LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

17 SEP 1996

DETECTION AND IDENTIFICATION OF IMPORTANT FUNGI CAUSING SYSTEMIC MYCOSES IN THAILAND BY PCR

CHULARUT PRARIYACHATIGUL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
C559d
1996

36392

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจและวินิจฉัยเชื้อราก่อโรคต่ออวัยวะภายในที่สำคัญในประเทศไทยโดยวิธี เพิ่ม ดี เอ็น เอ แบบ พี ซี อาร์

ผู้วิจัย จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิทยา มีวุฒิสม Ph.D.

อังคณา ฉายประเสริฐ Dr. rer. nat.

สง่า พัฒนากิจสกุล D. Med. Sc.

วันที่สำเร็จการศึกษา 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยาลูกโซ่เอ็นไซม์โพลิเมอเรส(พีซีอาร์) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการนำมาใช้ตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะและนำมาช่วยในการวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลายชนิด วิธีนี้เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากนั้นจึงทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนขึ้น ด้วยวิธีอิเล็คโตรฟอริซีสบนวุ้น แล้วย้อมสีเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา วิธีตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อราที่ก่อโรค กับอวัยวะภายใน ที่พบได้ในประเทศไทย คือ ***Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Penicillium marneffei*** และ ***Pythium insidiosum*** โดยใช้วิธีพีซีอาร์ งานวิจัยเริ่มตั้งแต่ออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้สำหรับจับกับสายดีเอ็นเอของเชื้อที่จะใช้ทดสอบ โดยอาศัยข้อมูลของยีน 18S rRNAจากธนาคารดีเอ็นเอ ในขั้นแรกได้ออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบ CPL1-CPR2 เพื่อใช้สำหรับเพิ่มดีเอ็นเอของเชื้อรา ได้ผลผลิตขนาด 606 เบส ต่อมาได้ทำการออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มเติมอีกหลายชิ้น เพื่อใช้แยกเชื้อราชนิดต่างๆออกจากกัน โดยในการออกแบบนี้ใช้ข้อมูลที่มีในธนาคารดีเอ็นเอซึ่งเรียกมาจากฐานข้อมูล Entrez release 11 ใช้โปรแกรม Macvector 4.1.4 ดีเอ็นเอต้นแบบคู่ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ ***A. fumigatus*** คือ CPL1-CPR5 ได้ดีเอ็นเอผลผลิต 234 เบส ต่อ ***C. albicans*** คือ CPL3-CPR2 ได้ดีเอ็นเอผลผลิต 386 เบส ต่อ ***C. neoformans*** คือ CPL1-CPR4 ได้ดีเอ็นเอผลผลิต 343 เบส และ ต่อ ***H. capsulatum*** คือ CPL1-CPR6 ได้ ดีเอ็นเอผลผลิต 270 เบส การศึกษาและทดสอบดีเอ็นเอต้นแบบต่างๆ ดังกล่าว กับดีเอ็นเอของเชื้อที่จำเพาะต่อกันนั้น มีการศึกษาและดัดแปลงวิธีการตรวจสอบโดยขบวนการพีซีอาร์หลายขั้นตอน เช่น อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอจับคู่กัน เวลาที่ใช้สำหรับให้ดีเอ็นเอจับคู่กัน จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จน

