีขนาด 350,181 คู่เบส มียีนรวมกันอยู่ประมาณ 3,770 ยีน (Nascimento *et al.*, 2004b) จากการนำจีโนมทั้งสองซีโรวาร์มาเปรียบเทียบกัน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันร้อยละ 95 แต่พบจำนวนยีนบนแต่ละโครโมโซมมีความแตกต่างกัน เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ LPS ในส่วนของ O-side chain จำนวน insertion element และจำนวนชุดของยีน 23S rRNA (Nascimento *et al.*, 2004a)

ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ rRNA (ribosomal RNA)

โดยทั่วไปยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ rRNA ในแบคทีเรียมีลักษณะเรียงตัวเป็นโอเพอรอน แต่เลปโตสไปรา พบว่ามียีนอยู่กระจัดกระจายบนโครโมโซมขนาดใหญ่ โดยมียีน *rrl* *rrs* และ *rrf* ควบคุมการสังเคราะห์ 23S rRNA 16S rRNA 5S rRNA ตามลำดับ เหมือนในแบคทีเรียปรสิติชนิดอื่น ๆ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Copenhageni และ Canicola พบว่ายีน *rrl* และ *rrs* มีอย่างละ 2 ชุด ซึ่งต่างจากซีโรวาร์ Lai ที่พบยีน *rrs* 2 ชุด แต่มียีน *rml* เพียงชุดเดียวเท่านั้น ส่วนยีน *rrf* ทั้งสามซีโรวาร์มีเพียงชุดเดียวเหมือนกัน และมีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีน *rrs* และ *rml* ส่วนในชนิดไม่ก่อโรค (*L. biflexa*) มียีน *rrf* จำนวน 2 ชุด (Fukunaga *et al.*, 1989; Fukunaga and Mifuchi, 1989a; Fukunaga and Mifuchi, 1989b; Nascimento *et al.*, 2004a; Ren *et al.*, 2003) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rrs* ของซีโรวาร์ Copenhageni Lai และ Canicola แสดงให้เห็นว่า มีความเหมือนกันถึงร้อยละ 99.9-100 ส่วนยีน *rml* และ *rrf* ของซีโรวาร์ Lai กับ Copenhageni มีความเหมือนกันร้อยละ 99 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้งสองซีโรวาร์มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกันมาก (Nascimento *et al.*, 2004a)

L. borgpetersenii ซีโรวาร์ Hardjo และ Balcania มี 23S rRNA ที่สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 14S rRNA และ 17S rRNA ซึ่งพบได้ยากในพวกโพรคาริโอต (prokaryote) (Hsu *et al.*, 1990) โครงสร้างปฐมภูมิและโครงสร้างทุติยภูมิของ 5S rRNA เหมือนกันในเลปโตสไปราชนิดก่อโรคและแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ โดยที่ยีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้าง 5S rRNA มีเพียง 1 ชุด ภายในจีโนม และลอกรหัสเป็น 117-nucleotide RNA molecule ที่มีส่วน A+T rich บริเวณทางด้านปลาย 5' และ 3' ของยีน และมี promoter อยู่ทางด้าน 5' ของยีน (Fukunaga *et al.*, 1990)

Insertion sequence (IS)

เป็นหน่วยพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่มีขนาดไม่เกิน 2.5 กิโลเบส กระจายอยู่ทั่วไปบนจีโนมของแบคทีเรีย มักจะมียีนที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ transposase และ recombinase เป็นส่วนหนึ่งของบริเวณนี้ด้วย ซึ่งทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายและการแทรกตัวเข้าไปยังตำแหน่งต่าง ๆ บนจีโนม ตามลำดับ ดังเช่น *L. borgpetersenii* มี IS1533 จำนวนหลายชุดบนจีโนม และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ transposase และ recombinase โดยทดสอบแล้วสามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* (Zuerner, 1994) ต่อมาก็มีรายงานใน *L. interrogans* ด้วย

IS มีคุณสมบัติต่างจาก transposon เนื่องจาก transposon ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายยีนอื่น ๆ ในขณะที่ IS-element ทำหน้าที่ย้ายตำแหน่งตัวเองและเข้าไปแทรกตัวในตำแหน่งอื่น ๆ ซึ่งอาจจะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนต่าง ๆ หรืออาจจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนเกิดขึ้น ถ้าหากย้ายไปอยู่ในบริเวณ intergenic region ดังเช่น IS1533 ของ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Hardjo พบอยู่ในตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ LPS (*rfb* locus) แต่อยู่ในบริเวณที่เป็น intergenic region (de la Pena-Moctezuma *et al.*, 1999; Kalambaheti *et al.*, 1999) *L. interrogans* ซีโรวาร์ Icterohaemorrhagiae (strain Icterо No.I) พบว่ามี IS1500 แทรกอยู่ในตำแหน่ง ORF35 ของ *rfb* locus ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าเป็นยีนสำหรับสร้างโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยเหตุนี้อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โครงสร้างของ LPS แตกต่างกัน (de la Pena-Moctezuma *et al.*, 2001)

