

**DETECTION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. BY USING
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) ASSAYS**

CHALERMPON KAEWJAI

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

**ISBN 974-04-5377-5
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การวินิจฉัยและการจำแนกสายพันธุ์ของ *Acanthamoeba* spp. โดยใช้เทคนิคทางพีซีอาร์ (PCR)
(DETECTION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION
(PCR) ASSAYS)

เฉลิมพล แก้วใจ 4437537 TMTM/M

วท.ม.(อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : นิตยา ธรรมพาลีศ M.Sc.(BIOCHEMISTRY), ชาริรัตน์ กะลัม
พะเหติ Ph.D.(MICROBIOLOGY), คารารวรรณ วนะชีวานาวิน พ.บ., อุษณีย์ สุทธิสารสุนทร พ.บ.,
D.T.M.&H.(BANGKOK), ดวงพร นะคาพันธุ์ชัย พ.บ., M.Sc.(TROPICAL MEDICINE)

บทคัดย่อ

อะแคนทามีบาเป็นเชื้ออะมีบาสิ่งแวดล้อมซึ่งทำให้เกิดโรคหรือไม่เกิดโรคในคนได้ และมักพบเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อที่กระจกตาในคนที่ใช้คอนแทกเลนส์ (CL) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อตรวจหาเชื้ออะแคนทามีบาโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและใช้เทคนิคทางพีซีอาร์และ PCR-RFLP จากยีนส์ 18S rRNA เพื่อจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้ เมื่อนำสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยจำนวน 52 ราย มาทำการเพาะเชื้อบน non-nutrient agar (NNA) และวินิจฉัยจำแนกตามลักษณะของซีสต์และโทรโฟซอยท์ พบว่า corneal swabs จากผู้ป่วยกระจกตาที่ใช้ CL จำนวน 29 ราย และ corneal swab ของผู้ป่วยกระจกตาที่ไม่ได้ใช้ CL จำนวน 6 ราย ไม่พบเชื้อ ส่วนตัวอย่างที่เป็นน้ำยาแช่ในตลับคอนแทกเลนส์ของผู้ป่วยกระจกตาจำนวน 3 ตลับจาก 17 ตลับ มีเชื้ออะแคนทามีบา 2 ชนิด (Ac1MUTM และ Ac2MUTM) และฮาร์ทมานเนลลา 1 ชนิด (Ha1MUTM) ตามลำดับ จากนั้นได้ใช้เทคนิคทางพีซีอาร์โดยมี genus-specific primers (JDP set) ที่จำเพาะต่อสกุลและ pathogenic-specific primers ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ก่อโรค (Ac6 set) ตรวจยืนยันว่าเชื้อที่แยกได้ว่าเป็นเชื้ออะแคนทามีบาจริงโดยเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิดคือ เชื้อชนิดไม่บุกรุกเชิงเดี่ยว *A. tubiashi*, ชนิดบุกรุกเชิงเดี่ยว *A. polyphaga* และ ชนิดบุกรุกและปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย 1 ชนิด *A. castellanii* นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ Primers ที่ออกแบบขึ้นมาเอง 1 คู่ จากยีนส์ 18S rRNA ของเชื้อ *A. castellanii* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ขนาด 2.1 กิโลเบส เมื่อผลิตภัณฑ์นี้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดที่แตกต่างกันคือ *HaeIII*, *HinfI* และ *MspI* พบว่าการใช้เอนไซม์ *MspI* ย่อยผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จะให้รูปแบบ RFLP ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้ออะแคนทามีบาได้ดีที่สุด ดังนั้นเทคนิค PCR-RFLP ที่พัฒนาขึ้นนี้มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัยและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออะแคนทามีบาออกจากเชื้ออะแคนทามีบาสายพันธุ์อื่นๆ ได้

DETECTION OF *ACANTHAMOEBA* SPP. BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) ASSAYS

CHALERMPON KAEWJAI 4437537 TMTM/M

M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS : NITAYA THAMMAPALERD, M.Sc.(BIOCHEMISTRY), THAREERAT KALAMBAHETI, Ph.D.(MICROBIOLOGY), DARAWAN WANACHIWANAWIN, M.D.,USANEE SUTHISARNSUNTORN, M.D., D.T.M.&H.(BANGKOK), DUANGPORN NACAPUNCHAI, M.D., M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

ABSTRACT

The genus *Acanthamoeba* is comprised of opportunistic organisms associated with wearing contact lenses (CL). The main objectives of this study were to detect *Acanthamoeba* by culture method and to genotype individual isolates using PCR and PCR-RFLP of the 18S rRNA gene. A total of 52 subjects, and 3 reference strains, i.e. axenic non-invasive *A. tubiashi*, axenic invasive *A. polyphaga*, and monoxenic invasive *A. castellanii* were recruited into this study. The fresh samples were dropped onto non-nutrient agar (NNA) and observed microscopically for the characteristic appearance of *Acanthamoeba* trophozoites and/or cysts for both diagnosis and culture purposes. Corneal swabs from 29 CL users and 6 non-CL users gave no positive cysts or trophozoties. Three clinical samples were positive for free-living amoebae (FLA) among 17 fluid samples from contact lens storage cases, of which two were *Acanthamoeba* spp. (Ac1MUTM and Ac2MUTM) and 1 *Hartmannella* spp. (Ha1MUTM). These 2 *Acanthamoeba* spp. were further confirmed by PCR using genus-specific primers (JDP set) and pathogenic-specific primers for strains of *Acanthamoeba* (Ac6 set). DNA extraction was done by Nucleospin kit. A pair of genus-specific primers (Ac1 and Ac2) was designed based on the 18S rRNA of *A. castellanii*, which amplified approximately 2.1 kb amplicon, followed by digestion with 3 restriction endonucleases, i.e. *Hae*III, *Hin*fl and *Msp*I, were analyzed and compared with those of three reference acanthamoebae. The usefulness of the 18S rDNA PCR products for detecting and reliably genotyping *Acanthamoeba* spp. in *Acanthamoeba* keratitis was demonstrated. For *Acanthamoeba* speciation in this study, use of PCR-RFLP product derived from the 18S rRNA gene after *Msp*I digestion was superior. The dendogram tree from these RFLP patterns revealed variation, which could be applied for diagnosis and molecular typing of invasive and noninvasive species of *Acanthamoeba*, especially after digestion with *Msp*I.

KEY WORDS : *ACANTHAMOEBA* KERATITIS / PCR / RFLP / MOLECULAR TYPING / DIAGNOSIS

53 pp. ISBN 974-04-5377-5