
การพัฒนาการตรวจหาเชื้อมาลาเรียในระดับสปีชีส์ โดยวิธี Multiplex PCR

ปนัดดา เทพอัศร พันธิดา ตรียวง สกุรัตน์ สุนทรนัฏราวัฒน์ และอนิชา เลื่องชัยเขวง
สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ผู้ติดเชื้อมาลาเรียมีกว่า 300-500 ล้านคนต่อปี และมีผู้เสียชีวิตกว่า 1 ล้านคนทั่วโลก ประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อในปี พ.ศ. 2556 ประมาณ 29,317 คน การตรวจการติดเชื้อในระดับสปีชีส์มีความสำคัญต่อการรักษาโรค การศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Snounou และคณะ โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมและค่าต่ำสุดในการตรวจและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ การตรวจประกอบด้วย 2 ปฏิกริยา ปฏิกริยาแรกตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* โดยใช้ human GAPDH เป็น internal control ปฏิกริยาที่ 2 ใช้จำแนกเชื้อมาลาเรียในคนทั้ง 4 สปีชีส์คือ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* พบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH คือ 10^3 และ 10 copies ตามลำดับ สามารถตรวจการติดเชื้อร่วมในแต่ละสปีชีส์ได้ที่ 10^3 copies และสามารถตรวจการติดเชื้อร่วม *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่มีสัดส่วนแตกต่างกันมากที่ 100 copies ต่อ 10,000 copies ได้ใช้ได้กับตัวอย่างบนกระดาษเก็บตัวอย่างเลือด การศึกษานี้พบว่าเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการติดเชื้อมาลาเรียได้อย่างแม่นยำถึงระดับสปีชีส์ ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้อง ทั้งยังเป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการนำไปใช้ตรวจคัดกรองในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่หรือใช้ในภาคสนามที่มีการระบาดของโรค

Accepted for publication, 17 June 2015

บทนำ

โรคมาลาเรียเกิดจากการติดเชื้อ *Plasmodium* ซึ่งเป็นปรสิตเซลล์เดียว มียุงก้นปล่องเป็นพาหะ ประชากรร้อยละ 36 ของประชากรจาก 90 ประเทศทั่วโลกอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการแพร่กระจายของโรคมาลาเรีย สำหรับประเทศไทยพบอัตราการป่วยและตายที่มีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 เป็นต้นมา โดยแหล่งของเชื้อมาลาเรียอยู่บริเวณป่าชายแดนของประเทศ จังหวัดที่พบผู้ป่วยจำนวนมาก ได้แก่ แม่ฮ่องสอน ตาก กาญจนบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ระนอง สระแก้ว ตรัง และจันทบุรี⁽¹⁾ โดยทั่วไปเชื้อ *Plasmodium* ที่ก่อโรคในคนมี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale* ในประเทศไทยเชื้อที่พบมักเป็นชนิด *P. falciparum* และ *P. vivax* การรักษาโรคที่มีประสิทธิภาพต้องอาศัยผลการตรวจจำแนกสปีชีส์จากห้องปฏิบัติการ เช่น การใช้ primaquine ในการรักษา *P. vivax* และ *P. ovale* นอกจากนี้หากติดเชื้อ *P. falciparum* ซึ่งมีความรุนแรงของโรค การตรวจจำแนกสปีชีส์ที่จำเป็นมีความสำคัญมาก⁽²⁾ การวินิจฉัยโดยทั่วไปใช้วิธีส่องกล้องจุลทรรศน์จําแนก *Plasmodium* ทั้ง 4 สปีชีส์ แต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองแรงงานและต้องการผู้ที่มีทักษะสูง นอกจากนี้อาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกสปีชีส์กรณีที่ปรสิตมีจำนวนน้อยหรือเกิดการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สปีชีส์⁽³⁾ จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction มาใช้ตรวจวิเคราะห์⁽⁴⁻⁷⁾ ซึ่งพบว่ามีความไวและความจำเพาะสูง แต่บางเทคนิค เช่น nested PCR และ hybridization มีความซับซ้อนและต้องใช้ระยะเวลา ในการศึกษาจึงได้พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ขึ้นเพื่อตรวจการติดเชื้อและจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 ได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางห้องปฏิบัติการได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียม DNA ของ parasites

Panel parasites ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างเชื้อที่มีความหนาแน่นสูงและต่ำ คือ 200 parasites/μl, 5,000 parasites/μl และ 500 parasites/μl, 5,000 parasites/μl ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ตามลำดับจากผู้ติดเชื้อในประเทศไทยซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักโรคติดต่อมาโดยแมลง กรมควบคุมโรค โดยการหาความหนาแน่นของเชื้อทำได้โดยการนับจำนวนเชื้อจากการทำสเมียร์เลือดฟิล์มหนาซึ่งย้อมด้วยสีย้อมฆ่า โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย × 100 ใน field ต่างๆ ซึ่งมีเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell: WBC) รวมกันไม่ต่ำกว่า 200 ตัว แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณดังนี้

$$\frac{\text{จำนวน parasites ในระยะไม่มีเพศที่นับได้} \times \text{จำนวน WBC}/\mu\text{l}^*}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้}} = \text{parasites}/\mu\text{l}$$

*จำนวน WBC/μl ประมาณค่าเป็น 8,000 cells/ μl⁽⁸⁾

ทำการเตรียม DNA จาก panel parasites ของเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่ความหนาแน่นสูงที่ 5,000 parasites/μl ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* เป็นกรณีที่พบการติดเชื้อน้อยมาก จึงทำการสังเคราะห์ยีนบริเวณ 18S small subunit ribosomal RNA genes และสร้าง recombinant plasmid DNA ทดแทน DNA ที่สกัดจากเลือดเพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา ส่วน negative control ได้จากเลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีไม่มีประวัติติดเชื้อมาลาเรีย

1.1 การสกัด DNA จากเลือดด้วยชุดสกัด

สกัด DNA ของปรสิตจากตัวอย่างเลือด 200 μl โดยใช้ QIAamp blood kit (QIAGEN, CA) ขั้นตอนตามคู่มือของบริษัท จากนั้นละลาย DNA ที่สกัดได้ ด้วย AE buffer 200 μl เก็บตัวอย่าง DNA ที่ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้งาน