IS1500 พบอยู่บนโครโมโซมขนาดใหญ่ของเลปโตสไปราชนิดก่อโรคเท่านั้น (Boursaux-Eude *et al.*, 1995) และได้มีการนำ IS1500 ไปใช้ศึกษา fingerprint ที่เกิดขึ้นเพื่อใช้จำแนกเลปโตสไปรา (Zuerner and Bolin, 1997) นอกจากนี้ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของ *L. interrogans* ซีโรวาร์ Lai และ Copenhageni ทำให้ทราบว่าจีโนมประกอบไปด้วย IS-element ต่าง ๆ ดังนี้ คือ IS1500 IS1501 IS1502 IS1533 และ ISlin ซึ่งพบอยู่บริเวณ intergenic region (Nascimento *et al.*, 2004a; Ren *et al.*, 2003)

ระบบการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม (genetic exchange system)

การศึกษาวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเลปโตสไปรา ยังเป็นอุปสรรคมากสำหรับนักวิทยาศาสตร์ เนื่องจากขาดวิธีการทางพันธุวิศวกรรมที่มีประสิทธิภาพที่จะนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ หรือการดัดแปลงสารพันธุกรรมเพื่อศึกษาการทำงานของยีนต่าง ๆ นับตั้งแต่ปี ค.ศ.1960 มีรายงานพบ bacteriophage ในเลปโตสไปราแต่ไม่ได้รับความสนใจ จนมาถึงปี ค.ศ.1990 Saint และคณะได้แยกและจำแนก bacteriophage ได้ แต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน เพราะมันสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะเลปโตสไปราชนิดไม่ก่อโรคเท่านั้น โดยสามารถนำ phageLE1 มาใช้สร้างเป็น *L. biflexa*-*E. coli* plasmid shuttle vector (pGKLep40) ได้เป็นครั้งแรก (Girons *et al.*, 2000) ผลจากการสร้างพลาสมิด (plasmid) ดังกล่าวได้ทำให้มีการศึกษาโดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *FlaB* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน FlaB ที่เป็นส่วนประกอบของแฟลกเจลลาใน *L. biflexa* (Picardeau *et al.*, 2001)

ยีนที่ควบคุมการสร้าง heat shock proteins

จากการใช้อุณหภูมิกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง heat shock proteins แสดงให้เห็นว่ามีผลแตกต่างกันในเลปโตสไปราชนิดก่อโรคและไม่ก่อโรค รวมทั้งสไปโรชีตชนิดอื่น ๆ ด้วย ยีน *groEL* และ *dnaK* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน GroEL และ DnaK ตามลำดับ ยีนทั้งสองนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในกลุ่มสไปโรชีต (Stamm *et al.*, 1991) โดยมี sigma³² หรือ CIRCE (controlling inverted repeat of chaperone expression) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *groEL* หรือ *groEL* operon ซึ่งเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกตามลำดับ (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991; Zuber and Schumann, 1994) ในส่วนของ *dnaK* locus ประกอบไปด้วยยีน *HrcA*, *grpE*, *dnaK* และ *dnaJ* พบว่ามี CIRCE-element อยู่ทางด้านปลาย 5' ของตำแหน่งนี้ (Ballard *et al.*, 1998)

วัคซีนและการป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิส

การป้องกันโรคเลปโตสไปโรซิสทำได้โดยการควบคุมสุขอนามัยในขณะปฏิบัติงาน เช่น การใช้เครื่องนุ่งห่ม หลีกเลี่ยงการสัมผัสปัสสาวะ หรือน้ำทิ้ง และการเดินทางในที่เปียกชื้น แต่ไม่เป็นที่ยอมรับจากคนงานต่อการปฏิบัติ เพราะทำให้เกิดความยุ่งยากในการทำงาน การป้องกันโรคในคนและสัตว์โดยการทำวัคซีนเริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1920 โดยผลิตวัคซีนมาจากการนำเซลล์เลปโตสไปราฆ่าด้วยวิธีการแตกต่างกัน เช่น การให้ความร้อน การใช้ฟอร์มาลิน ฟีนอล และรังสี เป็นต้น บางครั้งการใช้เลปโตสไปราทั้งตัวเซลล์เป็นวัคซีน ซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียง จึงได้มีความพยายามที่จะลดผลข้างเคียงด้วยการสกัดส่วนประกอบต่าง ๆ มาใช้แทนการใช้ทั้งตัวเซลล์ (Koizumi and Watanabe, 2005)

