



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร

สิงหาคม 2543



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ *Molecular Typing of Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา)

โดย รองศาสตราจารย์ ดร. อริยา จินตามพร

สิงหาคม 2543

สัญญาเลขที่ PDF/54/2540

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*
(การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา)

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของนักวิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: PDF4080054

Project Title: Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Ariya Chindamporn, Chulalongkorn University

E-mail Address: fmedacd@md2.md.chula.ac.th

Project Period: 2 years and 4 months

To study the prevalence, phenotype and genotype of clinical isolated *Cryptococcus neoformans*, the cultures in Mycology unit, King Chulalongkorn Memorial Hospital from August 1997 to July 1999 were recruited. The microscopic morphology examination using India-ink preparation, biochemical identification kit, API 20CAUX (BioM'erieux, France), urease test, phenol oxidase test were performed to obtain the genus and species. Their varieties and serotypes were examined by canavanine-glycine medium and CrytoCheck (Iatron, Japan) respectively. The polymorphism in the hypervariable region using minisatellite M13 primer in the polymerase chain reaction or so called PCR-RAPD profile was used for genotypic study. A total of six hundred thirty eight strains from cryptococcal meningitis patients were isolated from cerebrospinal fluid (97%) and others (3%). Most of the patients whom the specimens were sent were suffered from HIV infection (50.5% of the available data, the total data was available only 53%). In contrast, only four non-HIV infected patients whom physicians diagnosed as SLE were included. The phenotype and serotype results revealed that all these cultures were *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. grubii*). Further, one hundred forty strains were used to investigate for the PCR-RAPD profile. Among these strains, three types of the profiles (96.5%, 2.8%, and 0.7%) were found. The major type were indistinguished from the VNI genotype from the report of Meyer et al. Another two types bearing the 2-3 intense bands different from the VNI type. The polymorphic profiles were found in 3 strains isolated from 1/5 cases (HIV infected patients) whom admitted 2-3 episodes and 1 strain from 1/3 cases (SLE patients). The genotypic profile of these four strains were the same and different from the major type. The last profile was from the individual isolate from HIV-infected patient. In conclusion, the result of phenotype and genotype was corresponsed to each other but the later using PCR-RAPD method revealed more degree of strain discrimination. However, to confirm this discrimination with other molecular technique is suggested.

Keywords: PCR-RAPD, M13 primer, molecular typing, *Cryptococcus neoformans*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: PDF4080054

ชื่อโครงการ: การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา

ชื่อนักวิจัย: รศ. ดร. อริยา จินตามพร

E-mail Address: fmedacd@md2.md.chula.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 4 เดือน

การศึกษาความชุก ลักษณะทางกายภาพ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยใช้เชื้อที่ส่งยังหน่วยเชื้อรา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างเดือน สิงหาคม 2540 ถึงเดือนกรกฎาคม 2542 วิธีการแยก genus และ species อาศัยการศึกษาทางจุลทรรศน์วิทยาด้วย India-ink preparation, การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย API 20C AUX (BioMérieux, France), urease test, phenoloxidase test และวิธีการแยก variety และ serotype ด้วย canavanine-glycine medium และ CryptoCheck (Iatron, Japan) ตามลำดับ ลักษณะทางพันธุกรรมศึกษาจากความหลากหลายในบริเวณ hypervariable โดยวิธี PCR-RAPD ใช้ M13 primer เชื้อจำนวนหกร้อยสามสิบแปดสายพันธุ์แยกได้จากน้ำไขสันหลัง (97%) และจากสิ่งส่งตรวจอื่น(3%)จากผู้ป่วย cryptococcal meningitis ผู้ป่วยเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี (50.5% จากข้อมูลที่มี, ข้อมูลที่มีอยู่ทั้งหมดคิดเป็น 53% ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด) มีผู้ป่วยในกลุ่มนี้ที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี และเป็นโรค SLE เพียง 4 คน ผลจากการศึกษา phenotype และ serotype พบว่า เชื้อทั้งหมดเป็น *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype A (*C. grubii*) จากนั้น ได้ทำการศึกษารูปแบบ PCR-RAPD ของเชื้อจำนวน 140 สายพันธุ์ และพบว่า มี 3 รูปแบบ (96.5%, 2.8%, and 0.7%) เชื้อส่วนใหญ่มีรูปแบบเช่นเดียวกับรูปแบบ VNI ที่รายงานโดย Meyer และคณะ รูปแบบอีกสองรูปแบบนั้นมีจำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างจากรูปแบบแรกประมาณ 2-3 แถบ รูปแบบที่หลากหลายพบในเชื้อ 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย 1 ใน 5 คน (กลุ่มติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี) ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล 2-3 ครั้ง และ 1 สายพันธุ์จากผู้ป่วยจำนวน 1/3 คนที่เป็น SLE เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีรูปแบบเดียวกันซึ่งแตกต่างจากรูปแบบ VNI อีกหนึ่งรูปแบบพบในเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วีที่เข้ารับการรักษาเพียงครั้งเดียว โดยสรุป ผลการทดลองของ phenotype และ genotype มีความสอดคล้องกันโดยวิธี PCR-RAPD ให้ผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่ละเอียดกว่า อย่างไรก็ตาม ควรยืนยันความหลากหลายนี้ด้วยวิธีอื่น