1.2 การสกัด DNA จากกระดาษเก็บตัวอย่างเลือดชนิด FTA Elute Micro card (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA)

วิธีการเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษทำโดยดูดตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 µl ด้วยปิเปตแล้วหยดบนกระดาษเก็บตัวอย่างเลือด ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งแล้วเก็บใส่ซองกันน้ำที่สามารถเก็บรักษาตัวอย่างได้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการสกัด DNA จากกระดาษใช้หัวเจาะขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm เจาะกระดาษตัวอย่างละ 5 วงใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 500 µl โดยใช้เครื่อง vortex ครั้งละ 5 วินาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วดูดน้ำกลั่นทิ้ง ใส่ น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 µl นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 30 นาที DNA จะอยู่ในส่วนของน้ำ ดูดตัวอย่าง DNA เก็บที่ -20 °C

2. การทดสอบความจำเพาะของ primer ในการตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์โดยวิธี single PCR

2.1 primer ที่ใช้ตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์

ได้ใช้ primer จากการศึกษาค้นคว้าของ Snounou G และคณะ^(2, 9) มาใช้ในการศึกษา โดยนำ primers มาทดสอบความจำเพาะต่อจีโนมและสปีชีส์ทั้ง 4 ของเชื้อ *Plasmodium* บนบริเวณ 18S small subunit ribosomal RNA genes โดยใช้ DNA template ที่ได้จาก panel parasites ที่ทราบสปีชีส์ที่ติดเชื้อสำหรับเชื้อ *P. falciparum* และ *P. vivax* ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* ใช้ recombinant plasmid DNA โดยข้อมูลของ primers ที่ใช้แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 PCR primers ในการตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย จาก Snounou และคณะ^(2, 9)

Primer	Sequence (5' → 3')	Amplicon size	Target gene/species
Genus for	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	1100 bp	18S rRNA gene/ <i>Plasmodium</i> sp.
Genus rev	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC		
Pf for	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAATATATT	206 bp	18S rRNA gene/ <i>P. falciparum</i>
Pf rev	ACACAATGAATCAATCATGACTACCCGTC		
Pv for	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120 bp	18S rRNA gene/ <i>P. vivax</i>
Pv rev	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		
Pm for	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	145 bp	18S rRNA gene/ <i>P. malariae</i>
Pm rev	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA		
Po for	ATCTCTTTTGCTATTTTTTTAGTATTGGAGA	787 bp	18S rRNA gene/ <i>P. ovale</i>
Po rev	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG		
GAPDH for	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	226 bp	Human GAPDH
GAPDH rev	GAAGATGGTGATGGGATTTC		

2.2 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ส่วนประกอบของปฏิกิริยาปริมาตร 25 μ l ประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 μ l, dNTP mix 0.2 mM each, forward primer 0.25 μ M, reverse primer 0.25 μ M, $MgCl_2$ 2 mM, template DNA 5 μ l และ High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas) 1.25 units นำเข้าเครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PTC-200, MJ Research) โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 95 °C 10 นาที 1 รอบ เข้าสู่ 35 รอบของ 95 °C 30 วินาที, 58 °C 1 นาที และ 72 °C 1 นาที ตามด้วย 72 °C 10 นาที วิเคราะห์ผลด้วย 2.5% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide

3. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

3.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

ทำการเตรียม PCR product จากการใช้คู่ primer ที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax* และ human GAPDH (ตารางที่ 1) นำมาเชื่อมกับ pGEM-T easy vector (Promega; Madison, WI) และถ่ายเข้าสู่ *E. coli* คัดเลือกโคลนโดยวิธี Ampicillin positive selection system และวิธี colony PCR สกัด recombinant plasmid DNA จากโคลนที่คัดเลือกได้ด้วย QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany) ขึ้นตอนตามคู่มือของบริษัท ในกรณีของ *P. malariae* และ *P. ovale* ได้จากการสังเคราะห์ DNA ในส่วนของ 18S rRNA gene ที่จำเพาะต่อสปีชีส์โดยเชื่อมอยู่ใน pBSK vector

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* sp.

ทำการทดลองเพื่อหา annealing temperature ที่เหมาะสมโดยใช้ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH-recombinant plasmid ที่ 10^4 copies เป็น template ในปฏิกิริยา 25 μ l ส่วนประกอบและสภาวะปฏิกิริยาดังวิธีการข้อ 2.2 ทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ระหว่าง 49.4–66.1 °C โดยรวม genus-specific primer และ human GAPDH specific primer ไว้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อ

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการตรวจหาสปีชีส์ โดยการใช้ recombinant plasmid DNA ที่มีส่วนเฉพาะของสปีชีส์ทั้ง 4 (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* และ *P. ovale*) อย่างละ 10^4 copies เป็น template ในปฏิกิริยา 25 μ l โดยรวม species-specific primer ทั้ง 4 สปีชีส์ ไว้ในหลอดปฏิกิริยาเดียวกัน และหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการทดลองปรับส่วนประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาจากเทคนิค PCR ที่แสดงดังข้อ 2.2 โดยปรับใช้ปริมาณ $MgCl_2$ ที่ 0–4 mM ปรับใช้อุณหภูมิช่วง annealing temperature ที่ 49.4 – 66.1 °C และปรับปริมาณ primer ที่ 0.25 – 0.6 μ M แล้วคัดเลือกส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลอง

4. การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบ (Limit of detection)

ทำการเตรียม recombinant plasmid DNA เพื่อใช้ในการทดสอบโดยการนำ recombinant plasmid DNA แต่ละชนิดมาเจือจางให้มีความเข้มข้นระหว่าง 10^1 – 10^7 copies/ μ l เพื่อใช้เป็น template ในการหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ ในการตรวจ genus *Plasmodium* และ human GAPDH การตรวจหาเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ และการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยใช้ปฏิกิริยา multiplex PCR ในสภาวะที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3.2 และ 3.3

