

รหัสโครงการ: RSA4780009
ชื่อโครงการ: การพัฒนาการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pythium insidiosum* โดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : รศ.ดร. จุฬารัตน์ ปริญญาติกุล คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
E-mail : chupra@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เชื้อ *Pythium insidiosum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค Pythiosis ในสัตว์และคน โรคนี้พบไม่บ่อยแต่มีความรุนแรง มีอัตราการพิการและเสียชีวิตสูง วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P.insidiosum* จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญ การศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้เทคนิค seminested polymerase chain reaction ทำให้การตรวจวินิจฉัยมีความจำเพาะและความรวดเร็วมากขึ้น การออกแบบไพรเมอร์สำหรับจีน 18S rRNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้ข้อมูลจาก GenBank ทั้งหมด 98 accesses ซึ่งประกอบไปด้วยข้อมูลของ *Pythium* spp., เชื้อราอื่นๆ และคน ทำการวิเคราะห์หาบริเวณที่เป็น Conserve และ Variable จากการวิเคราะห์ได้ไพรเมอร์ CPL6 และ PSL1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *P.insidiosum* ได้นำไพรเมอร์ทั้งสองนี้ไปใช้ร่วมกับไพรเมอร์ CPR8 จะได้ product ขนาด 512 และ 152 bp ตามลำดับการพัฒนาเทคนิค seminested PCR มีการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยมีการปรับ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ CPL6, MgCl₂, dNTPs, Taq DNA polymerase และจำนวนรอบ โดยมีความไวของการทดสอบเมื่อทดสอบกับ *P.insidiosum* สายพันธุ์ MCC2 เท่ากับ 1 pg ความจำเพาะของการทดสอบเมื่อทดสอบกับเชื้อ *P.insidiosum* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 34 สายพันธุ์และเชื้อ *Pythium* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ พบ product ขนาด 512 และ 152 bp ส่วนเชื้อราอื่นๆ 23 สายพันธุ์, แบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ และเลือดจากคนปกติ จำนวน 1 รายไม่พบ product ขนาด 512 และ 152 bp และมีการใช้เทคนิค seminested PCR ในการตรวจชิ้นเนื้อที่มีการติดเชื้อ *P.insidiosum* จำนวน 4 ตัวอย่าง, ชิ้นเนื้อที่มีการติดเชื้อ *Candida* spp. จำนวน 2 ตัวอย่างและในสิ่งส่งตรวจจำลอง 3 ตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *P.insidiosum* และ *A.niger* ได้ product จำเพาะจากชิ้นเนื้อที่ติดเชื้อ *P.insidiosum* และสิ่งส่งตรวจจำลองที่ใส่เชื้อ *P.insidiosum* เข้าไปเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *P.insidiosum* อยู่ในรูปของชุดตรวจสำเร็จรูปเพื่อสะดวกในการใช้งานสำหรับสิ่งส่งตรวจต่อไป

คำหลัก: *P.insidiosum* , seminested polymerase chain reaction , ชุดตรวจสำเร็จรูป

Project Code: RSA4780009
Project Title: Development of diagnosis for *Pythium insidiosum* based on molecular biology technique
Investigator: Assoc. Prof. Dr. Chularut Prariyachatigul
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University
E-mail Address: chupra@kku.ac.th
Project Period: 2 years

Pythium insidiosum is a rare pathogen that causes pythiosis in animals and humans with high morbidity and mortality. The accurate and rapid method to diagnose *P. insidiosum* is important and necessary. The purpose of this study was to develop a seminested polymerase chain reaction for the identification of *P. insidiosum* targeted to 18S rRNA gene. Primers were designed from 98 nucleotide sequences of *Pythium* species, other fungi and human. The primer CPL6 and PSL1 was specific for *P. insidiosum*. The primer CPR8 were paired with CPL6 and PSL1, which resulted in PCR products size of 512 and 152 bp. The development of a seminested PCR usually requires strategic planning and multiple attempts to optimize reaction conditions (concentration of the primer CPL6, amplification cycle, concentration of MgCl₂, dNTPs, and Taq DNA polymerase). Sensitivity of the assay was 1 pg that tested with DNA of *P. insidiosum* strain MCC2. Specificity of the assay was tested with DNA extracted from cultures of the 34 isolates of *P. insidiosum*, 5 *Pythium* spp., 23 species of fungi, 10 species of bacteria and healthy normal blood. Seminested PCR produced specific amplicon for each of the *P. insidiosum* and 5 *Pythium* spp., but did not produce amplicons with fungal species, bacterial species and healthy normal blood. Four biopsy tissues of pythiosis, two biopsy tissues of candidosis and three simulated samples were tested and revealed PCR product only in biopsy tissues of pythiosis patients and simulated samples that spiked with *P. insidiosum*. The diagnostic kit for *P. insidiosum* was also developed to use with clinical samples.

Keywords: *P. insidiosum*, seminested PCR, diagnostic kit.