คำหลัก: PCR-RAPD, M13 primer, molecular typing, *Cryptococcus neoformans*

Acknowledgement

1. ทู่นสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2. เจ้าหน้าที่หน่วยร่ววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. คุณพัชรี กัมมารเจษฎากุล และคุณกมลรัตน์ โพธิ์ปิ่น ที่ได้ช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการ
4. The Hitachi Scholarship Foundation, Japan. สำหรับการสนับสนุนในการเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง "Molecular and Serological Characterization of *Cryptococcus neoformans* from Thai Clinical Isolates" โดย Ariya Chindamporn, Patcharee Kammanchasadakul, and Samaniya Sukroongreung. ในการประชุม 9th International Congress on Infectious Diseases, April 10-13, 2000 ที่ Buenos Aires, Argentina
5. ศาสตราจารย์ กิตติคุณ แพทย์หญิงสมนีย์ มิลินทรานุกร ที่กรุณาเป็น mentor

การแยกเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วยวิธีทางอนุชีววิทยา (Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans*)

โรค cryptococcosis เกิดจากเชื้อราฉวยโอกาส encapsulated yeast ชื่อ *Cryptococcus neoformans* ที่มักจะก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะผู้ป่วยเอดส์ ส่วนของ capsule ของเชื้อนี้ประกอบด้วย polysaccharide ที่ต่างกัน ทำให้แบ่งเชื้อได้เป็น 2 varieties คือ var. *neoformans* (serotype A, D, AD) และ var. *gattii* (serotype B, C) ยังไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนที่แสดงถึงความแตกต่างของอาการและหรือพยาธิสภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อที่ variety ต่างกัน กล่าวกันว่า ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่เกิดจาก *C. neoformans* var. *gattii* มักเป็น competent host ขณะที่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคที่เกิดจาก *C. neoformans* var. *neoformans* มักเป็น immunocompromised host ในปี 1999, Franzot SP et al. จัดแบ่ง serotype A จาก serotype D เป็น variety ใหม่ ชื่อ *C. neoformans* var. *grubii* มีหลักฐานที่แสดงถึงการติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อทั้ง serotype เดียวกันและต่างกัน หลักฐานเหล่านั้นส่วนใหญ่เป็นข้อมูลสรุปจากต่างประเทศ และมักใช้อ้างอิงในการประชุมวิชาการด้านโรคติดเชื้อทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศอยู่เนืองๆ ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีอุบัติการณ์ของโรคเอดส์สูง และผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่นๆอีกมาก จากจุดนี้จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษา รวบรวมข้อมูลของประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นแนวทางและด้านลึก ตัวอย่างข้อมูลที่น่าสนใจ เช่น อุบัติการณ์ของโรค อุบัติการณ์ของเชื้อ (variety ใด serotype ใด) ทั้งสองอุบัติการณ์มีความสัมพันธ์กับสภาวะผู้ป่วยอย่างไร เชื้อที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อใหม่เป็นชนิดเดิมหรือไม่ เหล่านี้เป็นคำถามที่จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาระบาดวิทยาของโรคและของเชื้อก่อโรค

วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. ศึกษาความชุกของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วง 24 เดือน
2. พิสูจน์แยกชนิดของยีสต์นี้ว่าเป็น serotype ใด variety ใด
3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อที่แยกได้กับประวัติของผู้ป่วย (ผู้ป่วยมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และหรือเป็นผู้ป่วยเอดส์หรือไม่)

4. ศึกษา molecular fingerprint ของ *Cryptococcus neoformans* ทั้งสอง varieties ที่แยกได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย minisatellite phage M-13 core sequence เป็น primer

บททวนวรรณกรรม

Cryptococcus neoformans เป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่เป็นสาเหตุก่อโรค cryptococcosis โดยส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง Buss (1984) รายงานเป็นครั้งแรกถึงการแยกเชื้อนี้ได้จากรอยโรคในผู้ป่วย ปีเดียวกัน Sanfelice แยกเชื้อนี้ได้จากน้ำผลไม้และน้ำนม ปรากฏว่า ในช่วงประมาณ 10 ปีนี้ มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคนี้มากขึ้น โดยพยายามปรับปรุงวิธีการวินิจฉัยโรค วิธีพิสูจน์แยกชนิดเชื้อ ศึกษาการก่อโรค ศึกษาพยาธิวิทยา รวมทั้งระบาดวิทยา เนื่องจากอุบัติการณ์ของโรคเพิ่มขึ้นและการเพิ่มนี้สอดคล้องกับการเพิ่มของอุบัติการณ์ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องอื่น เช่น การปลูกถ่ายอวัยวะ มะเร็งเม็ดเลือดขาว เบาหวาน ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเป็นประจำ เป็นต้น ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้มีโอกาสที่จะเป็นโรคนี้ได้อีกและสามารถถึงแก่ชีวิตได้ จากรายงานของ Speed และคณะ (1994) พบว่าอุบัติการณ์โรค cryptococcosis ในมลรัฐวискอนซินส์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า จากการคำนวณในปี 1980 – 81 และ 1989 – 90 ซึ่งเป็นช่วงที่อุบัติการณ์ผู้ป่วยเอดส์เพิ่มขึ้น นอกจากเชื้อนี้ทำให้เกิดโรคในคนแล้วยังสามารถทำให้เกิดโรคในสัตว์ได้ด้วย ตามที่มีรายงานพบว่าทำให้เกิดพยาธิสภาพในแมว และใน ferret สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานการพบโรคนี้เป็นครั้งแรกโดยสถิตินิมานการและคณะ (1960)

เชื้อที่ก่อให้เกิดโรค cryptococcosis นี้ มี 2 varieties คือ var.*neoformans* serotype A, D, AD และ var.*gattii* (serotype B,C) (*C. basicillisporus*) การก่ออาการและอาการแสดงในผู้ป่วย การรักษา นิเวศวิทยาและระบาดวิทยามีความแตกต่างกันโดย var.*neoformans* มักจะเป็นสาเหตุให้ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องส่วนใหญ่เป็นผู้ป่วยเอดส์ และมีรายงานจากประเทศต่างๆทั่วโลกซึ่งสอดคล้องกับนิเวศวิทยาของเชื้อที่พบว่าเชื้อนี้เป็นป็นป้อนในดิน มูลนก และตามเปลือกไม้ เช่น เปลือกต้นยูคาลิปตัส ต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*, *E. teleiticornis*) บริเวณใกล้เคียงต้นยูคาลิปตัส ทั้งในเขตร้อน และเขตอบอุ่น ขณะที่อีก variety นั้นมักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคใน healthy host มีรายงานน้อยที่พบเป็นผู้ป่วยเอดส์เมื่อเปรียบเทียบกับ variety แรก ด้านระบาดวิทยา โดยส่วนใหญ่เชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยติดเชื้อเอช ไอ วี ทั่วโลกมักเป็น serotype A สำหรับการติดเชื้อจาก serotype D มักพบในแถบยุโรป เช่น ในประเทศฝรั่งเศส