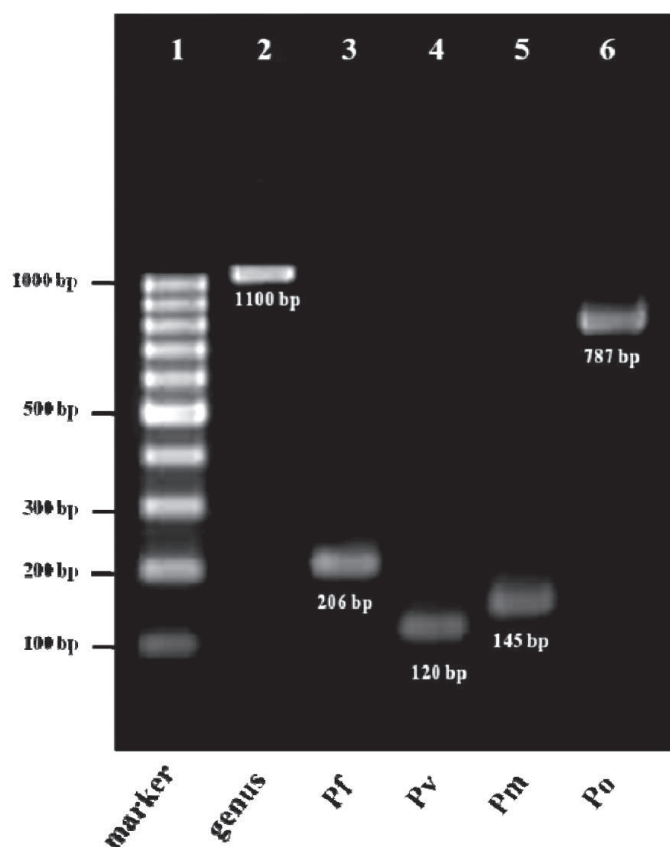
5. การตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างเลือด

นำ panel parasites ของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักโรคติดต่อ นำโดยแมลง ที่มีความหนาแน่นของเชื้อต่ำคือ 200 parasites/μl และ 500 parasites/μl ตามลำดับ มาทดลองเก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ทั้งในแบบแยกกัน และผสมกันเพื่อทดสอบการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* และทำการสกัด DNA จากกระดาษซับดังข้อ 1.2 ตัวอย่างละ 3 ขั้ว แล้วนำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจหาเชื้อโดยวิธี multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้น

ผล

1. ทดสอบความจำเพาะของ primer ในการตรวจ genus *Plasmodium* และสปีชีส์โดยวิธี single PCR

จากการตรวจการติดเชื้อมาลาเรียโดย single PCR โดยใช้ primer ตามตารางที่ 1 พบว่า PCR product จากการใช้ *Plasmodium* genus-specific primer ซึ่งแสดงถึงการติดเชื้อ *Plasmodium* sp. มีขนาด 1100 bp และสามารถจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 ได้โดยใช้ species-specific primer ซึ่งแสดงขนาด PCR product ที่แตกต่างกันคือ *P. falciparum* ขนาด 206 bp, *P. vivax* ขนาด 120 bp, *P. malariae* ขนาด 145 bp และ *P. ovale* ขนาด 787 bp (ภาพที่ 1)

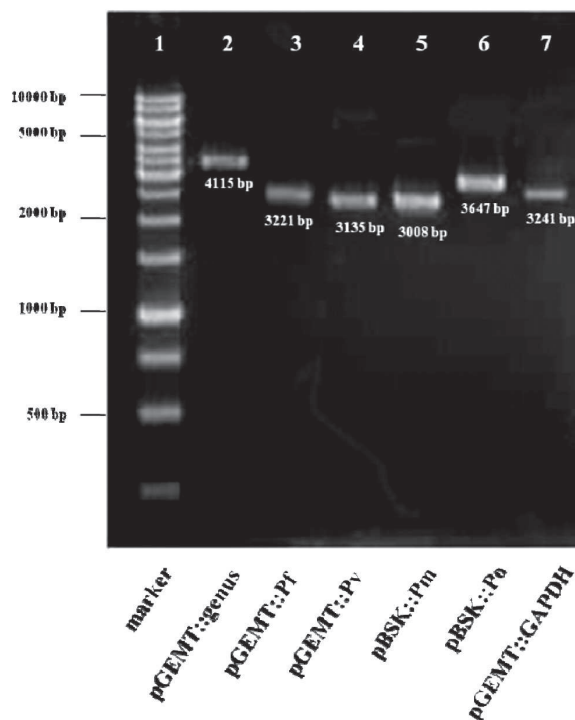


ภาพที่ 1 PCR product ที่เพิ่มจำนวนจาก DNA สกัดจากตัวอย่างเลือดที่ทราบสปีชีส์ที่ติดเชื้อในการตรวจหา genus *Plasmodium* (genus), *P. falciparum* (Pf) และ *P. vivax* (Pv) และ recombinant plasmid DNA ของ *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ PCR product ของ genus *Plasmodium* (genus), *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) ตามลำดับ

2. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR

2.1 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการโคลน PCR product ส่วนของ 18S rRNA gene ที่จำเพาะต่อ genus *Plasmodium*, *P. falciparum*, *P. vivax* และ human GAPDH โดยการเชื่อมกับ pGEM-T easy vector มีขนาด recombinant plasmid DNA เท่ากับ 4115 bp, 3221 bp, 3135 bp และ 3241 bp ตามลำดับ ส่วน *P. malariae* และ *P. ovale* เชื่อมอยู่ใน pBSK vector มีขนาด 3008 bp และ 3647 bp ตามลำดับ ซึ่งทำให้ได้ recombinant plasmid DNA เพื่อใช้เป็น template ในการพัฒนา multiplex PCR (ภาพที่ 2)



