

การวัดความเข้มข้นยาต่ำสุดที่ทำให้เชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ตายหมดด้วยเทคนิคพีซีอาร์



นางสาวพรรณราย วุฒิปัญญารัตน์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาระดับหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-2198-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 922067178

**MEASUREMENT OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION FOR MALARIAL
PARASITE *Plasmodium falciparum* BY PCR TECHNIQUE**

Miss Punnarai Wuthipanyarattanakun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology

Department of Biology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-14-2198-2

481694

พรรณราย วุฒิปัญญารัตน์กุล : การวัดความเข้มข้นยาต่ำสุดที่ทำให้เชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ตายหมดด้วยเทคนิคพีซีอาร์. (MEASUREMENT OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION FOR MALARIAL PARASITE *Plasmodium falciparum* BY PCR TECHNIQUE) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. พงชัย หาญยุทธนากร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. เนาวรัตน์ กาญจนาคาร จำนวน 104 หน้า. ISBN 974-14-2198-2.

โรคมาลาเรียยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข ถึงแม้ว่าการป่วยและอัตราการตายจะลดลงในบางพื้นที่ แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาคือ เชื้อมาลาเรียดื้อต่อยาที่ใช้รักษา โดยเฉพาะเชื้อมาลาเรียชนิดพัลซิพารัม ดังนั้น การตรวจสอบความไวต่อยาในรูปของค่า MIC (Minimum inhibitory concentration) จึงมีความจำเป็นต่อการติดตามและควบคุมการระบาดของโรคอย่างมาก ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหา ค่า MIC จากการตรวจสอบความไวของเชื้อต่อยา 4 ชนิด คือ ควินิน เมฟโฟลควิน คลอโรควิน และ ไพริเมตามีน และนำค่า MIC ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่า MIC จากการทดสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี คือ boiling method, phenol-chloroform extraction และ ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการนำมาใช้มากที่สุด ส่วนการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอได้ผลดีเช่นเดียวกัน เมื่อนำดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่ได้มาทดสอบความไวของไพรเมอร์พบว่า ความไวของเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ของยีน *rap-1* มีความไวต่ำกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์เล็กน้อย คือ สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรีย ได้ต่ำสุดที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วิธี RT-PCR จะมีความไวสูงกว่า คือ สามารถตรวจหาเชื้อมาลาเรียได้ที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์เท่ากับความไวของค่า MIC ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่เมื่อใช้ไพรเมอร์ของยีน *ssrRNA* ค่าความไวที่ตรวจสอบได้จะยิ่งสูงมากคือสามารถตรวจเชื้อมาลาเรียได้ที่ 0.001 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันทั้งเทคนิค PCR และ RT-PCR และเมื่อนำเทคนิค PCR และ RT-PCR ไปหาค่า MIC ของเชื้อ *P. falciparum* T9/94RC17 ต่อยาทั้ง 4 ชนิด พบว่า ค่า MIC จากเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *rap-1* มีค่าเท่ากับ MIC จากกล้องจุลทรรศน์ ยกเว้นค่า MIC ต่อยาเมฟโฟลควินที่มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย เมื่อปรับเปลี่ยนเทคนิคที่ได้ไปใช้กับเทคนิค direct PCR และ direct RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *rap-1* มาใช้ทดสอบค่า MIC พบว่า เทคนิคทั้งสองไม่สามารถใช้ในการหาค่า MIC ได้ การประยุกต์เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *rap-1* มาใช้หาค่า MIC กับเชื้อที่เก็บมาจากภาคสนาม 3 ไอโซเลท คือ MH20 TD12 และ K160 พบว่าวิธี PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ *rap-1* จะให้ผลใกล้เคียงกับวิธีดั้งเดิม ดังนั้นวิธีดังกล่าวจึงมีศักยภาพในการพัฒนาการตรวจหาค่า MIC จากการทดสอบความไวของเชื้อมาลาเรียต่อยา และอาจใช้เป็นมาตรฐานใหม่ในการตรวจหาค่า MIC โดยเฉพาะจากตัวอย่างที่มีปริมาณมาก


ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....พรรณราย วุฒิปัญญารัตน์กุล.....
 สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา...2548.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....Niwarali Kancharakhan.....

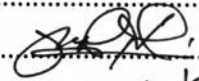
4672343823 : MAJOR ZOOLOGY


KEY WORD: *Plasmodium falciparum* / SUSCEPTIBILITY TEST / PCR

PUNNARAI WUTHIPANYARATTANAKUN: MEASUREMENT OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION FOR MALARIAL PARASITE *Plasmodium falciparum* BY PCR TECHNIQUE. THESIS ADVISOR: PONGCHAI HARNYUTTANAKORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISER: NAOWARAT KANCHANAKHAN 104 pp. ISBN 974-14-2198 -2.