อย่างไรก็ตามในประเทศจีนมีการใช้วัคซีนในคนเนื่องจากมีประชากรจำนวนมากเสี่ยงต่อการเป็นโรคเลปโตสไปโรซิส เนื่องจากน้ำท่วมบ่อย รวมทั้งประเทศญี่ปุ่นและเวียดนาม โดยทั่วไปแล้ววัคซีนที่ใช้สามารถป้องกันเชื้อเลปโตสไปราได้ประมาณ 2-3 ซีโรวาร์เท่านั้น และเป็นซีโรวาร์ที่มีการระบาดในพื้นที่นั้น ๆ จึงไม่ค่อยมีการนำเข้าวัคซีนป้องกันโรคมาจากต่างประเทศ การให้วัคซีนมักจะให้ทางใต้ผิวหนัง หรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ห่างกัน 3-4 สัปดาห์ และทำซ้ำเป็นประจำทุกปี การทำวัคซีนกับปศุสัตว์ สามารถลดการกระจายผ่านทางปัสสาวะ และลดความเสี่ยงที่เกิดขึ้นกับคนเลี้ยง นอกจากนี้การทำวัคซีน การแพร่กระจายของเชื้อยังมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับการศึกษา ภูมิภาวะ ความสะอาดในชุมชน และการประชาสัมพันธ์จากหน่วยงานของรัฐด้วย จากการทำวัคซีนให้กับแม่สุกรสามารถป้องกันลูกสุกรเกิดโรคได้ แต่ก็ไม่สามารถป้องกันได้จนถึงตัวเต็มวัย เพราะภูมิคุ้มกันที่ถ่ายทอดมาจากแม่จะเสื่อมลง (Miller *et al.*, 1990) การหาวิธีการทำวัคซีนในรูปแบบอื่น เพื่อให้สามารถต้านทานโรคเลปโตสไปโรซิสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้องมีการศึกษากันต่อไป เช่น การใช้ LPS epitope การใช้โปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบไฮบริดกัน ซึ่งล้วนแล้วแต่กระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดสารนำ สิ่งที่น่าสนใจ ภูมิคุ้มกันแบบฟิงเซลล์นั้นยังไม่ได้มีการศึกษาและพัฒนาสร้างเป็นวัคซีนเกิดขึ้นในปัจจุบัน

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในห้องปฏิบัติการมีความสำคัญ เนื่องจากอาการของโรคไม่มีความจำเพาะทั้งในคนและสัตว์ การย้อมสีเพื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เหมือนกับแบคทีเรียทั่วไปทำได้ยาก เนื่องจากมีขนาดเล็ก ต้องใช้สีย้อมชนิดพิเศษ และต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์แบบพื้นมืด (dark field microscope) การเพาะเลี้ยงเชื้อก็ต้องใช้เวลาาน เพราะเชื้อเจริญเติบโตช้า และเลี้ยงได้ในอาหารเหลวเท่านั้น ดังนั้นจำเป็นต้องค้นหาวิธีการหรือเทคนิคใหม่ ๆ โดยเฉพาะเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยามาใช้

การตรวจหาเชื้อโดยตรง

ปัจจุบันใช้กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นมืด ตรวจดูลักษณะรูปร่าง และการเคลื่อนที่ ซึ่งเลปโตสไปรา มีขนาดเล็ก เคลื่อนที่รวดเร็วเหมือนเกลียวหมุน ขณะที่หยุดเคลื่อนที่หรือมีการเคลื่อนที่ช้า ๆ จะมีลักษณะด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านโค้งคล้ายตะขอกว้าง วิธีที่สองเป็นการตรวจโดยการย้อมสีทาง immunology ซึ่งช่วยให้ตรวจเชื้อได้ง่ายขึ้นในกรณีที่มีเชืื่อน้อย ๆ โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อซีโรวาร์ หรือซีโรกรุป แล้วใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงแล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence หรือการย้อมด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น immunogold immunoperoxidase วิธีการสุดท้ายของการตรวจโดยตรง เป็นการตรวจโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ จากสิ่งตรวจที่มักจะใช้ น้ำไขสันหลัง ปัสสาวะ หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการผ่าตัด ใช้เวลาเลี้ยงนานถึง 4 สัปดาห์ และเมื่อทราบผลแล้วต้องนำมาตรวจซ้ำอีกทีว่าเป็นซีโรวาร์ก่อโรคหรือไม่ก่อโรค ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เป็นวิธีการที่ยุ่งยากมาก จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมของห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการทางซีรั่มวิทยา