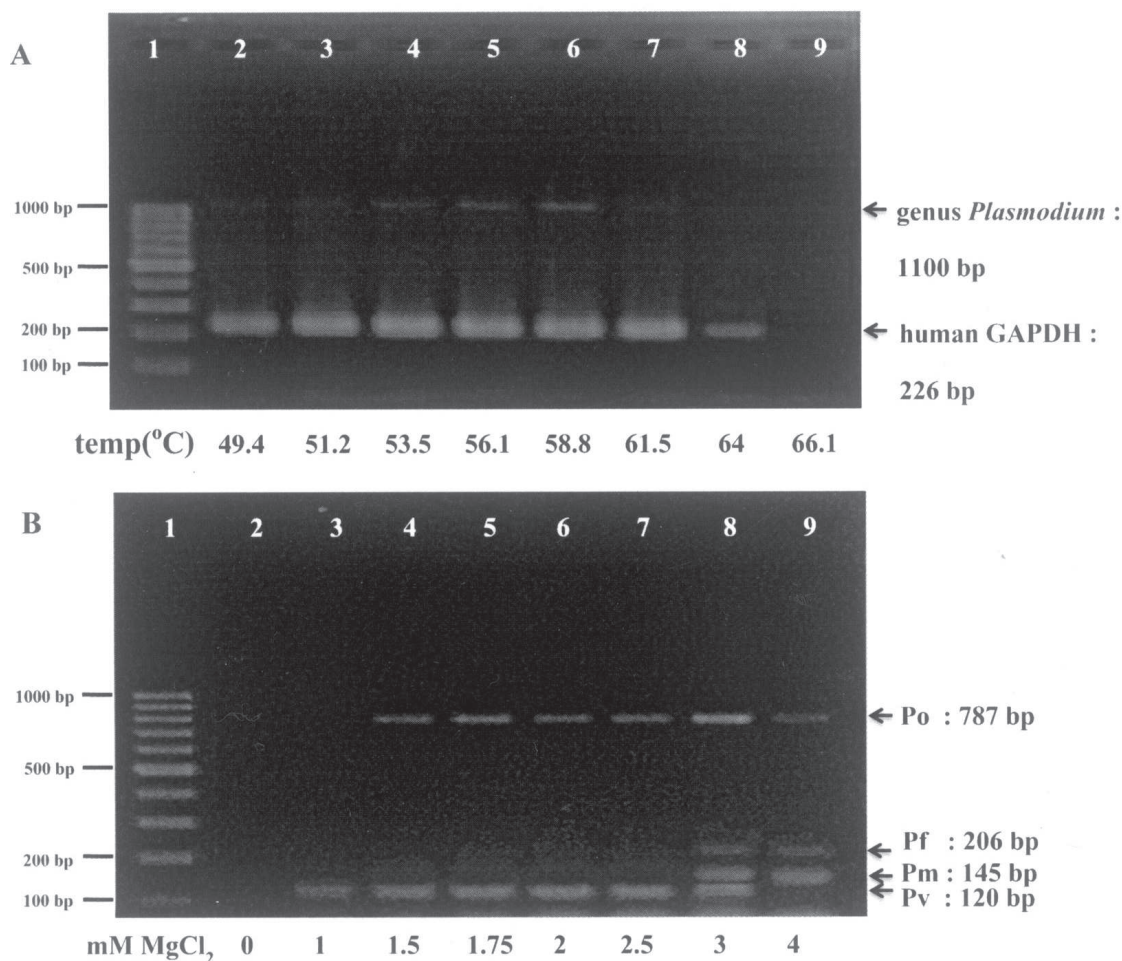
ภาพที่ 2 recombinant plasmid DNA ที่ใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา เมื่อช่องที่ 1 คือ 1 kb DNA marker ช่องที่ 2-7 คือ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid (pGEMT::genus), *P. falciparum*- recombinant plasmid (pGEMT::Pf), *P. vivax*- recombinant plasmid (pGEMT::Pv), *P. malariae*- recombinant plasmid (pBSK::Pm), *P. ovale*- recombinant plasmid (pBSK::Po) และ human GAPDH-recombinant plasmid (pGEMT::GAPDH) ตามลำดับ

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium sp.*

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ระหว่าง 49.4-66.1 °C ผลพบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มจาก 49.4 °C ถึง 58.8 °C ทำให้ตรวจพบ PCR product ที่ระบุทั้ง genus *Plasmodium* และ human GAPDH ที่เข้มข้นขึ้นและชัดเจนที่สุดที่อุณหภูมิ 56.1-58.8 °C แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 64 °C เป็นต้นไป จะตรวจไม่พบ PCR product ของ *Plasmodium* genus-specific primer หรือตรวจไม่พบการติดเชื้อ ขณะที่อุณหภูมิ 66.1 °C จะตรวจไม่พบ PCR product ของ human GAPDH-specific primer (ภาพที่ 3 A) ดังนั้น การทดลองจึงเลือกอุณหภูมิช่วง annealing temperature ที่ 58 °C มาใช้สำหรับตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย โดยมี human GAPDH เป็น internal control