Malaria remains an important problem of public health. Although the mortality and mobility are decreasing in some endemic areas but the problem of drug resistance especially in falciparum malaria against many of routinely used antimalarial drug has become serious. The assessment of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of drug susceptibility is therefore needed for monitoring and control malaria disease. In this study, the PCR technique has been applied for testing MIC value against 4 antimalarial drugs which are quinine, mefloquine, chloroquine and pyrimethamine. The tested MIC values from PCR had been compared with the MIC values derived from the conventional microscopic test. The results from the comparison of three DNA extraction methods, boiling method, phenol-chloroform extraction and DNA extraction kit, revealed that the standard phenol-chloroform method is the most suitable for this study. In addition, the RNA extraction kit is also suitable for RNA extraction. The extracted DNA and RNA had been tested for malaria parasite detection. The sensitivity of PCR with rap-1 primers is 0.05% which is slightly lower than the microscopic test whereas the sensitivity of RT-PCR is down to 0.01% as equal to the MIC from microscopic assay. Moreover, the PCR with ssrRNA primers gave more sensitive result, down to 0.001% by both PCR and RT-PCR. The MIC against 4 drugs of pure clone *P. falciparum*, T9/94RC17, had been evaluated by using PCR and RT-PCR with rap-1 primers and the results showed the equal values to the microscopic assay except in mefloquine which has shown slightly difference. Beside, the modified direct PCR and RT-PCR with rap-1 primers had also been tested in T9/94RC17 but the techniques failed to meet the same standard. Finally, the assessment of MIC value by PCR with rap-1 primers in 3 wild isolates, MH20, TD12 and K60, had been performed and the promising results had been observed. From this study, the results revealed that PCR is an attractive alternative and has the potential for assessment of the MIC value especially for large scale screening.

Department... Biology..... Student's signature..... 

Field of study..Zooology.....Advisor's signature..... 

Academic year...2005.....Co-advisor's signature.. 

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not have been completed without Dr. Pongchai Harnyuttanakorn who not only served as my supervisor but also encouraged and challenged me throughout my academic program. I would like to give my deep gratitude and appreciation to him for invaluable support, including his kind guidance and the opportunity to pursue my research generously. Special appreciation goes to my thesis co-advisor, Dr. Naowarat Kanchanakhan for providing invaluable advice. I would also like to give my gratitude to Mrs. Aree Seugorn and Ms. Napaporn Siripoon for their constant guidance, creative criticism and teaching all the techniques about *P. falciparum* culture and drug susceptibility test and to Mr. Suchart Tepnimit for his kind and helpful. I am most grateful to Dr. Chutaphant Pinswasdi and Ms. Tepanata Pumpaiboon for their valuable suggestions which are broadened perspective in practical applications.

I owe a special debt of gratitude to Mr. Ekkaluck Kowong, Ms. Siraporn Treerattanaphan, Mr. Teeraphan Loamettachit, Mr. Kritsada Katawutpoonphan, Mr. Atsalek Rattanawanee, Mr. Pratak Sawatpon and Ms. Orawan Duangphakdee for their understanding and encouragement. I share the pride and joy of completing this thesis with them.

Special thanks to Division of Malaria Research Centre, Institute of Health Science, and Chulalongkorn University for lab instrument support and to the Graduate School Chulalongkorn University for funding of my research.

Above all, I feel proud to dedicate this thesis with due respect to my family especially my father, mother and Euler for their understanding, constant source of encouragement and support throughout my life. I cannot accomplish my thesis without them.

CONTENTS

	Page
Thai abstract.....	iv
English abstract.....	v
Acknowledgments.....	vi
Contents.....	vii
List of Tables.....	x
List of Figures.....	xi
Abbreviation.....	xv
Chapter I Introduction.....	1
1.1 Motivations.....	1
1.2 Objective.....	2
1.3 Scope of the study.....	2
Chapter II Literature Review.....	3
2.1 Global Situation of Malaria.....	3
2.2 Biological Characteristic of <i>Plasmodium falciparum</i>	5
2.3 Malaria Control.....	9
2.4 Antimalarial Drugs.....	10
2.5 Epidemiology of Antimalarial drug resistance.....	18
2.6 Drug susceptibility test	20
2.7 Assessment of Drug susceptibility test.....	21
2.8 Polymerase Chain Reaction and Applications.....	24
2.9 Scopes of the study.....	27
Chapter III Materials and Methods.....	29
3.1 Materials.....	29
3.1.1 Isolates of <i>Plasmodium falciparum</i>	29
3.1.2 Enzyme and Buffers.....	29
3.1.3 Commercial Kits.....	29