การตรวจด้วยวิธีนี้เป็น การตรวจหาแอนติบอดีในเลือดผู้ป่วยหรือสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ซึ่งตรวจพบได้หลังจากได้รับเชื้อแล้ว 2-3 วันขึ้นไป วิธีที่ใช้ในการตรวจ เช่น microscopic agglutination test (MAT) เป็นวิธีที่นิยมแต่ก็มีความยุ่งยากในการเตรียมและใช้เวลานาน กว่าจะทราบผล ส่วนอีกวิธีที่เป็นที่นิยมเช่นกัน คือ enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในระยะแรกของการได้รับเชื้อ เพราะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะต่อชนิดเชื้อ ซึ่งเป็นการตรวจวัดระดับ IgM ที่อาจจะพบได้ก่อนการตรวจด้วยวิธี MAT หรืออาจจะตรวจหา IgG ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังการติดเชื้อ

การตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

ปัจจุบันเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยามีความเจริญก้าวหน้าเป็นอย่างมาก เทคนิคพีซีอาร์เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะต่อเชื้อที่ก่อให้เกิดชนิดต่าง ๆ มีการนำเทคนิคพีซีอาร์มาใช้ในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราในตัวอย่างต่าง ๆ หลายแบบ เช่น เลือด ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อจากอวัยวะชนิดต่าง ๆ ซึ่งให้ผลรวดเร็วและมีความไวสูง (Levett, 2001) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อเลปโตสไปราด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้น ประกอบด้วย ยีน 16S rRNA และ 23S rRNA (Hookey, 1992; Merien *et al.*, 1992) IS element (Zuerner *et al.*, 1995) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ทราบหน้าที่ ซึ่งได้มาจากการสุ่มมาจาก genomic libraries (Gravekamp *et al.*, 1993) เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ง่ายและสะดวก แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อเลปโตสไปราได้ในระดับซีโรวาร์ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอใหม่ ๆ ที่มีความจำเพาะในระดับซีโรวาร์ เพื่อเป็นประโยชน์ที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการรักษาโรคและพัฒนาสร้างเป็นวัคซีนต่อไป

Leucine-Rich Repeat (LRR)

LRR ถูกค้นพบครั้งแรกจากลำดับกรดอะมิโนของ α 2-glycoprotein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่และพบอยู่ในซีรั่มของคน (Takahashi *et al.*, 1985) ตั้งแต่นั้นมาก็มีรายงานพบ LRR ในโปรตีนอีกหลายชนิด ที่มีหน้าที่และตำแหน่งบริเวณภายในเซลล์ต่างกัน (Kobe and Deisenhofer, 1995) LRR มีลักษณะเป็นชุดซ้ำ โดยที่จำนวนชุดซ้ำมีตั้งแต่ชุดเดียว ที่พบใน platelet glycoprotein IbB ไปจนถึง 30 ชุดซ้ำ ที่พบใน chaoptin โปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบส่วนใหญ่มีความยาวของกรดอะมิโนของ LRR แต่ละชุดซ้ำจำนวน 24 residues แต่ก็พบบ้างที่มีความยาวมากกว่าหรือน้อยกว่านี้ แต่ละชุดซ้ำมีลำดับชนิดกรดอะมิโนไม่แน่นอน ยกเว้นกรดอะมิโนลูซีน ที่มีมากกว่ากรดอะมิโนตัวอื่น และมีตำแหน่งที่จำเพาะเหมือน ๆ กัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งทางด้านปลาย N-terminal ของชุดซ้ำนี้ (LxxLxL)

ส่วนตำแหน่งอื่นที่เหลือ จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับโปรตีนแต่ละชนิด (Kedzierski *et al.*, 2004) กรดอะมิโนจำนวน 24 residue ที่พบในโปรตีนต่าง ๆ พบว่าในแต่ละชุดซ้ำมักจะมีกรดอะมิโนลูซีนหรือกรดอะมิโนพวก aliphatic ชนิดอื่น ๆ ในตำแหน่งที่ 2 5 7 12 16 21 และ 24 อีกอย่างหนึ่งมักจะพบกรดอะมิโน asparagine cysteine และ threonine ในตำแหน่งที่ 10 โดยที่ยังไม่ทราบหน้าที่และความสำคัญของตำแหน่งนี้ (Kobe and Deisenhofer, 1994)