Copyright by Mahidol University

กระทั่งได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละคู่ โดยนำมาทำการทดสอบกับเชื้อราต่าง ๆ 22 สกุล (97 สายพันธุ์) แบคทีเรีย 10 สกุล (10 สายพันธุ์) และดีเอ็นเอจากคน 1 ตัวอย่าง พบว่า CPL1-CPR5 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ผลผลิตที่จำเพาะของ *Aspergillus* sp. 9 สายพันธุ์ CPL3-CPR2 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และได้ผลผลิตจำเพาะกับ *Candida* sp. 23 สายพันธุ์ CPL1-CPR4 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ *C. neoformans* 30 สายพันธุ์ และยีสต์สายพันธุ์ใกล้ชิดอีก 1 สายพันธุ์คือ *Trichosporon* sp. ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธี hybridization กับ probe (INSR 4) ที่จำเพาะ พบว่ามีความจำเพาะต่อ *C. neoformans* เท่านั้น CPL1-CPR6 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อราได้ 3 สกุล (15 สายพันธุ์)คือ *H. capsulatum* (5 สายพันธุ์), *Basidiobolus ranarum* (1 สายพันธุ์) และ *Aspergillus* sp. (9 สายพันธุ์) สำหรับเชื้อ *P. marneffei* และ *P. insidiosum* นั้น ในฐานข้อมูลของยีน 18S rRNA จากธนาคารดีเอ็นเอยังไม่มีการบันทึกลำดับเบสไว้ จึงได้ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อราดังกล่าว โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบคู่ที่เหมาะสมกับเชื้อราทั้งหมด (CPL1-CPR2) และนำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ซึ่งมีขนาด 606 เบส มาใส่ในยีนพาหะ จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* เพิ่มปริมาณยีนพาหะโดยการเลี้ยงเซลล์ *E. coli* ให้มีปริมาณมากพอ แล้วจึงสกัดยีนพาหะ ที่มีดีเอ็นเอผลผลิต 606 เบส สอดแทรกอยู่ด้วยนี้มาทำการหาลำดับเบส เพื่อใช้ประโยชน์ในการออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการตรวจหาและวินิจฉัยชนิดของเชื้อต่อโรคทั้งสองชนิดโดยวิธีพีซีอาร์ต่อไป

ได้ทดลองใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ CPL1-CPR4 ทดสอบกับสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยเยื่อหุ้มสมองอักเสบ จำนวน 49 ตัวอย่าง พบว่าน้ำไขสันหลัง 24 ตัวอย่างที่เพาะแยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ จะสามารถตรวจพบโดยวิธีพีซีอาร์ได้เช่นกันแต่ใช้เวลาที่รวดเร็วกว่า คือใช้เวลา 4 ชั่วโมงแทนที่จะเป็น 2-3 วัน และอีก 25 ตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อใดๆจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร น้ำไขสันหลัง 12 ตัวอย่างซึ่งให้ผลลบต่อการตรวจหา *C.neoformans* จากทั้ง 3 วิธีที่ศึกษาจะให้ผลลบต่อวิธีพีซีอาร์ ส่วนน้ำไขสันหลังอีก 13 ตัวอย่าง ตรวจพบโดยวิธีพีซีอาร์ 6 ตัวอย่าง โดยวิธี India ink 12 ตัวอย่าง และ ตรวจพบโดย latex agglutination ทั้ง 13 ตัวอย่าง นอกจากนี้ เพื่อต้องการทราบปริมาณเซลล์ของ *C. neoformans* น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์ จึงศึกษาการใช้เซลล์ของ *C. neoformans* ปริมาณต่างๆ กันใส่ลงในน้ำไขสันหลังที่ตรวจแล้วว่าไม่มีเชื้อใด ๆ พบว่าปริมาณเชื้อ 5 เซลล์ในน้ำไขสันหลัง 1 มิลลิลิตร สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์

จากการศึกษานี้สรุปว่าวิธีพีซีอาร์สามารถนำมาใช้ตรวจและวินิจฉัยเชื้อราก่อโรคที่อวัยวะภายในที่สำคัญคือ *C. neoformans* จากน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยโดยตรงโดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบและวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นได้ผลดีเมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อทั้งในด้านความไวและความจำเพาะ แต่ได้ผล

Copyright© by Mahidol University

ในด้านความไวต่ำกว่าการตรวจหาเซลล์โดยวิธี India ink และตรวจหาแอนติเจนโดยวิธี latex agglutination

ส่วนเชื้อ *A. fumigatus, C. albicans* และ *H. capsulatum* แม้จะยังไม่ได้ศึกษากับสิ่งส่งตรวจ แต่ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้ออกแบบไว้มีความจำเพาะสูง ส่วนผลในการตรวจวินิจฉัยกับสิ่งส่งตรวจจำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองต่อไป สำหรับ nucleotide sequences ขนาด 606 เบสของ *P. marneffei* และ *P. insidiosum* ที่ศึกษาในครั้งนี้นับว่าได้ข้อมูลใหม่เกี่ยวกับการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA ของเชื้อทั้งสองที่มีการรายงานเป็นครั้งแรก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ออกแบบดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมต่อไป

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Detection and Identification of Important Fungi Causing Systemic Mycoses in Thailand by PCR

Name Chularut Prariyachatigul

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Vithaya Meevootisom, Ph.D.