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อ

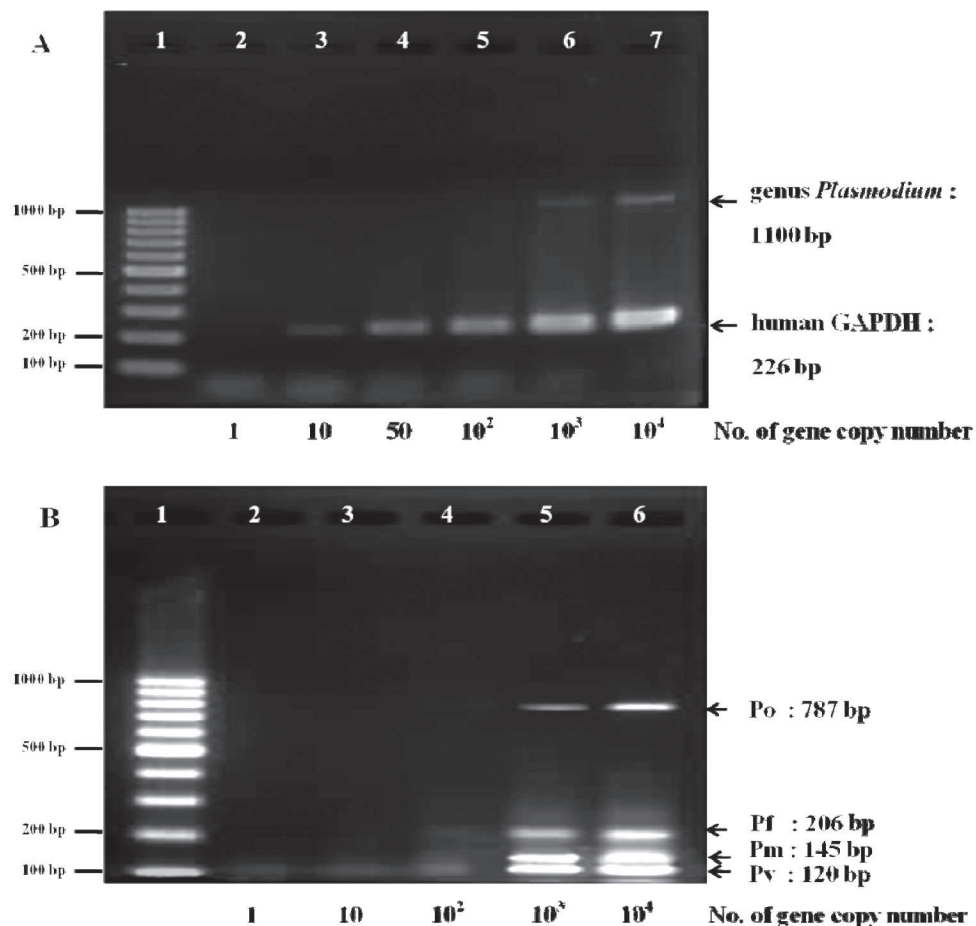
การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจหาสปีชีส์ที่ติดเชื้อได้ทดสอบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ระหว่าง 0-4 mM ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาที่ใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 mM สามารถเพิ่มจำนวน PCR product ทั้ง 4 สปีชีส์ได้ในหลอดเดียว (ภาพที่ 3 B) และเมื่อทดลองปรับ annealing temperature ระหว่าง 49.4-66.1 °C เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 3 mM พบว่าที่อุณหภูมิ 61 °C ให้ species- specific band ทั้ง 4 ที่ชัดเจนขึ้น ขณะที่การทดลองปรับปริมาณ primer ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.25-0.6 μM เมื่อใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 3 mM และ annealing temperature ที่ 61 °C นั้น ไม่เห็นผลการทดลองที่แตกต่าง (ไม่แสดงผลการทดลอง)



ภาพที่ 3 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR เมื่อ A คือการทดสอบอุณหภูมิช่วง annealing temperature ในปฏิกิริยาตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ที่มี human GAPDH เป็น internal control โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-9 คือ annealing temperature ที่ 49.4 °C, 51.2 °C, 53.5 °C, 56.1 °C, 58.8 °C, 61.5 °C, 64 °C และ 66.1 °C ตามลำดับ และ B คือการทดสอบปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาการตรวจสปีชีส์ โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-9 คือ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0 mM, 1 mM, 1.5 mM, 1.75 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM และ 4 mM ตามลำดับ

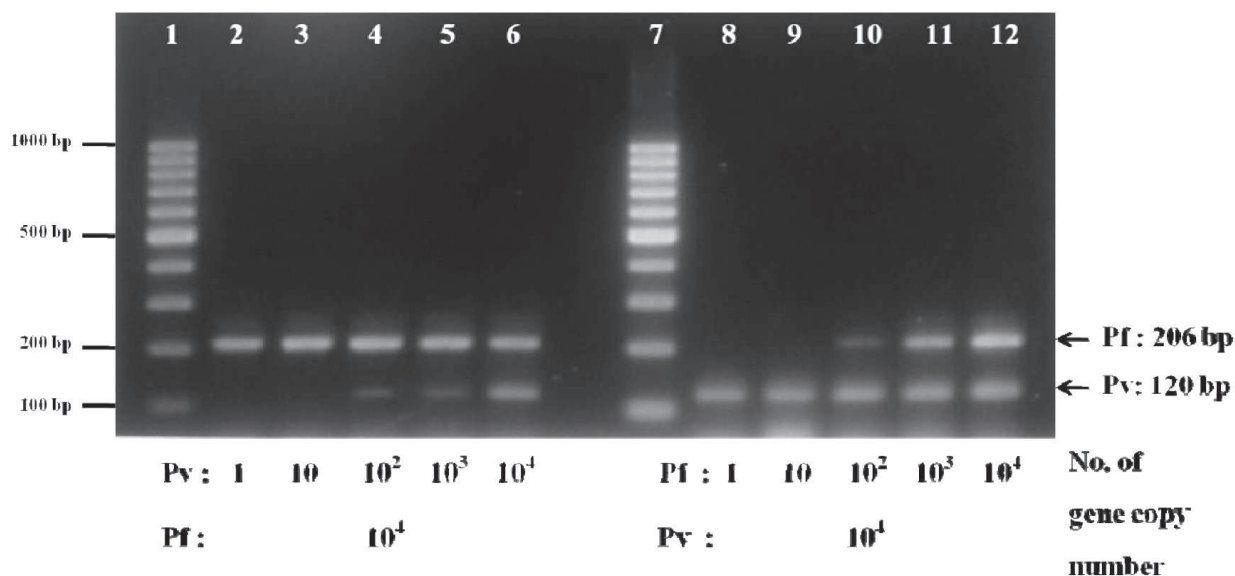
3. การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบ

เมื่อทำการหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR ตรวจพบได้ โดยการเจือจาง genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH- recombinant plasmid พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ annealing temperature ที่เหมาะสมที่ 58 °C ปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH คือ 10³ copies และ 10 copies ตามลำดับ (ภาพที่ 4 A) และ multiplex PCR ในการตรวจสปีชีส์ โดยการใช้สภาวะที่เหมาะสม คือ MgCl₂ ที่ความเข้มข้น 3 mM และ annealing temperature ที่ 61 °C พบว่าปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจสอบทั้ง 4 สปีชีส์ได้คือที่ 10³ copies ในแต่ละสปีชีส์ (ภาพที่ 4 B)



