



6 JUL 1994

**DNA SEQUENCE ANALYSIS OF A SPECIFIC *TRYPANOSOMA*  
*EVANSI* DNA PROBE AND ITS USE FOR A HIGHLY SENSITIVE  
DETECTION OF *T.EVANSI* IN BLOOD**

**NIPA CHOKESAJJAWATEE**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE  
(BIOCHEMISTRY)**

**IN**

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES**

**MAHIDOL UNIVERSITY**

**1993**

**27045**

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์             | การวิเคราะห์ลำดับเบสในดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของ DNA probe สำหรับ <i>Trypanosoma evansi</i> และการนำไปใช้ในการตรวจเชื้อ <i>T. evansi</i> ในเลือดให้มีความไวสูง |
| ผู้วิจัย                    | นิภา โชคสังจะวาทิ   |
| ปริญญา                      | วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)  |
| คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ | สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.<br>Niels Wuyts, D.V.M.  |
| วันที่สำเร็จการศึกษา        | ๓๐ เมษายน พ.ศ. ๒๕๓๗   |

### บทคัดย่อ

*Trypanosoma evansi* เป็น flagellated protozoa ที่อาศัยอยู่ในกระแสเลือดของสัตว์ สามารถแพร่กระจายได้โดยอาศัยแมลงดูดเลือดที่สำคัญคือแมลงจำพวกเห็บ (Tabanid flies) เป็นพาหะ เชื้อ *T. evansi* นี้เป็นสาเหตุของโรค "เซอร์รา (surra)" ในปศุสัตว์หลายชนิด ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้สัตว์อ่อนแอและอาจถึงตายได้ เนื่องจากโรคที่เกิดจาก *T. evansi* นี้เป็นปัญหาสำคัญต่อการพัฒนาสุขภาพและผลผลิตของปศุสัตว์ในพื้นที่ที่เป็นเขตรอบของโรค ทั้งในและนอกประเทศไทย ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อโดยตรงขึ้น เนื่องจากเทคนิค PCR นี้เป็นวิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพและมีความไวสูงเหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อนี้

pMUTec 6 ซึ่งเป็นตัวตรวจตามสำหรับเชื้อ *T. evansi* ได้ถูกตัดให้มีขนาดเล็กลง แล้วต่อเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ Bluescribe M13 จากผลที่ได้ ได้คัดเลือกโคลน pMUTec6.258 ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากโคลนนี้ให้ความเข้มของสัญญาณต่อขนาดความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเท่าตัวตรวจตามตั้งต้น และมีขนาดเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR จากลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของโคลน pMUTec6.258 ซึ่งมีขนาด 258 คู่เบส และมีค่า GC content เท่ากับ 50% ได้มีการออกแบบชุดของ primer สำหรับ PCR ซึ่งหลังจากการทำ PCR แล้วจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 227 คู่เบส เพิ่มจำนวนขึ้น ภายหลังการปรับสภาพการตรวจให้เหมาะสม วิธีนี้มีความไวสูงจนสามารถตรวจพบเชื้อเพียงหนึ่งตัวในเลือด 10 ไมโครลิตรได้ จากการตรวจเลือดของวัวที่ติดเชื้พบว่า วิธีการนี้สามารถตรวจพบเชื้อได้อย่างรวดเร็วเพียง 2 วัน ภายหลังการติดเชื้ และให้ผลลบอย่างรวดเร็วเพียง 12 ชั่วโมง ภายหลังจากการรักษา

การเพิ่มจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 227 คู่เบสนี้ มีความจำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อ Trypanosome ในกลุ่ม brucei คือ *T. brucei* และ *T. equiperdum* แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจากเลือดของสัตว์จำพวก โค สุกร ม้า แกะ และ แพะ และจากดีเอ็นเอของเชื้ออื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในเลือด เช่น *Anaplasma* sp. *Theileria* sp. *Babesia bovis* และ *Babesia bigemina*

เพื่อความสะดวกในการตรวจเชื้อ การเตรียมเลือดสามารถทำได้โดยวิธีง่ายๆ คือ ต้มเลือดอย่างน้อย 5 นาที ก่อนการนำไปทำ PCR ตัวอย่างเลือดที่ใช้ สามารถใช้ได้ทั้งเลือดที่แข็งตัว (clotted blood) และเลือดที่ใช้ EDTA เป็นสารป้องกันการแข็งตัว นอกจากนี้ยังสามารถเลือกใช้วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดได้ ทั้งวิธีการเก็บใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก และ วิธีการเก็บเป็นเลือดแห้งบนแผ่นสไลด์แก้ว จากการตรวจเลือดเลือดจากโคนม 71 ตัวอย่าง พบว่า ความไว และ ความจำเพาะ ของการตรวจโดยเทคนิค PCR นี้ เมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อ จากตัวอย่างเลือดลงในหลอดทดลอง เท่ากับ 100% และ 88% ตามลำดับ

**Thesis Title** DNA Sequence Analysis of a Specific *Trypanosoma evansi* DNA Probe and Its Use for a Highly Sensitive Detection of *T.evansi* in Blood.

**Name** Nipa Chokesajjawatee

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Supervisory Committee**

Sakol Panyim, Ph.D.  
Niels Wuyts, D.V.M.

**Date of Graduation** 30 April B.E. 2537 (1994)

### Abstract

*Trypanosoma evansi* is a haemoflagellated parasitic protozoa which is mechanically transmitted by blood sucking insects, especially by Tabanid flies. It causes a syndrome referred to as "surra", an emaciating and sometimes fatal disease, targeting a wide range of livestock. Since *T.evansi* poses an important problem for the animal health and production development program, especially in the endemic areas inside and outside Thailand, a practical method for a highly sensitive and reliable detection is needed. To this end, a method for direct detection of the parasite's DNA by polymerase chain reaction (PCR) was developed.

A previously developed *T.evansi* genomic DNA probe, pMUTec6, was subcloned into Bluescribe M13<sup>-</sup>. The clone pMUTec6.258 was selected for its signal intensity after hybridization with the *T.evansi* genome and for its size, suitable for PCR amplification. pMUTec6.258 showed an overall 50% GC content in its 258 bp sequence. From this sequence, a set of primers for PCR was designed allowing amplification of a 227 bp fragment from the original sequence. The amplification conditions were optimized for high sensitivity down to the detection of a single parasite

in 10  $\mu$ l blood. In an experimentally infected cow, the parasites were detected as early as 2 days post-infection and the signal totally disappeared 12 hr after successful treatment of the cow. The 227 bp amplification was specific for the detection of trypanosomes of the brucei group, *T.brucei* and *T.equiperdum*. No amplification product was seen from host blood in bovine, swine, equine, ovine, and caprine species, or from the following other blood parasites: *Anaplasma* sp., *Theileria* sp., *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* DNA.

For easier manipulation during the sample-collections, the blood processing method was simplified by boiling the crude blood for at least 5 min prior the amplification. Either clotted- or EDTA anticoagulated blood, both from tube-collected and slide-collected could be used as starting materials for the developed PCR method. Seventy-one field specimens were tested for evaluation, the sensitivity and specificity of the PCR detection when compared with the mouse inoculation method was 100% and 88% respectively.