3.1.4 Reagents and Chemicals.....	29
3.2 Methods.....	33
3.2.1 <i>Plasmodium falciparum</i> Cultural Technique.....	33
3.2.2 Molecular Technique.....	36
Chapter IV Evaluation method for DNA preparation.....	41
4.1 Introduction.....	41
4.2 Results.....	42
4.2.1 MIC value from thin blood film.....	42
4.2.2 Different DNA extraction methods	42
4.3 Discussion and Conclusion.....	43
Chapter V Monitoring of primers sensitivity.....	48
5.1 Introduction.....	48
5.2 Results.....	49
5.2.1 PCR technique.....	49
5.2.2 RT-PCR technique	50
5.3 Discussion and Conclusion.....	53
Chapter VI Measurement parasite from Drug susceptibility test by using PCR and RT-PCR.....	55
6.1 Introduction.....	55
6.2 Results.....	56
6.2.1 Microscopic examination	56
6.2.2 PCR technique	61
6.2.3 RT-PCR technique	66
6.3 Discussion and Conclusion.....	71

Chapter VII Measurement parasite from Drug susceptibility test by using	
Direct PCR and RT-PCR.....	75
7.1 Introduction.....	75
7.2 Results.....	76
7.3 Discussion and Conclusion.....	81
Chapter IIX The use of PCR technique with other isolates of malarial parasite	
in drug susceptibility test.....	83
8.1 Introduction.....	83
8.2 Results.....	84
8.2.1 Microscopic examination	84
6.2.2 PCR technique	87
8.3 Discussion and Conclusion.....	87
Chapter IX: Conclusions	93
References.....	95
Biography.....	104

LIST OF TABLES

Table		page
2.1	The most common amino acid changes in DHFR and DHPS resulting from point mutations.....	13
2.2	Dates of Introduction and First Documented Resistance	18
3.1	Different drug concentrations were used during drug susceptibility test....	35
4.1	The result of pyrimethamine susceptibility test to T9/94 RC17 from microscopic examination.....	42
4.2	The result of pyrimethamine susceptibility test to T9/94 RC17 from PCR detection.....	47
5.1	The percentages of parasitize red blood cell measured by counting from thin blood films stained with Giemsa.....	49
5.2	The amplification of <i>rap-1</i> and <i>ssrRNA</i> gene from serial dilution samples at different % parasitaemia	54
6.1	The MIC value of <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 against each antimalarial drugs using microscopic detection.....	58
6.2	The amplification of <i>rap-1</i> and <i>ssrRNA</i> gene from quinine susceptibility test.....	73
6.3	The amplification of <i>rap-1</i> and <i>ssrRNA</i> gene from mefloquine susceptibility test.....	73
6.4	The amplification of <i>rap-1</i> and <i>ssrRNA</i> gene from chloroquine susceptibility test.....	74
6.5	The amplification of <i>rap-1</i> and <i>ssrRNA</i> gene from pyrimethamine susceptibility test.....	74
8.1	The results of <i>P. falciparum</i> MH20, TD12 and K160 against quinine and mefloquine by using microscopic detection.....	85
8.2	The results of <i>P. falciparum</i> MH20, TD12 and K160 against chloroquine and pyrimethamine by using microscopic detection	86
8.3	Table compares between MIC _p and MIC of each isolates against all tested drugs.....	88

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 Global distribution of malaria. The changing global distribution of malaria risk from 1946 to 1994 shows a disease burden that is increasingly being confined to tropical regions.....	3
2.2 Map showing Top Ten Provinces of Thailand with highest malaria cases...	4
2.3 The merozoite of <i>P. falciparum</i>	6
2.4 The TEM of a merozoite.....	6
2.5 The life cycle of the <i>P. falciparum</i>	8
2.6 Chemical Structure of Sulfonamides.....	11
2.7 Chemical Structure of Pyrimethamine.....	12
2.8 Chemical structures of Atovaquone.....	12
2.9 Chemical structures of chloroquine.....	14
2.10 Chemical structures of quinine.....	15
2.11 Chemical structures of artemisinin.....	16
2.12 Representation of an intra-erythrocytic <i>Plasmodium falciparum</i> trophozoite, highlighting key parasite intracellular compartments and the site of action of some of the major classes of antimalarial drugs.....	17
2.13 Areas with reduced susceptibility of <i>P. falciparum</i> to chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine (SP) and areas designated as multidrug resistant according to WHO.....	19
2.14 Different approaches to assessing the sensitivity of malaria drugs.....	23
2.15 PCR is used to amplify the amount of a particular DNA molecule in a sample.....	25
2.16 Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction used to amplify the amount of a particular RNA molecule in a sample.....	26
2.17 Schematic representations of <i>Plasmodium</i> small subunit ribosomal RNA genes.....	27

