

**COMPARISON OF THE SENSITIVITIES OF PCR METHODS
FOR GENOTYPING OF *GIARDIA DUODENALIS***

KWANNAN NANTAVISAI

**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 974-04-7480-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเปรียบเทียบความไวของ PCR วิธีต่างๆในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อจิวาร์เดียดูโอดีนาลิส
(COMPARISON OF THE SENSITIVITIES OF PCR METHODS FOR
GENOTYPING OF *GIARDIA DUODENALIS*)

ขวัญนันท์ นันทวิสัย 4736167 SCMI/M
วท.ม. (จุฬารัตนาวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พิรพรรณ ดันอารีย์, Ph.D., เสาวนีย์ ลีละยูวะ, Ph.D.,
มัทริทุท มุ่งฉันท, Ph.D.

บทคัดย่อ

Giardia duodenalis เป็นโปรโตซัวเซลล์เดียวที่อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด การวินิจฉัยโรคซึ่งเกิดจากเชื้อชนิดนี้โดยทั่วไปยังใช้วิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ การพัฒนากล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์เพื่อนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคสามารถเพิ่มความไวในการตรวจวินิจฉัยได้ อย่างไรก็ตามทั้งสองวิธีดังกล่าวไม่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อชนิดนี้ได้ จึงมีการพัฒนาวิธีการเพิ่มสารพันธุกรรมขึ้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว แม้ว่าวิธีการเพิ่มสารพันธุกรรมและวิธีการสกัดสารพันธุกรรมหลายวิธีได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการตรวจหาเชื้อชนิดนี้ แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบความไวของวิธีการเหล่านี้

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความไวของวิธีสกัดสารพันธุกรรม 3 วิธี ได้แก่ ชุดสกัดสารพันธุกรรมชนิดสำเร็จรูป 2 ชนิด คือ FTA assay และ QIAamp stool mini kit และวิธีสกัดสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิมด้วยสารฟีนอลคลอโรฟอร์ม จากการทดลองพบว่าวิธี FTA assay มีความไวที่สุด โดยสามารถสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อในตัวอย่างอุจจาระได้ถึงแม้ว่ามีเชื้อเพียง 0.6 cysts เท่านั้น เนื่องจากความไวสูงของวิธี FTA assay ดังนั้นวิธีนี้จึงถูกนำมาใช้ในการประเมินความไวของของไพรเมอร์ในการสังเคราะห์สารพันธุกรรมของเชื้อในตัวอย่างอุจจาระและเชื้อจากการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง พบว่าไพรเมอร์ชุด RH11/RH4, GiarF/GiarR ซึ่งใช้จำเพาะกับ SSU gene เป็นไพรเมอร์ที่ให้ผลดีที่สุด และยังสามารถนำไปใช้วิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อได้อีกด้วย นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีการสกัดสารพันธุกรรมและไพรเมอร์ที่มีความไวสูง เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะระหว่างวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและวิธีกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ จากการศึกษพบว่าวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมมีความไวสูงถึง 97.30% และมีความจำเพาะ 100% ในขณะที่วิธีวิธีกล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนซ์มีความไว 91.9% และมีความจำเพาะ 100% เช่นเดียวกัน ซึ่งทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.61$)

COMPARISON OF THE SENSITIVITIES OF PCR METHODS FOR GENOTYPING OF *GIARDIA DUODENALIS*

KWANNAN NANTAVISAI 4736167 SCMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS : PEERAPAN TAN-ARIYA, Ph.D.,
SAOVANEE LEELAYOOVA, Ph.D., MATHIRUT MUNGTHIN, Ph.D.

ABSTRACT

Giardia duodenalis is a unicellular organism that infects the small intestine of humans and a variety of other mammalian hosts. The detection of this organism is usually based on microscopic methods following the application of fecal concentration techniques. The development of immunofluorescence microscopy has generally improved the sensitivity of detecting and quantitating fecal *Giardia* cysts compared to conventional microscopy. However, neither traditional microscopic methods nor immunofluorescence microscopy can discriminate between morphologically identical, or similar, organisms that are genetically different. Thus, molecular methods, particularly PCR-based techniques, have been developed as diagnostic methods to solve this problem. To date, several techniques for DNA extraction and PCR amplification have been published; however, comparisons of their sensitivities have not been conducted.

An evaluation of the sensitivities of three DNA extraction methods (i.e. FTA filter paper, QIAamp stool mini kit, and conventional phenol/chloroform method) by using fecal specimens with known concentration of *G. duodenalis* cysts was performed. FTA filter paper was the most effective method, which could detect *G. duodenalis* in fecal specimens with the concentration of at least 0.6 cysts/PCR reaction mixture. The sensitivities of 5 previously described PCR protocols, using five different genotyping primer sets, were also compared in *Giardia* DNA derived from both trophozoites and cysts. The results showed that RH11/RH4, GiarF/GiarR primer set that amplified SSU-rRNA gene of this organism was the most sensitive primer. A blind diagnostic test to compare PCR and immunofluorescent assay for the detection of *G. duodenalis* in stool specimens was also conducted. FTA filter paper for DNA extraction together with the PCR method using the primer set RH11/RH4, GiarF/GiarR primer set showed 97.30% sensitivity and 100% specificity for the detection of *G. duodenalis* in stool specimens, while the immunofluorescent assay gave a sensitivity of 91.90% and a specificity of 100%. There were no statistically significant differences ($p=0.61$) between these two methods.

KEY WORDS: *GIARDIA DUODENALIS*/ PCR/ IMMUNOFLUORESCENT ASSAY

60 pp. ISBN 974-04-7480-2