มีสมมุติฐานคาดว่า LRR เกิดขึ้นมาจากการเกิด exon duplication และมีการสับเปลี่ยนที่กัน โดยที่ 1 exon เทียบได้กับ 1 LRR ตัวอย่างเช่น ในยีน gonadotrophin receptor ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of exon หลาย exon ที่สอดคล้องกับส่วนของ LRR (Koo *et al.*, 1991) กลไกการวิวัฒนาการหรือการเกิดขึ้นของโปรตีนที่มีส่วน LRR คล้าย ๆ กับเกิดขึ้นมาจากการเกิด unequal crossover และ duplication ของยีน โดยมีแนวทางที่น่าจะเป็นไปได้ 2 แนวทางคือ แนวทางแรก เริ่มต้นจาก LRR ค่อย ๆ เกิดขึ้นมาก่อนแล้วเกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น ทำให้เกิดเป็นกลุ่มยีนเดียวกันขึ้น ซึ่งต่อมามีการเปลี่ยนแปลงจนมีลักษณะเฉพาะตัวเกิดขึ้น ส่วนแนวทางที่สอง LRR เกิดขึ้นมาจากโปรตีนในแต่ละกลุ่มแยกกัน แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องโครงสร้างที่เหมือนกัน ในขณะที่มีลำดับกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ไว้แตกต่างกันเฉพาะตัว ซึ่งในความเป็นจริงแล้ว เรื่องของต้นสายวิวัฒนาการของความยาว LRR แต่ละชุดซ้ำที่พบในโปรตีนชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน และลักษณะเฉพาะตัวของลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ไว้ก็ยังเป็นที่ถกเถียงกัน ซึ่งอาจจะมาจากต้นสายวิวัฒนาการต่างกัน (Kobe and Deisenhofer, 1994)

โครงสร้างและการแบ่งกลุ่มโปรตีนที่มีส่วน LRR

โครงสร้างของโปรตีนที่มีส่วน LRR ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้ว โดยเริ่มศึกษาจาก porcine ribonuclease inhibitor (RI) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโทพลาซึม ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribonuclease โปรตีน RI มี LRR จำนวน 15 ชุดซ้ำ เรียงตัวห่างกันเป็นช่วง ๆ โดยชุดซ้ำที่พบมีลักษณะ 2 แบบ คือ แบบ A-type มีกรดอะมิโนจำนวน 28-residues และแบบ B-type มีกรดอะมิโนจำนวน 29-residues ส่วนที่เป็น LRR domain ในโปรตีน RI มีโครงสร้างประกอบด้วย β -sheet และ α -helix เรียงตัวขนานกับแกนกลาง ทำให้เกิดเป็นลักษณะ nonglobular horseshoe-shape (รูปเกือกม้า) โดยที่ส่วน β -sheet เรียงตัวอยู่ทางด้านในและส่วน α -helix เรียงตัวแนวทางด้านนอก ดังแสดงในภาพที่ 1 (Kobe and Deisenhofer, 1993)

ต่อมาก็มีการศึกษาค้นพบโครงสร้างของโปรตีนที่มีส่วนของ LRR domain ชนิดอื่น ๆ โดยที่ความยาวและจำนวนชุดซ้ำของ LRR แตกต่างกัน (ดังแสดงในภาพผนวกที่ 1) ข้อมูลปัจจุบันนี้ สามารถแบ่งกลุ่มความแตกต่างของโปรตีนที่มีส่วนของ LRR ออกเป็น 7 กลุ่ม (subfamilies) โดยอาศัยความยาว

ของ LRR แต่ละชุดซ้ำ และลำดับกรดอะมิโนที่มีการอนุรักษ์ไว้ (conserve sequence) ประกอบด้วยดังนี้
 tryptical, ribonuclease inhibitor (RI)-like, cysteine-containing, plant-specific, SDS22-like, bacterial
 type และ TpLRR (ดังแสดงในตารางที่ 1) (Kobe and Kajava, 2001)

หน้าที่และความสำคัญของ LRR ในโปรตีนที่พบใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

โปรตีนที่มีส่วน LRR ที่พบทั้งหมดทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด protein-protein interaction ที่เกิดขึ้นในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ตัวอย่างเช่น DNA repair, cell adhesion, signal transduction, development, transcription และ RNA processing เป็นต้น (Buchanan and Gay, 1996; Kobe and Deisenhofer, 1995) ข้อมูลปัจจุบันนี้แสดงให้เห็นว่า LRR ไม่มีลักษณะที่เชื่อมโยงชัดเจนระหว่าง ligands กับ receptors แต่อย่างไรก็ตาม LRR ทำหน้าที่เป็น versatile binding motif ที่ส่งเสริมให้ ligands มาจับและเกิดปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ส่วน LRR ถูกใช้ประโยชน์ทั้งในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์และพวกจุลินทรีย์ โดยโฮสต์ใช้เพื่อจดจำโมเลกุลที่ทำให้เกิดโรค (pathogen molecule หรือ pathogen-specific molecular pattern) ในขณะที่จุลินทรีย์ใช้เพื่อจับกับเซลล์ของโฮสต์ หรือเพื่อให้สามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของโฮสต์ได้ (Cohn, 2002) ลักษณะโครงสร้างที่เป็น nonglobular-shape ของ LRR อาจจะเป็นตัวช่วยในการจับกันของโปรตีนเพราะโครงสร้างดังกล่าวมีพื้นที่สำหรับการเกิด interaction กับพวก small globular protein เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการจับง่ายขึ้นและมี affinity เพิ่มสูงขึ้นด้วย