ภาพที่ 4 การหาปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่วิธี multiplex PCR สามารถตรวจได้ เมื่อ A คือปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium* และ human GAPDH โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-7 คือ genus *Plasmodium*-recombinant plasmid และ human GAPDH- recombinant plasmid ปริมาณ 1, 10, 50, 10², 10³ และ 10⁴ copies ตามลำดับ และ B คือปฏิกิริยาการตรวจสปีชีส์ทั้ง 4 ของเชื้อ *Plasmodium* คือ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) และ *P. ovale* (Po) โดยช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ recombinant plasmid DNA ทั้ง 4 สปีชีส์ ที่มีปริมาณสปีชีส์ละ 1, 10, 10², 10³ และ 10⁴ copies ตามลำดับ

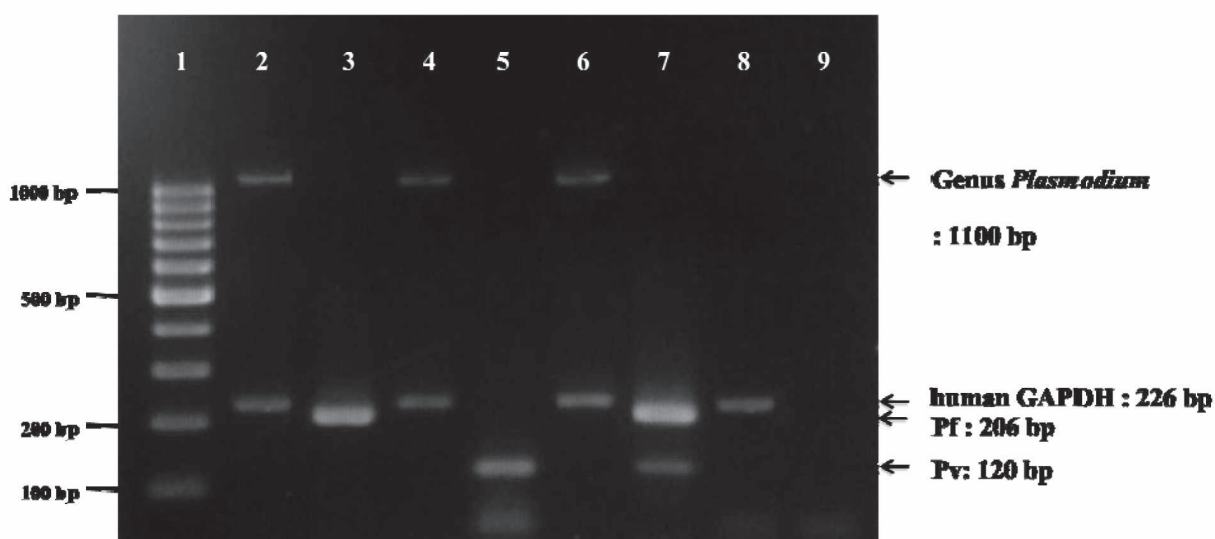
นอกจากนี้ได้ทดสอบในกรณีเกิดการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ระบาดในประเทศไทย การทดลองใช้ *P. falciparum*-recombinant plasmid ที่ 10^4 copies โดยเพิ่มจำนวน *P. vivax*- recombinant plasmid ตั้งแต่ $1-10^4$ copies และใช้ *P. vivax*- recombinant plasmid ที่ 10^4 copies โดยเพิ่มจำนวน *P. falciparum*- recombinant plasmid ตั้งแต่ $1-10^4$ copies ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิค multiplex PCR สามารถตรวจพบทั้ง 2 สปีชีส์ แม้มีปริมาณการติดเชื้อแตกต่างกัน ดังการทดลองตรวจพบสปีชีส์ที่เป็นส่วนน้อยตั้งแต่ 10^2 copies เมื่อใช้สปีชีส์ที่มีสัดส่วนมากกว่า 10^4 copies (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การทดสอบความไวของเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* เมื่อ ช่องที่ 1, 7 คือ 100 bp DNA marker ช่องที่ 2-6 คือ *P. vivax*-recombinant plasmid (Pv) ที่ 1, 10, 10^2 , 10^3 และ 10^4 copies ตามลำดับ เมื่อ *P. falciparum*-recombinant plasmid (Pf) เท่ากับ 10^4 copies และช่องที่ 8-12 คือ *P. falciparum*-recombinant plasmid (Pf) ที่ 1, 10, 10^2 , 10^3 และ 10^4 copies ตามลำดับ เมื่อ *P. vivax*- recombinant plasmid (Pv) เท่ากับ 10^4 copies

4. การตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ในตัวอย่างเลือด

จากการนำเทคนิค multiplex PCR ทั้ง 2 ปฏิกริยามาใช้กับตัวอย่างเลือดที่ทดลองเก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ทั้งในแบบแยกสปีชีส์ และผสมกันระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* ผลการตรวจพบการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ในหลอดปฏิกิริยาแรกทั้ง 3 ตัวอย่างและจำแนกสปีชีส์ได้อย่างถูกต้องด้วยหลอดปฏิกิริยาที่ 2 ซึ่งตรวจพบ PCR product ขนาด 206 bp แสดงถึงการติดเชื้อ *P. falciparum*, PCR product ขนาด 120 bp แสดงถึงการติดเชื้อ *P. vivax* และตัวอย่างที่ตรวจพบ PCR product ทั้งขนาด 206 bp และ 120 bp บ่งบอกถึงการติดเชื้อร่วมระหว่าง *P. falciparum* และ *P. vivax* (ภาพที่ 6) ซึ่งได้ทำการทดลองจำนวน 3 ข้างโดยผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 6 ผลตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* และจำแนกสปีชีส์ด้วยเทคนิค multiplex PCR ในตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card โดย

ช่องที่ 1 คือ 100 bp DNA marker

ช่องที่ 2 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 3 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 4 คือ panel parasites ของ *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 5 คือ panel parasites ของ *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 6 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 7 คือ panel parasites ของ *P. falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv) ที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

ช่องที่ 8 คือ เลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหา genus *Plasmodium*

ช่องที่ 9 คือ เลือดของผู้บริจาคโลหิตที่มีสุขภาพดีที่ตรวจโดยหลอดปฏิกิริยาตรวจหาสปีชีส์

