



25 JAN 1994

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PYTHIUM INSIDIOSUM  
THE ETIOLOGIC AGENT OF HUMAN PYTHIOSIS

RAPEE BORISOOTH

อภิรักษ์นันทนาการ

๑๓

ร.ร. อภิรักษ์นันทนาการ ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

25111

ชื่อวิทยานิพนธ์

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพและระดับโมเลกุล  
ของ Pythium insidiosum ซึ่งเป็นสาเหตุ  
ของโรค pythiosis ในคน

ผู้วิจัย

รพี บริสุทธิ์

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อังคณา ฉายประเสริฐ, Dr.rer.nat.

วันชัย วนะชีวานาวิน, M.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา

25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2536

#### บทคัดย่อ

เชื้อรา *P. insidiosum* เป็นราสปีสี่ใหม่ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค pythiosis ในคน และ สัตว์ต่างๆ เช่น ใน ม้า, โค, กระบือ, สุนัข, ปลา และ แมว โรค pythiosis ในคนมีรายงานครั้งแรกจากประเทศไทย จากลักษณะอาการของโรคสามารถแยกผู้ป่วยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก มีอาการติดเชื้อ พิพที่เย็บที่บริเวณใต้ผิวหนัง (cutaneous pythiosis) และบางรายมีการ แพร่กระจายของโรค (systemic pythiosis) ผู้ป่วยในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยชาลัสซีเมีย ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อแบบแพร่กระจายอาการดำเนินโรครุนแรง มีการอุดตันของเส้นเลือดแดง (arterial occlusion) และมีการเน่าตายของเนื้อเยื่อ (gangrene) การรักษาที่ได้ผลคือ การผ่าตัดส่วนที่เป็นโรคทิ้ง แต่บางรายก็ไม่สามารถช่วยชีวิตไว้ได้ ผู้ป่วยในกลุ่มที่สอง มีอาการแก้วตาอักเสบที่เกิดจากเชื้อพิพที่เย็บ (keratic pythiosis) ผู้ป่วยกลุ่มนี้มีเพียง 1 รายที่มีความผิดปกติของฮีโมโกลบิน (1/5) การรักษาผู้ป่วยกลุ่มนี้คือการผ่าตัดเปลี่ยนกระจกตาและหยอดตาด้วยยาฆ่าเชื้อรา แต่บางรายต้องรักษาโดยการผ่าตัดเอาลูกตาออก

การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพและระดับโมเลกุลของ เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มเปรียบเทียบกับพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยทั้งหมด 16 สายพันธุ์, โดย 7 สายพันธุ์ แยกได้จากผู้ป่วย keratic pythiosis และอีก 9 สายพันธุ์แยกได้จากผู้ป่วย systemic pythiosis, ถูกกระตุ้นให้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในห้องปฏิบัติการได้ โดยแต่ละสายพันธุ์ สามารถสร้าง vegetative hyphae, reproductive hyphae, zoosporangia และ zoospores ได้เหมือนกัน ซึ่งสามารถสรุปเป็นวงจรชีวิตแบบไม่อาศัยเพศของ *P. insidiosum* ได้ และยังพบว่าขนาดของโครงสร้างดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เนื่องจากผู้ป่วย systemic pythiosis ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยชาลส์ซีเมีย ซึ่งมีระดับของเหล็กทั้งในเลือดและเนื้อเยื่อต่างๆสูงกว่าคนปกติ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งดูผลของเหล็กต่อการเจริญของเชื้อ *Pythium* โดยนำเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่มนี้ 2 สายพันธุ์ เลี้ยงในอาหารที่มีเหล็ก, ไม่มีเหล็ก (โดยเติมสารจับเหล็ก) พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวยังเจริญได้ในอาหารที่มีซีรัมของผู้ป่วยชาลส์ซีเมียซึ่งมีเหล็กมากได้ดีไม่แตกต่างกับในอาหารที่มีซีรัมคนปกติ จึงอาจสรุปได้ว่า การมีภาวะเหล็กเกินในผู้ป่วยชาลส์ซีเมียอาจไม่ใช่ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อดำเนินโรคในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้