พืช

ปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮสต์กับจุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตหรือพวกก่อโรค เป็นผลมาจากผลผลิตของยีนที่แสดงออกมาจากเชื้อจุลินทรีย์กับผลผลิตของยีนที่มาจากตัวโฮสต์เอง (host-resistance หรือ R-gene) ซึ่งโฮสต์สามารถตอบสนองต่อการเข้ามาบุกรุกของพวกจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี การบกพร่องของ R-gene หรือโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งที่มาจาก R-gene จะทำให้โฮสต์เกิดโรค สิ่งที่น่าสนใจ ในส่วนของ R-gene คือ โปรตีนที่มาจาก R-gene มักจะมีส่วน LRR ปรากฏอยู่เสมอ ๆ โปรตีนที่เป็นผลผลิตของ R-gene ในพืชที่พบมากที่สุด คือ cytoplasmic nucleotide-binding site (NBS)-LRR โปรตีน NBS-LRR สามารถที่จะรวมเป็นสารเชิงซ้อนกับโปรตีนชนิดอื่น ๆ ซึ่งทำหน้าที่เหมือนเป็น receptor สำหรับจับกับ ligands ที่มาจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรีย ผลผลิตของ R-gene ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีส่วน LRR ยื่นออกมานอกเซลล์ ความจำเพาะของ R-gene ในพืชมีข้อจำกัดอยู่ในส่วนของ LRR ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการจับกับพวก ligands โดยทางตรงหรือโดยทางอ้อมก็ได้ (Ellis *et al.*, 2000) นอกจากนี้แล้วยังพบ polygalacturonase-inhibiting protein

(PGIP) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม plant-specific LRR subfamily ซึ่งทำหน้าที่ต่อต้านการเกิดโรคของพืชจากเชื้อรา ด้วยการจับกับเอ็นไซม์ polygalacturonase ที่หลั่งออกมาจากเชื้อโรค (Federici *et al.*, 2006)