วิจารณ์

ในอดีตการใช้เทคนิค polymerase chain reaction ตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* ถูกนำมาใช้เมื่อการตรวจด้วยวิธีส่องกล้องให้ผลลบ เนื่องจากเทคนิค PCR เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดหลายอย่างคือเทคนิคมีความซับซ้อน อุปกรณ์และน้ำยามีราคาสูง รวมทั้งความไม่สะดวกในการขนส่งตัวอย่างเลือดไปยังห้องปฏิบัติการ แต่ปัจจุบันอุปกรณ์และน้ำยามีราคาถูกลง บุคลากรมีความรู้ด้านชีวโมเลกุลมากขึ้นทำให้ PCR ไม่ใช่เทคนิคที่ซับซ้อนอีกต่อไป โดยการวิจัยนี้ได้พัฒนาการตรวจที่สามารถตรวจตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษเก็บเลือดชนิด FTA Elute Micro card ได้ จึงสะดวกต่อการเก็บรักษาและขนส่งตัวอย่าง

จากเทคนิคทาง PCR ที่หลากหลายนั้น real-time PCR เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจมาลาเรียที่ให้ผลรวดเร็ว สามารถทราบถึงระดับ DNA copy number ได้ และไม่ต้องตรวจผลด้วย gel electrophoresis แต่เทคนิคนี้ อุปกรณ์เครื่องมือมีราคาสูงมากและน้ำยาราคาแพงเมื่อเทียบกับเทคนิค PCR อื่น นอกจากนี้ Lee PC และคณะ⁽¹⁰⁾ พบว่าเทคนิค multiplex PCR ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำกว่า real-time PCR ในการตรวจจำแนกสปีชีส์ทั้งกรณี

ติดเชื้อสปีชีส์เดียวหรือมากกว่า 1 สปีชีส์ อีกทั้งยังมีรายงานการเกิด false negative ในปฏิกิริยา real-time PCR ที่ใช้ตรวจมาลาเรียเนื่องจาก sequence variation และ competitive inhibition⁽¹¹⁾ ส่วนเทคนิค nested PCR นั้น มีขั้นตอนที่ต้องใช้ระยะเวลามากกว่า multiplex PCR

การศึกษานี้ได้ดัดแปลงจากเทคนิค nested PCR ในการตรวจมาลาเรียของ Snounou G และคณะ⁽⁹⁾ ซึ่งได้ถูกอ้างอิงและนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในการศึกษาวิจัย การตรวจทางคลินิกและใช้เป็นวิธีตรวจอ้างอิงทางห้องปฏิบัติการของสหรัฐอเมริกา^(2, 12, 13, 14, 15) โดยคณะผู้วิจัยนำมาพัฒนาเป็นเทคนิค multiplex PCR ที่ง่าย รวดเร็ว แปลผลตรวจจากขนาด PCR product ที่มีความจำเพาะ ตรวจการติดเชื้อ *Plasmodium* ในหลอดปฏิกิริยาแรกและสามารถจำแนกสปีชีส์ทั้ง 4 รวมทั้งตรวจการติดเชื้อร่วมได้ด้วยหลอดปฏิกิริยาที่ 2 ซึ่งกรณีการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สปีชีส์นั้น การใช้วิธีส่องกล้องอาจเกิดความผิดพลาดได้เนื่องจากจำนวนเชื้อของสปีชีส์หนึ่งมีจำนวนมากกว่า จึงตรวจไม่พบสปีชีส์อื่น^(5, 16) และหากสปีชีส์ที่มีจำนวนน้อยกว่าคือ *P. falciparum* การตรวจที่ผิดพลาดเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยมากเพราะ *falciparum* หลายสายพันธุ์ต้องอาศัยการรักษาการติดเชื้อสปีชีส์อื่น⁽¹⁷⁾

ในการศึกษาได้นำเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ในระดับของ DNA copy number ที่ชัดเจน ต่างจากรายงานอื่นที่ส่วนใหญ่มักตรวจสอบในรูปของจำนวน parasites โดยเทคนิคนี้มีปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบ genus *Plasmodium* และ human GAPDH เท่ากับ 10^3 copies และ 10 copies ตามลำดับ และเมื่อทดสอบการติดเชื้อร่วมทั้ง 4 สปีชีส์ พบว่าสามารถตรวจพบทุกสปีชีส์ที่ 10^3 copies ซึ่งอาจเกิดจาก competition ในปฏิกิริยา ขณะที่ Kho WG และคณะ⁽¹⁷⁾ รายงานการใช้เทคนิค multiplex PCR ตรวจจำแนกมาลาเรีย 2 สปีชีส์ คือ *P. falciparum* และ *P. vivax* โดยปริมาณสารพันธุกรรมที่น้อยที่สุดที่ตรวจพบเมื่อมีเชื้อเพียงสปีชีส์เดียวเท่ากับ 4 copies แต่ไม่ได้ทดสอบกรณีการติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ในรูปแบบของ DNA copy number และได้รายงาน sensitivity เท่ากับ 0.1 parasites/ μ l ในแต่ละสปีชีส์ ส่วน Padley D และคณะ⁽¹⁸⁾ พัฒนาเทคนิค multiplex PCR ที่ระบุตรวจได้ทั้ง 4 สปีชีส์ โดยมี sensitivity ในการตรวจ *P. falciparum* และ *P. ovale* เท่ากับ 0.02 และ 0.004 parasites/ μ l ตามลำดับ แต่ไม่ได้ทดสอบ sensitivity ของ *P. vivax* และ *P. malariae* ทั้งยังแสดงผลตรวจการติดเชื้อร่วมเพียงแค่ *P. falciparum* และ *P. vivax* เท่านั้น⁽¹²⁾ นอกจากนี้ Chew CH และคณะ⁽¹⁹⁾ ได้พัฒนาชุดตรวจมาลาเรียทางการค้าที่ชื่อ PlasmoNexTM⁽¹⁰⁾ จากเทคนิค multiplex PCR โดยมี detection limit ของแต่ละสปีชีส์ระหว่าง 0.025–0.27 parasites/ μ l