Angkana Chaiprasert, Dr.rer.nat.

Sa-nga Pattanakitsakul, D.Med.Sc.

Date of Graduation 17 May B. E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is at present the most powerful analytical tool for detection of specific nucleic acid sequences. PCR has shown its values in diagnosis of many infections. This method is based on the *in vitro* amplification of DNA segments followed with electrophoresis and ethidium bromide staining. The study has been designed to develop the PCR technique for detection and identification of important fungi causing systemic mycoses in Thailand. These fungi are *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum*. A first pair of primers was designed as a pair of universal primers (CPL1-CPR2) by using nucleotide sequence database of 18S rRNA gene from GenBank. The primers could differentiate DNA of 97 strains of fungi from that of 10 strains of bacteria and 1 human. Four more pairs of primers which were specific for fungi causing systemic mycoses in Thailand were designed by using alignment program of Macvector 4.1.4 from Entrez release 11. They were CPL1-

Copyright by Mahidol University

CPR5, CPL3-CPR2, CPL1-CPR4 and CPL1-CPR6 which were specific for *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans* and *H. capsulatum*, respectively, and the corresponding PCR products were 242 bp, 386 bp, 343 bp and 270 bp in sizes, respectively. Optimization of the PCR conditions were done with these primers by varying annealing temperatures, annealing times and cycles of amplification until a specific optimal condition was found for each pair of primers. Out of the DNA of 22 genera (97 strains) of fungi, 10 genera (10 strains) of bacteria and 1 human, only that of one genus (9 strains) of *Aspergillus* sp. was amplified by CPL1-CPR5, that of one genus (23 strains) of *Candida* sp. was amplified by CPL3-CPR2, that of two genera (31 strains) of *C. neoformans* (30 strains) and one strain of *Trichosporon* sp. which was a closely related fungus to *C. neoformans* were amplified by CPL1-CPR4. The two organisms could be differentiated after hybridization with a specific probe (INSR4). DNA of three genera (15 strains) of fungi including *H. capsulatum* (5 strains), *Basidiobolus ranarum* (1 strain) and *Aspergillus* sp. (9 strains) were amplified with CPL1-CPR6 and yielded specific amplified products. Since no data of 18S rRNA gene sequences of *P. marneffei* and *P. insidiosum* were recorded in GenBank, therefore, the universal primers (CPL1-CPR2) were used to amplify DNA of the two organisms. The specific 606 bp amplified products obtained were inserted into a plasmid vector and used to transform *Escherichia coli*. The transformant plasmids were amplified and extracted from the *E.coli* cells. The 606 bases insert was sequenced with the dideoxy chain termination method with both manual and automatic sequencers. The primers for *P. marneffei* and *P. insidiosum* could then be redesigned from the newly obtained base sequences.

The CPL1-CPR4 primers were selected for further study to amplify DNA of CSF of 49 patients suspected of having cryptococcal

Copyright by Mahidol University

meningitis. Twenty-four specimens with definite detection of *C. neoformans* by culture were also positive by the developed PCR method within a few hours instead of taking 2-3 days. Twenty-five samples were culture negative. Of these 25 CSFs, 12 were negative for both the presence of encapsulated yeasts and cryptococcal antigen. The other 13 CSFs, 12 samples were positive by India ink, 13 samples were positive by latex agglutination test and 6 samples were positive by PCR. To identify the smallest number of *Cryptococcus* cells (present in CSF) that still allow detection by the PCR method, different amount of *C. neoformans* cells were added into sterile CSF at a final concentration ranging from 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 and 10 cells/ml CSFs. The results showed that as little as 5 cells/ml of CSF can be detected by the PCR method.

From this study it could be concluded that the newly developed PCR systems could be used for diagnosis of cryptococcal meningitis of CSF. The sensitivity and specificity is 100% when compared with culture method. But when compared with India ink and latex agglutination test, the sensitivity is 83.33% and 81.08% respectively.The other developed PCR systems for diagnosis of aspergillosis, candidosis and histoplasmosis were shown to give good results with the purified fungal DNA with high specificity and sensitivity. However, they had not yet been tested with clinical specimens. Further work is still needed. This result was seem to be new report on part of 18S rRNA gene sequences of *P. marneffei* and *P. insidiosum.* The finding may be useful for designing primers specific for detection and identification of the two organisms in the future.

Copyright by Mahidol University