สัตว์

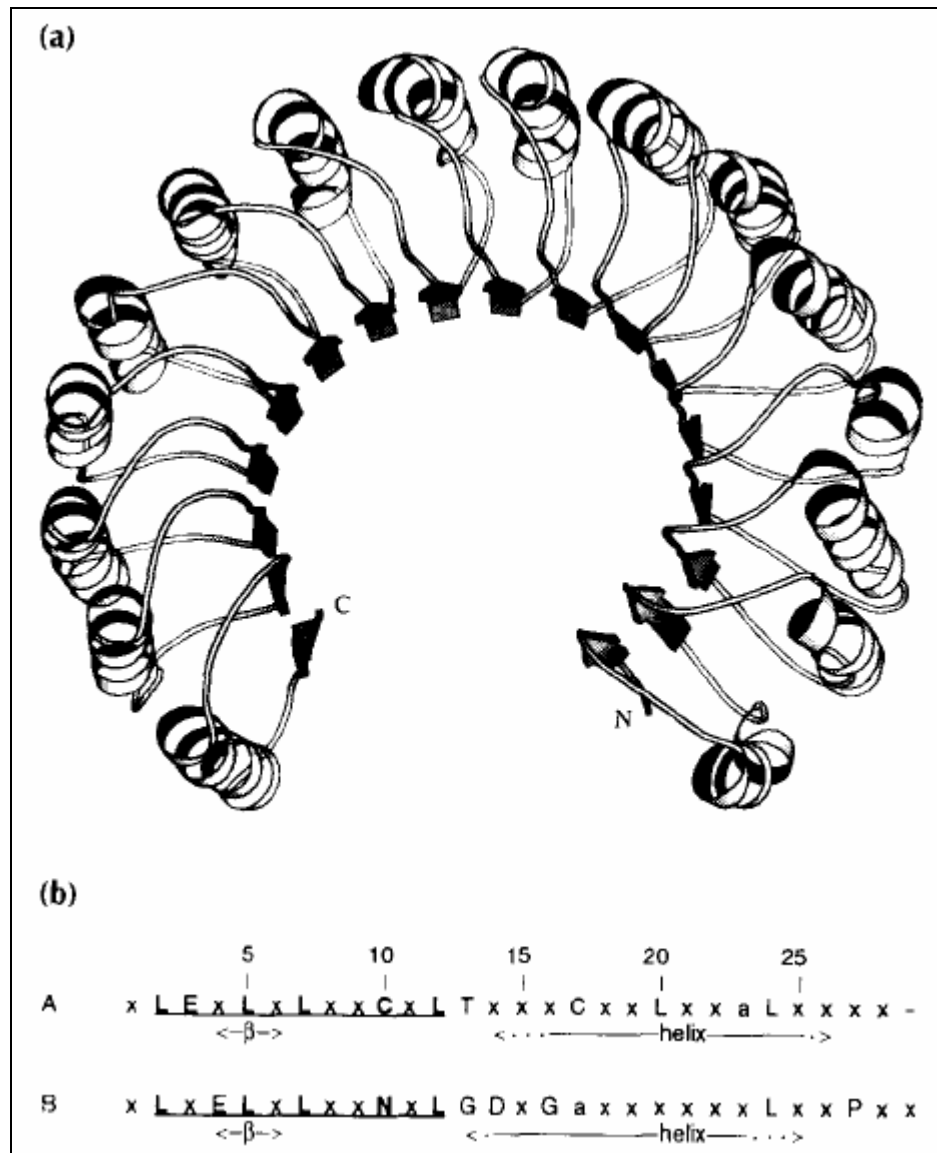
toll-like receptor (TLR) พบครั้งแรกในแมลงหวี่ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านการเกิดเชื้อราและแบคทีเรีย (Hedengren *et al.*, 1999; Lemaitre *et al.*, 1996; Mengaud *et al.*, 1996) เป็นส่วนหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ TLR มีการแสดงออกในเซลล์หลายชนิด ดังเช่น monocytes, macrophage, dendritic cell และ mast cell (Takeda *et al.*, 2003) โครงสร้างของโปรตีน TLR ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ extracellular LRR-domain และ Toll/TLI receptor (TIR) domain โดยที่ LRR เป็นส่วนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจดจำ ligands รวมทั้งกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โปรตีน TLR สามารถจับกับโมเลกุลที่มาจากจุลินทรีย์หลายชนิด ที่ส่งผลกระทบระบบภูมิคุ้มกันของตัวโฮสต์ ดังเช่น ไลโปโปรตีน ไลโปปอลิแซคคาไรด์ เพปติโดไกลแคน และแฟลกเจลลา เป็นต้น (Underhill and Ozinsky, 2002) มีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่คล้ายกับ TLR คือ nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) protein แต่แตกต่างกันที่ NOD เป็นโปรตีนที่อยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ ปัจจุบันจำแนกโปรตีนที่พบในกลุ่มโปรตีน NOD ได้ 2 ชนิด คือ NOD1 และ NOD2 ทั้งสองมีโครงสร้างสอดคล้องกับโปรตีน NBS-LRR ที่พบในพืช โครงสร้างประกอบด้วย caspase-recruitment domain (CARD) NOD domain และ LRR domain ซึ่งพบอยู่ด้านปลาย carboxyl (Inohara and Nunez, 2003) โดยที่ LRR มีหน้าที่เหมือนกับใน TLR นอกจากนี้แล้ว โปรตีนในไซโทพลาซึมที่พบอีกกลุ่ม คือ NALPS subfamily มีโครงสร้างคล้ายกับ NBS-LRR และ NOD2 แต่วางกันที่ NALP มี PYD domain แทนที่ CARD domain ที่พบใน NOD2 (Chamaillard *et al.*, 2003) โปรตีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการชักนำให้เกิดการอักเสบและการเกิดเป็นสารเชิงซ้อน เรียกว่า “flamosome” กลไกการทำงานของ NALP ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่า LRR เป็นส่วนสำคัญของการถูกกระตุ้นจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์

ในขณะที่พืชและสัตว์ใช้ส่วนที่เป็น LRR เพื่อป้องกันตัวเองหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยมีหน้าที่เป็นส่วนจดจำโมเลกุลที่เป็น pathogen-associated molecular patterns (PAMP) ของจุลินทรีย์ และเป็นส่วนหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะเจาะจง แต่ในทางตรงกันข้ามกลุ่มจุลินทรีย์หรือโปรโตซัวก่อโรคหลายชนิดใช้ส่วน LRR เพื่อให้สามารถบุกรุกเซลล์ของโฮสต์หรือใช้ยับยั้งกลไกการป้องกันตัวเองของโฮสต์แทน