การเปรียบเทียบผลของ ribo-typing ของเชื้อก่อโรคทั้งสองกลุ่ม โดยวิธี Southern blot DNA hybridization กับ rRNA ยีนของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* พบว่า DNA ของเชื้อก่อโรคทั้งสองกลุ่ม เมื่อย่อยด้วย *Eco* RI และ *Pst* I มีแบบของแถบไฮบริไดเซชัน 4 และ 7 แบบตามลำดับ โดยแบบของแถบไฮบริไดเซชันนี้ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับกลุ่มอาการของโรค pythiosis แต่อย่างใด

โดยสรุปแล้วเชื้อ *P. insidiosum* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยกลุ่ม keratic pythiosis และ กลุ่ม systemic pythiosis มีคุณสมบัติทางชีวภาพและในระดับโมเลกุลไม่แตกต่างกัน.

Thesis Title	Biological and Molecular Characterization of <u>Pythium</u> <u>insidiosum</u> the Etiologic Agent of Human Pythiosis
Name	Rapee Borisooth
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Angkana Chaiprasert, Dr.rer.nat. Wanchai Wanachiwanawin, M.D.
Date of Graduation	25 November B.E. 2536 (1993)

#### ABSTRACT

*Pythium insidiosum* is a newly described and illustrated human pathogenic fungal species. It is the etiologic agent causing pythiosis, a cosmopolitan disease of horses, cattle, dogs, fish, and cats. Human pythiosis was first reported from Thailand. According to the clinical symptoms of human pythiosis, the patients could be classified into 2 groups. The first group of patients had cutaneous infection (cutaneous pythiosis) and some had progressive systemic *Pythium* infection (systemic pythiosis). Most of them had an underlying disease of thalassemia hemoglobinopathy syndrome. Systemic pythiosis cases developed severe clinical features including arterial occlusion and gangrene. Radical amputation was the only method to ensure survival of the patients, but some patients died. Another group of patients had corneal

*Pythium* infection (keratic pythiosis). One of them had thalassaemia hemoglobinopathy syndrome (1/5). The therapeutic keratoplasty followed by giving eye-drop of some antifungal agents was recommended for keratic pythiosis. However, some patients received evisceration therapy.

The biological and molecular characterizations of *P. insidiosum* isolated from 2 groups of patients were compared in this study. The study revealed that all 16 strains of *P. insidiosum*, 7 strains isolated from keratic pythiosis cases and 9 strains isolated from systemic pythiosis cases, could be induced to produce asexual reproduction in laboratory. Each strain could produce vegetative hyphae, reproductive hyphae, zoosporangia and zoospores similarly. And the size of these structures were significantly not different.

Since most of systemic pythiosis cases were thalassaemic patients who had iron level higher than normal persons, so the effects of iron on growth of *P. insidiosum* were studied. Two strains of *P. insidiosum* isolated from 2 systemic pythiosis patients were grown significantly not differently in the iron media and iron-free (iron-chelator excess) media. Both strains were also grown not differently in thalassaemic and normal sera media. This study could be summarized that the iron overload status in thalassaemic patients might not be the important predisposing factor of the disease in these patients.

The ribo-typing of both isolated groups were compared by using Southern blot DNA hybridization with rRNA-gene of yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. The ribo-typing of both

isolated groups had 4 types for *Eco* RI digested-DNA and 7 types for *Pst* I digested-DNA. There was no specific DNA-hybridization patterns related to *P. insidiosum* strains that caused systemic pythiosis or keratic pythiosis.

In summary, *P. insidiosum* strains isolated from keratic pythiosis cases and systemic pythiosis cases had biological and molecular characterizations not differently.