อิตาลี เดนมาร์ก เป็นต้น ผู้ป่วยเหล่านั้นมักเป็นผู้ป่วยที่สูงอายุกว่าอีกกลุ่ม และมักมีพยาธิสภาพที่ผิวหนังและมีประวัติการใช้ corticosteroid Franzot SP และคณะ (1999) รายงานความแตกต่างทั้ง phenotype และ genotype ระหว่าง serotype A และ serotype D จึงจัดแยก serotype A จาก variety *neoformans* ตั้งชื่อใหม่เป็น var. *grubii*

เนื่องจากวิทยาการก้าวหน้าทางอนุวิทยาทำให้เกิดเทคนิคใหม่ขึ้นที่สามารถจะศึกษา DNA polymorphism ได้ ทำให้ความรู้เกี่ยวกับระบาดวิทยา ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มความละเอียดและแม่นยำในการพิสูจน์แยกชนิดเชื้ออีกด้วย โดยความสามารถของ Schwarz และ Cantor (1982) ที่คิดค้นเทคนิคการศึกษา chromosomal pattern (karyotype) ขึ้น Perfect และคณะ (1989) ได้อาศัยหลักการ DNA polymorphism และเทคนิคที่คิดค้นใหม่ (contour clamped homogeneous field gel electrophoresis) นี้ในการบ่งชี้ความแตกต่างของ strain จากนั้น Polacheck และคณะ (1992) ปรับปรุงหลักการใช้ repetitive DNA sequences ที่ใช้ในการวินิจฉัยและแยกพิเคราะห์เชื้อและศึกษาระบาดวิทยาใน *Candida albicans* มาพัฒนาการศึกษา DNA fingerprint ในเชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในอเมริกาและประเทศแอฟริกา โดยใช้ specific probes CND1.4 (specific กับ serotype A, D) และ CND1.7 (*C. neoformans* specific probe) hybridize กับ restriction fragment length polymorphic (RFLP) DNA จากการทดลองพบว่า สามารถแยก serotype A, D จาก B, C ได้ (หรือแยก variety ได้) ต่อมามีการปรับปรุงใช้ probe ชนิดอื่นที่เป็น repetitive sequence เช่น CNRE-1, UT-4p เป็นต้น ด้วยข้อจำกัดของการศึกษา karyotype ที่ต้องเตรียม DNA อย่างมีนวล และระวังไม่ให้เกิดการแตกหักของ chromosome และต้องใช้เวลานานเช่นเดียวกับ Southern hybridization Vilgalys และคณะ (1990) อาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ในขบวนการนี้เวลาที่ใช้ในการทดลองน้อยกว่าและมีความไวจำเพาะสูงกว่าวิธีที่กล่าวข้างต้น primers ที่ใช้ คือ SR1-R, 5.8S, 5.8s-R, LR-1, LR-3, LR-5, LR-6, LR-7, LR7-R และ LR-12 ผลปรากฏว่าสามารถแยก serotype ได้และเป็นประโยชน์ในการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้ออีกด้วย นอกจากนี้ primers ข้างต้นที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนใน PCR แล้ว ยังมี primers อื่นอีก เช่น ITS1, ITS4, CN4, CN5, CN6 เป็นต้น การทดลอง PCR ที่กล่าวข้างต้นนี้ต้องอาศัย primers เป็นคู่ (sense, antisense) ในการเพิ่มจำนวน DNA sequence ที่สนใจ โดย Meyer และคณะ (1993) พัฒนาการศึกษา DNA fingerprint ด้วย PCR และ random amplification of polymorphic DNA (RAPD) อาศัย oligonucleotide primer เพียง 1 ชนิด ซึ่งปรับปรุงมาจาก oligonucleotide probe ชนิดของ primer ที่ใช้มีคุณสมบัติเป็น minisatellite กระจายอยู่ใน genome ของเชื้อ และสามารถเพิ่มจำนวน DNA ในช่วง hypervariable ได้ การทดสอบด้วย single primer ให้ผลที่แน่นอนเมื่อ

