LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

1 AUG 1992

THE AMPLIFICATION OF TARGET PARASITE DNA IN HUMAN BLOOD BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

WITOON TIRASOPHON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIRMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OFSCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

หอสมุดกลาง
ได้รับ
วันที่ ๑๐ ส.ค. ๒๕๓๕

Copyright by Mahidol University

19301

ชื่อวิทยานิพนธ์ การขยายดีเอ็นเอของเชื้อพาราไซท์ในเลือดคนโดยเทคนิคพีซีอาร์

ผู้วิจัย วิฑูรย์ ถิระโสภณ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วิชัย บุญแสง, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

Plasmodium falciparum เป็นเชื้อปาราสิตชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียชนิดรุนแรงในคน เนื่องจากการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อ P. falciparum แตกต่างจากการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อสายพันธุ์อื่น ดังนั้นวิธีตรวจวินิจฉัยสาเหตุของโรคที่มีความจำเพาะต่อเชื้อมาลาเรียชนิดนี้ จึงมีความสำคัญต่อการเลือกวิธีการรักษาอย่างเหมาะสม การตรวจหาเชื้อ P.falciparum ในเลือดโดยวิธี ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นเป็นวิธีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสูง แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้กับผู้ป่วยที่มีเชื้อมาลาเรียจำนวนน้อย ๆ ในกระแสโลหิต ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง จึงถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยมาลาเรียที่มีเชื้อน้อย ๆ เหล่านี้

pBR K1-14 คือชิ้นของดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ และพบในจีโนมของเชื้อ P. falciparum ซึ่งถูกเลือกมาใช้เป็นเป้าหมายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อ P. falciparum ในหลอดทดลอง ชิ้นส่วนของ pBR K1-14 ขนาด 206 bp ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมของ P. falciparum สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อมาลาเรียชนิดนี้โดยวิธี ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น จากเลือด 20 ไมโครลิตรที่มี P. falciparum เพียง 1 ตัว

การปรับปรุงวิธีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ขนาด 206 bp ที่จำเพาะต่อ P. falciparum ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ทำให้สามารถตรวจหาเชื้อ P. falciparum จำนวน 20 ตัวในเลือด 20 ไมโครลิตร โดยวิธี อิเลคโตรโฟริซิสในวุ้น (Agarose gel

Copyright by Mahidol University

electrophoresis) ซึ่งง่ายและรวดเร็วกว่าวิธี ไฮบริไดเซชั่น วิธีการตรวจหาเชื้อ P. falciparum โดยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนี้ถูกนำมาทดสอบกับผู้ป่วยมากกว่า 2000 ราย จากแหล่งที่มีการระบาดของโรคมาลาเรียหลายแห่งในประเทศไทย จากการเปรียบเทียบผลของการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ กับผลใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ ให้ความไว 81% และความจำเพาะ 95.8% ผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันกับผลการตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์โดยผู้ดูกล้องที่มีความชำนาญเท่ากับ 6.6% ในขณะที่ผลการตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์ที่ไม่สอดคล้องกันระหว่างผู้ดูกล้องที่มีความชำนาญ 2 คน และระหว่างผู้ดูกล้องที่มีความชำนาญกับผู้ผู้ดูกล้องที่ปฏิบัติงานในแหล่งที่มีโรคระบาดเท่ากับ 5.75% และ 15% ตามลำดับ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	The Amplification of Target Parasite DNA in Human Blood by The Polymerase Chain Reaction
Name	Witoon Tirasophon
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Sakol Panyim, Ph.D. Prapon Wilairat, Ph.D. Vichai Boonsaeng, Ph.D.
Date of Graduation	23 May B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

Plasmodium falciparum is an intraerythrocytic protozoan which is a major cause of human malaria. The specific and sensitive procedure for Plasmodia species indentification is essential for a proper therapeutic purpose and epidemiologic survillance. Although DNA based detection of this parasite provides high specificity but the failure of its sensitivity make it not promising as a diagnostic tool. In order to enhance the sensitivity of the DNA based detection, the amplification of species specific DNA fragment of P. falciparum via the polymerase chain reaction was investigated.

The insert of pBR K1-14, a P. falciparum specific DNA probe which had been constructed in our laboratory, was chosen to be the amplification target. Two oligonucleotide primers were designed from this probe flanking on 206 bp fragment of the target in the parasite genome. By the amplification of this specific 206 bp of P. falciparum DNA sequence by PCR as little as 0.01 pg of the parasite

Copyright by Mahidol University

extracted DNA (one half of DNA content from a single parasite) or a single parasite in 20 ul blood was detectable by coupling with DNA hybridization.

Optimization of the 206 bp amplification condition, namely 10 ul reaction (0.1 uM each primers, 200 uM each dNTP, 0.2 U Taq polymerase) in 40 cycles comprising of 15 sec at 80^{o}C denaturation, 15 sec at 50^{o}C annealing and 15 sec at 72^{o}C extension, could improve the specificity and the efficiency of the amplification of crude blood sample. By this condition the presence of 20 parasites in 20 ul blood, a level of parasitemia usually undetected by microscopic examination, were detectable by visualization of the ethidium bromide stained band following agarose gel electrophoresis.

The sensitivity and specificity of PCR procedure had been investigated by comparing with the results from an expert microscopist. More than 2000 blood samples from several endemic areas of Thailand have been tested. The overall data showed that malaria detection by PCR procedure provided 81% sensitivity, 95.8% specificity with 6.6% disagreement relative to the microscopist result. The disagreement between an expert microscopist compared to another expert microscopist or microscopist at a malaria clinic were 5.75% and 15% respectively.

Copyright by Mahidol University