Internalin (Inl) เป็นโปรตีนที่มีส่วน LRR พบในเชื้อ *Listeria monocytogenes* และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยโปรตีนในกลุ่มนี้มีอย่างน้อย 9 ชนิด ที่มี LRR แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยกรดอะมิโน 22 residue และมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการบุกรุกเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ตัวอย่างเช่น InlA และ InlB เป็นโปรตีนในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษากันมากที่สุด InlA ทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการเข้าไปภายในเซลล์เยื่อบุผิว ขณะที่ InlB เป็นตัวช่วยสนับสนุนการบุกรุกเข้าไปในเซลล์ hepatocytes, fibroblast และ endothelial cell (Lingnau *et al.*, 1995) ส่วนของ LRR ใน InlB เป็นบริเวณที่มีผลต่อการบุกรุกเข้าไปในเซลล์โฮสต์ และเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Marino *et al.*, 1999) เป็นที่น่าสนใจว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนของ LRR ใน InlB สามารถยับยั้งการบุกรุกเซลล์โดยเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ (Mengaud *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่มีส่วน LRR ในเชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน YopM จากเชื้อ *Y. pestis* (Leung and Straley, 1989) โปรตีน SspH1, SspH2 และ SlrP จากเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Miao *et al.*, 1999) โปรตีน IpaH จากเชื้อ *Shigella flexneri* (Hartman *et al.*, 1990) และโปรตีน TpLRR จากเชื้อ *T. pallidum* (Shevchenko *et al.*, 1997) โปรตีน YopM มีบทบาทสำคัญในระยะแรกของการติดเชื้อ *Y. pestis* และทำหน้าที่เกี่ยวกับ thrombin-binding activity ส่วนโปรตีนที่พบในจุลินทรีย์ในลำไส้ *Salmonella sp.* หรือ *Shigella sp.* มีหน้าที่เกี่ยวกับการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่อยู่ในกลุ่ม nuclear factor (NF)-kB-dependent และช่วยสนับสนุนให้แบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่และเพิ่มจำนวนได้ในเนื้อเยื่อของโฮสต์ (Haraga and Miller, 2003)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ porcine ribonuclease inhibitor protein (RI) (a) เป็นโครงสร้างตติยภูมิที่สร้างจากโปรแกรม MOLSCRIPT (b) แสดงโครงสร้างทุติยภูมิและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของส่วน LRR ซึ่งมี 2 แบบคือ แบบ A และ แบบ B โดยที่ “x” แสดงถึงกรดอะมิโนชนิดใดก็ได้ “a” แสดงถึงกรดอะมิโนในกลุ่ม aliphatic amino acid ในส่วนที่มีการขีดเส้นใต้เป็นส่วนที่มีการอนุรักษ์ไว้มากกว่าบริเวณอื่น

ที่มา: Kobe and Deisenhofer (1995)

ตารางที่ 1 กลุ่มย่อยของโปรตีนที่มีส่วน LRR และลักษณะชุดซ้ำของกรดอะมิโนในส่วนที่มีการอนุรักษ์ของแต่ละกลุ่ม

LRR subfamily	Typical LRR length (range)	Organism origin	Cellular location	Structures available
RI-like	28–29 (28–29)	Animals	Intracellular	RI, rna1p
SDS22-like	22 (21–23)	Animals, fungi	Intracellular	U2A', TAP, RabGGT, LC1, InlB
Cysteine-containing	26 (25–27)	Animals, plants, fungi	Intracellular	Skp2
Bacterial	20 (20–22)	Gram-negative bacteria	Extracellular	YopM
Typical	24 (20–27)	Animals, fungi	Extracellular	No
Plant-specific	24 (23–25)	Plants, primary eukaryotes	Extracellular	No
TpLRR	23 (23–25)	Bacteria	Extracellular	No

Consensus sequence*																														
RI-like	x	x	x	L	x	x	L	x	L	x	x	N/C	x	L	x	x	x	g	o	x	x	L	x	x	o	L	x	–	x	
SDS22-like	L	x	x	L	x	x	L	x	L	x	x	N	x	I	x	x	I	x	x	L	x	–	x							
Cysteine-containing	c	x	x	L	x	x	L	x	L	x	x	c	x	–	x	I	T	D	x	x	o	x	x	L	a	x	–	x		
Bacterial	P	x	x	L	x	x	L	x	V	x	x	N	x	L	x	x	L	P	e/d	L	–									
Typical	L	x	x	L	x	x	L	x	L	x	x	N	x	L	x	x	L	p	x	x	o	F	x	–	x					
Plant-specific	L	x	–	x	L	x	x	L	x	L	x	x	N	x	L	t/s	g	–	x	I	P	x	x	L	G	x				
TpLRR	C/N	x	–	x	L	x	x	I	x	L	x	–	x	x	L	x	x	I	g	x	x	A	F	x	x					

*Residues identical or conservatively substituted in more than 50% and 30% of the repeats of a given protein are shown in uppercase and lowercase, respectively. Residues directed into the interior of the known protein structures or models are shown in boxes in bold. '–', possible insertion site; o, a nonpolar residue; x, any residue.

ที่มา: Kobe and Kajava (2001)