ทดลองซ้ำ (reproducibility) และมีความจำเพาะสูงเช่นกัน single primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาและสามารถในการศึกษาระบาดวิทยาได้โดยรายงานของ Meyer และคณะ (1993) นี้ และ Sorrell และคณะ (1996) คือ phage M-13 core sequence (GAGGGTGGXGGXTCT) ซึ่งผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยชุดหลังทำให้ได้ข้อมูลทางระบาดวิทยาในทวีปออสเตรเลียว่า *C.neoformans* var.*gattii* (*C. bacillisporus*) ที่แยกได้จากผู้ป่วยเป็นโรค cryptococcosis มีรูปแบบ PCR fingerprint และ RAPD pattern คล้ายกับ *C.neoformans* var.*gattii* ที่แยกได้จากต้นยูคาลิปตัสและยังพบว่าเชื้อที่แยกได้จากอุจจาระหมีโคลามีสัญลักษณ์ genotype เช่นเดียวกับเชื้อที่แยกได้จากต้นยูคาลิปตัสที่มีนั้นใช้เป็นอาหาร

วิธีการทดลอง

1. กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ผู้ป่วยที่เป็นโรค cryptococcosis และแยกได้เชื้อ *Cryptococcus neoformans* ทุกรายที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วง 24 เดือน
2. แยกวิเคราะห์เชื้อที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ ด้วยวิธีต่อไปนี้
 - a. แยกวิเคราะห์เชื้อที่ได้ด้วย API Kit
 - b. พิสูจน์ยืนยัน species *neoformans* ด้วยอาศัย urease test, phenoloxidase test โดย species นี้ให้ผล urease test positive และให้ brown pigment เมื่อทดสอบด้วย phenoloxidase test
 - c. ศึกษา variety ด้วย canavanine-glycine medium (CGB-medium)
 - d. ศึกษา serotype ด้วยน้ำยา CryptoCheck kit (Iatron, Tokyo, Japan) (อภินิทนาการจาก Dr. T. Kanbe, Nagoya University School of Medicine, Japan)
 - e. เก็บเชื้อทั้งหมดไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส
3. รวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่พบเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากบันทึกประวัติผู้ป่วยว่าอยู่ในสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือไม่ อย่างไร บันทึกอาการและอาการแสดงของผู้ป่วย บันทึกการตรวจพบว่าเป็นการติดเชื้อใหม่ (reinfection) หรือไม่ อาการข้างเคียงอื่นๆและการรักษา
4. ศึกษา PCR fingerprint ของเชื้อทั้ง 2 varieties ด้วยอาศัย single primer

a. DNA isolation : ล้าง *Cryptococcus neoformans* (stationary phase) ด้วย buffer [20 mM Sodium citrate (pH 5.8) in 1 M Sorbitol] 3 ครั้ง จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยไนโตรเจนเหลว และใส่ lysis buffer [50mM Tris HCl (pH 7.2), 50 mM EDTA, 3% sodium dodecyl sulfate, 1% β -mercaptoethanol] บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำมา centrifuge และแยกชั้น DNA ด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (1:24:1) ขั้นสุดท้าย centrifuge และแยกตะกอน DNA หลังจากตกตะกอนด้วย 3M sodium acetate (0.2 เท่าโดยปริมาตร) และ isopropanol (0.5 เท่าโดยปริมาตร) ล้างตะกอนด้วยอัลกอฮอล์บริสุทธิ์ เมื่อนำมาศึกษา PCR fingerprint ให้ละลายด้วย TE buffer [10mM Tris HCl (pH 8.0), 1mM EDTA]

b. PCR fingerprint ด้วย

- primer ที่ใช้คือ minisatellite – specific core sequence ของ phage M13

(5' GAGGGTGGCGGTTCT 3')