Figure	Page
2.18 Schematic representations of <i>Plasmodium</i> rhoptry-associated protein-1 (<i>rap-1</i>) gene and restriction map of the gene of isolated K1.....	27
3.1 <i>P. falciparum</i> isolates collected from patients were cultured in 96 micro well plate.....	33
3.2 Dessicator was used for growing cultures of malaria parasite.....	34
3.3 A TC 96 micro-well was used for testing of drug susceptibility.....	35
4.1 These figures show the PCR product from the parasitic DNA extracted by rapid boiling method.....	44
4.2 These figures show the PCR product from the parasitic DNA extracted by phenol chloroform extraction method.....	45
4.3 These figures show the PCR product from the parasitic DNA extracted by Perfect gDNA Blood Mini (Eppendorf).....	46
4.4 Illustrates the conformation of dead parasite at MIC level of pyrimethamine.....	47
5.1 These figures show the PCR product from the serial dilutions of percent parasitaemia.....	51
5.2 These figures show the RT-PCR product from the serial dilutions of percent parasitaemia.....	52
6.1 Octaplications of antimalarial drug susceptibility test were grouped into four sets.....	56
6.2 These photographs illustrate the result from quinine and mefloquine susceptibility tests which were observed by microscopic examination.....	59
6.3 These photographs illustrate the result from chloroquine and pyrimethamine susceptibility tests which were observed by microscopic examination.....	60
6.4 <i>rap-1</i> PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of quinine, are subjected to agarose gel electrophoresis.....	62

Figure	Page
6.5	<i>rap-1</i> PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of mefloquine, are subjected to agarose gel electrophoresis...63
6.6	<i>rap-1</i> PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of chloroquine, are subjected to agarose gel electrophoresis...64
6.7	<i>rap-1</i> PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of pyrimethamine, are subjected to agarose gel electrophoresis.....65
6.8	<i>rap-1</i> RT-PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of quinine, are subjected to agarose gel electrophoresis.....67
6.9	<i>rap-1</i> RT-PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of mefloquine, are subjected to agarose gel electrophoresis...68
6.10	<i>rap-1</i> RT-PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of chloroquine, are subjected to agarose gel electrophoresis...69
6.11	<i>rap-1</i> RT-PCR products and <i>ssrRNA</i> PCR products, which are amplified using DNA sample from <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of pyrimethamine, are subjected to agarose gel electrophoresis.....70
7.1	<i>rap-1</i> PCR products and RT-PCR products, which are amplified using red blood cell culture of <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of quinine.....77
7.2	<i>rap-1</i> PCR products and RT-PCR products, which are amplified using red blood cell culture of <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of mefloquine78

Figure	Page
7.3 <i>rap-1</i> PCR products and RT-PCR products, which are amplified using red blood cell culture of <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of chloroquine	79
7.4 <i>rap-1</i> PCR products and RT-PCR products, which are amplified using red blood cell culture of <i>P. falciparum</i> T9/94RC17 treated with various concentrations of pyrimethamine.....	80
8.1 <i>rap-1</i> PCR products from <i>P. falciparum</i> isolate MH20, TD12 and K160 against to quinine	89
8.2 <i>rap-1</i> PCR products from <i>P. falciparum</i> isolate MH20, TD12 and K160 against to mefloquine	90
8.3 <i>rap-1</i> PCR products from <i>P. falciparum</i> isolate MH20, TD12 and K160 against to chloroquine.....	91
8.4 <i>rap-1</i> PCR products from <i>P. falciparum</i> isolate MH20, TD12 and K160 against to quinine	92

ABBREVIATIONS

cDNA	=	complementary DNA
ddH ₂ O	=	double distilled water
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphate
dATP	=	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	=	deoxycytidine triphosphate
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphate
dTTP	=	deoxythymidine triphosphate
DDT	=	dichlorodiphenyl trichloroethane
DELI	=	double-site enzyme-linked LDH immunodetection
DHF	=	NADPH-dependent reduction of dihydrofolate
DHFR	=	dihydrofolate reductase
DHPS	=	dihydropteroate synthase
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
FP	=	ferritoporphyrin IX
GDP	=	gross domestic product
HRP2	=	histidine-rich protein 2
IC ₅₀	=	inhibitory concentration
ITNs	=	insecticide-treated nets
M	=	Molar
mAbs	=	monoclonal antibodies
MIC	=	minimum inhibitory concentration
MIC _p	=	minimum inhibitory concentration from PCR technique
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PABA	=	<i>p</i> -aminobenzoic acid
PBS	=	phosphate buffered saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
pLDH	=	parasite lactate dehydrogenase
PPPK	=	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase
RAP-1	=	rhoptry associated protein-1

RNA	=	Ribonucleic acid
RT-PCR	=	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
ssrRNA	=	small subunit ribosomal RNA
THF	=	tetrahydrofolate
TS	=	thymidylate synthase