ในประเทศไทยพบการระบาดของสูงของ *P. falciparum* และ *P. vivax* ซึ่งเทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจการติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ แม้กรณีที่มีเชื้อมีสัดส่วนแตกต่างกัน โดยตรวจพบการติดเชื้อร่วมเมื่อสปีชีส์ที่สัดส่วนน้อยกว่ามีจำนวนตั้งแต่ 100 copies ขณะที่การทดลองใช้สปีชีส์ที่มีสัดส่วนมากกว่า 10,000 copies ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการศึกษาขั้นต่อไปจะได้ดำเนินการศึกษากับตัวอย่างจริงในภาคสนาม เพื่อให้ได้ค่าความไวและความจำเพาะในการนำมาใช้งานต่อไป

จากการนำตัวอย่างเลือดที่เก็บบนกระดาษ FTA Elute Micro card ซึ่งเก็บแบบที่ติดเชื้อเฉพาะ *P. falciparum*, *P. vivax* และแบบติดเชื้อร่วมทั้ง 2 สปีชีส์ มาตรวจด้วยเทคนิคนี้ พบว่าให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและแม่นยำ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะและเชื่อถือได้ของวิธี multiplex PCR ที่สามารถตรวจการติดเชื้อมาลาเรีย โดยเฉพาะการติดเชื้อร่วมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

การตรวจเชื้อมาลาเรียด้วยเทคนิค multiplex PCR ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการวิเคราะห์ผล โดยสามารถตรวจตัวอย่างเลือดที่สกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปหรือสกัดสารพันธุกรรมจากกระดาษเก็บตัวอย่างเลือดได้ ซึ่งเทคนิคนี้แบ่งเป็น 2 หลอดปฏิกิริยา คือ ตรวจการติดเชื้อ genus *Plasmodium* ในหลอด

ปฏิกิริยาแรกโดยใช้ human GAPDH เป็น internal control และตรวจสอบสปีชีส์ในหลอดปฏิกิริยาที่ 2 โดยให้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำมากกว่า 1 สปีชีส์ และจำนวนเชื้อมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน ซึ่งหากตรวจด้วยวิธีสองกล่องอาจให้ผลที่ผิดพลาดได้ เทคนิค multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นจึงมีความแม่นยำสูงกว่าในการตีความผล และ เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับพื้นที่ระบาดของโรคที่มีข้อจำกัดด้านจำนวนและประสบการณ์ของผู้ส่งกล้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักโรคติดต่อมาลาเรีย กรมควบคุมโรค ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่าง Panel parasites

เอกสารอ้างอิง

1. กรมควบคุมโรค. โรคมาลาเรีย. [ออนไลน์]. 2557; [สืบค้น 4 ธ.ค. 2557]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้จาก : URL: <http://www.boe.moph.go.th/fact/Malaria.htm>
2. Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 1087-9.
3. Brown AE, Kain KC, Pipithkul J, Webster HK. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections undetected by conventional microscopy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86(6): 609-12.
4. Pieroni P, Millis CD, Ohrt C, Harrington MA, Kain KC. Comparison of the Parasite-F test and the ICT malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998; 92(2): 166-9.
5. Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RY, Kara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with Parasite-F and ICT malaria Pf test in clinical environment. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1269-73.
6. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 113-30.
7. Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. Parasitol Int 2015; 64(3): 304-8.
8. Blood parasites. In: World Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology. Geneva: WHO; 1997. p.81.
9. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61(2): 315-20.
10. Lee PC, Chong ETJ, Anderios F, Lim YAL, Chew CH, Chua KH. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNexTM multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR. Malar J 2015; 14: 28-34.
11. Bialasiewicz S, Whitley DM, Nissen MD, Sloots TP. Impact of competitive inhibition and sequence variation upon the sensitivity of malaria PCR. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1621-3.
12. Mixson-Hayden T, Lucchi NW, Udhayakumar V. Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. BMC Res Notes 2010; 3: 88-94.

13. Mens P, Spieker N, Omar S, Heijnen M, Schallig H, Kager PA. Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. *Trop Med Int Health* 2007; 12(2): 238-44.
 14. Gal S, Fidler C, Truner S, Lo YM, Roberts DJ, Wainscoat JS. Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 234-8.
 15. Roper C, Elhassan IM, Hviid L, Giha H, Richardson W, Babiker H, *et al.* Detection of very low level of *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54(4): 325-31.
 16. Kimura M, Miyake H, Kim HS, Tanabe M, Arai M, Kawai S, *et al.* Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9): 2342-6.
 17. Kho WG, Chung JY, Sim EJ, Kim MY, Kim DW, Jongwutiwes S, *et al.* A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitol Int* 2003; 52(3): 229-36.
 18. Padley D, Moody AH, Chiodini PL, Saldanha J. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(2): 131-7.
 19. Chew CH, Lim YAL, Lee PC, Mahmud R, Chua KH. Hexaplex PCR detection system for identification of five human *Plasmodium* species with an internal control. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 4012-9.
-

Development of Multiplex PCR for *Plasmodium* Species Detection

**Panadda Dhepakson Pantida Treeyoung Sakulrat Soonthorncharttrawat
and Anicha Luengchaichaweng**

*Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000
Thailand.*

ABSTRACT Malaria affects 300 to 500 million people annually worldwide and causes over 1 million deaths. In 2013, approximately 29,317 cases of malaria were reported in Thailand. Identification of the human malaria parasite species is important for early treatment of disease. In this study, multiplex PCR was developed by modification of technique described by Snounou et. al. The PCR reactions were optimized and determined for limit of detection. Then the developed method was applied for detection of parasites in sample with mix infection and eluted sample from collection card. The optimized condition had the first reaction for detection of genus *Plasmodium* using GAPDH as an internal control, the second reaction for identification of *Plasmodium* species, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*. The results showed the limit of detection for genus *Plasmodium* and human GAPDH at 10^3 copies and 10 copies, respectively. And the limit of detection for all four species was 10^3 copies per *Plasmodium* species. Furthermore, the multiplex PCR has shown ability to detect mixed infection of *P. falciparum* and *P. vivax* at detection threshold of 100 per 10,000 copies for the minority species of infection. In addition, this technique can be applied to blood sample on collection card. The results indicated that the developed multiplex PCR was a useful tool for species identification resulted in correct treatment. Furthermore, the method could easily be developed for mass screening and field surveillance.

Key words: multiplex PCR, *Plasmodium* sp., malaria detection, recombinant plasmid DNA