- เตรียมปฏิกิริยาสำหรับ PCR (total volume 50 μ l)

DNA	25 ng
Tris HCl (pH 8.0)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Magnesium acetate	3 mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0.2 mM (each)
primer	30 ng
Amplitaq	2.5 U

- Condition อาศัย thermal cycler ด้วย condition ดังนี้

Denature 93°C	เป็นเวลา 20 วินาที
Annealing 50°C	เป็นเวลา 30 วินาที
Extension 72°C	เป็นเวลา 20 วินาที

ดำเนินการทั้ง 3 conditions 35 รอบ

ทำการวิเคราะห์ DNA product ที่ได้ด้วย electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide โดยเปรียบเทียบกับ standard marker และบันทึกเก็บด้วยการถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต

(อนึ่งเพื่อการตรวจสอบ reproducibility ของการทดลอง จะมีการสุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบซ้ำด้วย)

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. ความชุกของโรค cryptococcosis

เชื้อ *C. neoformans* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในหน่วยเชื้อรา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือนสิงหาคม 2540 ถึงเดือนกรกฎาคม 2541 มีจำนวนทั้งสิ้น 343 สายพันธุ์ ระหว่างเดือนสิงหาคม 2541 ถึงเดือนกรกฎาคม 2542 มีจำนวนทั้งสิ้น 295 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) รวมเป็น 638 สายพันธุ์ ชนิดสิ่งส่งตรวจโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำไขสันหลัง (cerebrospinal fluid, CSF) คิดเป็นร้อยละ 97 นอกเหนือจากนั้นเป็น hemoculture, sputum, tissue biopsy, bone marrow, pus, ascitic fluid คิดเป็นร้อยละ 3 จากประวัติผู้ป่วยในใบส่งตรวจ มีการระบุว่าเป็นสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี จำนวน 322 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 50.5 และจากผู้ป่วยที่เป็นโรคอื่น ซึ่งระบุไว้เพียงโรคเดียวเท่านั้น คือ Systemic Lupus Erythematosus (SLE) มีจำนวนทั้งสิ้น 16 สิ่งส่งตรวจ หรือ ร้อยละ 2.5 เมื่อตรวจสอบแล้ว ปรากฏว่า สิ่งส่งตรวจจำนวน 16 สิ่งส่งตรวจ นั้นเป็นจำนวนที่ได้จากการส่งตรวจมากกว่า 1 ครั้งจากผู้ป่วยจำนวน 4 ราย และที่ไม่ได้ระบุ underlying diseases ไว้อีก 299 ครั้งคิดเป็นร้อยละ 47 จำนวนที่ไม่ได้ระบุชนิดโรคนี้อาจเป็นส่วนเป็นสิ่งส่งตรวจที่ได้รับจากแหล่งอื่น ๆ ที่ไม่สามารถตามข้อมูลได้ อนึ่งจำนวนสิ่งส่งตรวจในตารางที่ 1 ที่แสดงไว้เป็นจำนวนครั้งของสิ่งส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเชื้อราได้รับทั้งหมด จำนวนนี้ไม่สามารถใช้แทนจำนวนผู้ป่วยที่เป็น cryptococcosis ได้ เนื่องจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยบางคน แพทย์ผู้ทำการรักษานำส่งมากกว่าหนึ่งครั้งและบ้างก็นำส่งมากกว่าหนึ่งชนิด นอกจากนี้ผู้ป่วยบางคนเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลมากกว่าหนึ่งครั้งโดยระยะเวลาห่างของการเข้ารับการรักษานานประมาณ 1-4 เดือน โดยประมาณการแล้วจำนวนซ้ำจะประมาณร้อยละ 25 ดังนั้นคาดว่าจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรค cryptococcosis จริงด้วยการเพาะเชื้อและพิสูจน์เชื้อแล้วจะมีประมาณ 480 คน จากรายงานโดย Sukroongreung S. และคณะ (1996) ว่า ระหว่างเดือนมกราคม 1993 – เดือนมีนาคม 1995 แยกเชื้อ *C. neoformans* ได้ 157 strains เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานโดย Steenbergen และ Casadevall (2000) ว่าพบ *C. neoformans* จำนวน 40 strains ที่แยกได้จากผู้ป่วย cryptococcal meningitis

ระหว่างปี 1991 – 1999 ในโรงพยาบาลสองแห่งใน New York city สหรัฐอเมริกา จะเห็นว่าบ้านเรามีจำนวนผู้ป่วยเป็นโรค cryptococcosis มาก

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อ ชนิดสิ่งส่งตรวจ และ underlying diseases ของผู้ป่วยเป็นโรค cryptococcosis ระหว่างเดือนสิงหาคม 2540 ถึง เดือนกรกฎาคม 2542

	จำนวนสิ่งส่งตรวจ*	ชนิดสิ่งส่งตรวจ		Underlying disease		
		CSF	non-CSF	HIV	non-HIV	ND
สค.40 – มค.41	174	169	5	82	3**	89
กพ.41 – กค.41	169	167	2	96	2***	71
สค.41 – มค.42	152	146	6	65	11****	75
กพ.42 – กค.42	143	138	5	79	-	64
Total	638					

หมายเหตุ * เป็นจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด; ** ข้อมูลจากผู้ป่วยรายเดียวกัน

*** ข้อมูลจากผู้ป่วยสองราย; **** ข้อมูลจากผู้ป่วยสองราย

CSF หมายถึง cerebrospinal fluid

non-CSF หมายถึง hemoculture, sputum, tissue biopsy, bone marrow, pus, ascitic fluid

non-HIV เป็นโรคอื่นที่ไม่ใช่การติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี

ND (no data) – ไม่สามารถหาข้อมูลได้

2. Phenotypic Identification

หลังจากนำเชื้อ yeast ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจทั้งหมดจำนวน 638 strains มาแยกวิเคราะห์และยืนยันว่าเป็นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ด้วย

1. India-ink preparation เพื่อตรวจสอบ capsule ปรากฏว่าเชื้อทั้งหมดมี capsule



Figure 1 India-ink preparation แสดงลักษณะจุลสังฐานของ *Cryptococcus neoformans*

2. Urease test ผลปรากฏว่า เชื้อทั้ง 638 strains ให้ผลบวก ซึ่งอาจเป็น genus *Cryptococcus* หรือ *Trichosporon*
3. Commercial kit – API 20C AUX (bioM'erieux, France) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการใช้น้ำตาล ผลการทดสอบทั้ง 638 strains ปรากฏว่า ทุก strain เป็น genus *Cryptococcus* และ species *neoformans*
4. Melanin pigment formation เพื่อตรวจสอบการทำงานของ enzyme phenoloxidase บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี caffeic acid เป็น substrate หากมี enzyme นี้ สีโคโลนีจะเป็นสีน้ำตาลของ melanin pigment ผลการทดสอบ ปรากฏว่า สีโคโลนีของทุก strain เป็นสีน้ำตาล แสดงว่าทุก strain มี enzyme phenoloxidase และสามารถสร้าง melanin pigment ได้

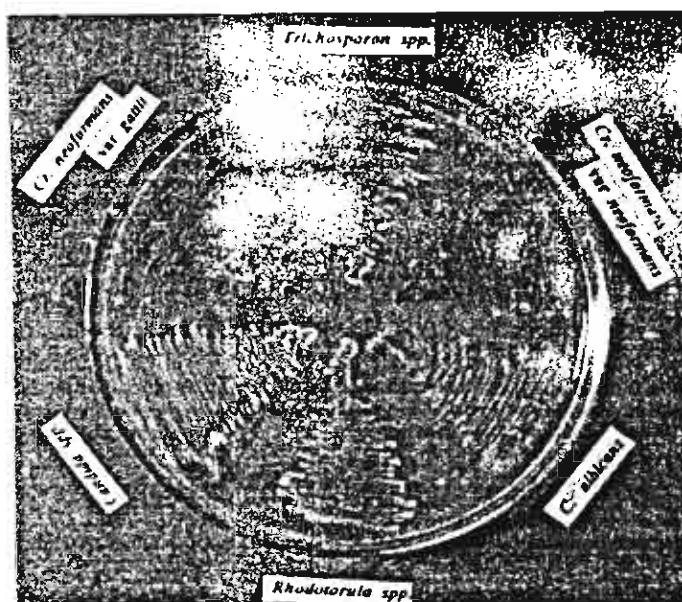


Figure 2 Melanin pigment formation of the medical important yeasts

จากผลการทดลองที่กล่าวข้างต้นนั้นเป็นการศึกษา phenotype โดยการจัดจำแนกเชื้อ (identification) และยืนยัน (confirmation) ในระดับ genus และ species ว่าเชื้อทั้ง 638 strains เป็นเชื้อ *Cryptococcus neoformans* แต่ยังไม่สามารถจำแนกเป็น variety และ serotype ได้ จึงได้ทำการทดลองขั้นตอนต่อไป เพื่อหา variety ด้วย canavanine-glycine medium (CGB-

medium) และหา serotype ด้วย CryptoCheck kit (Iatron, Tokyo, Japan) ปรากฏว่า เชื้อทั้งหมดเป็น variety *neoformans*, และ serotype A หรือปัจจุบัน เรียกเป็น *Cryptococcus grubii*

3. Genotypic Identification

ศึกษา genotype ของเชื้อที่ส่งมาจำนวน 140 strains โดยศึกษารูปแบบ PCR-RAPD โดย single primer M13 โดยเปรียบเทียบกับรูปแบบ PCR-RAPD ของ standard genotype 8 types จากรายงานของ Meyer และคณะ (1999) การทดลองนี้มีการทดลองซ้ำทุกขั้นตอนอย่างน้อย 2 – 3 ครั้งในเชื้อ strain เดียวกันเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง ผลการทดลองซ้ำนี้พบว่า PCR-RAPD ของเชื้อให้ผลคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง

ผลการศึกษารูปแบบ PCR-RAPD พบว่า

1. รูปแบบของเชื้อแต่ละ strain จำนวน 140 strains นี้ มี 3 รูปแบบ คือ มีรูปแบบเช่นเดียวกับรูปแบบ VNI (*C. grubii* type 1) (Figure 3) ที่รายงานโดย Meyer และคณะ (1999) และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Meyer และคณะ (1999) ที่รายงานว่า เชื้อจากประเทศไทยมีรูปแบบ VNI (Figure 3: lane 1-3, 5-7, 9-11) และอีก 2 รูปแบบที่ต่างจากรูปแบบ VNI 2-3 bands (Figure 3: lane 4, 8) มีจำนวน 4 strains และ 1 strain โดยแบบแรกพบประมาณ 96.5% หรือ 135 strains
2. รูปแบบของเชื้อจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอช ไอ วี ในรายเดียวกันแต่ต่าง episode (2-3 episode) จำนวน 5 รายนั้น มีรูปแบบไม่ต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อจากผู้ป่วยต่างรายกัน พบว่ารูปแบบของเชื้อจากผู้ป่วย 1 ราย แตกต่างจากรูปแบบของเชื้อจากผู้ป่วยรายอื่น (Figure 4) เชื้อจำนวน 3 ที่แยกได้จากผู้ป่วยรายนี้มาจากสิ่งส่งตรวจชนิดเดียวกัน คือ น้ำไขสันหลัง แต่ต่างเวลาใน episode เดียวกัน และต่าง episode กัน
3. รูปแบบของเชื้อแต่ละ strain ที่แยกจากผู้ป่วย non-HIV รายเดียวกัน ทั้งในและต่าง episode จำนวน 3 ราย มีรูปแบบ PCR-RAPD เหมือนกัน 2 ราย แต่อีก 1 รายนั้นมีความแตกต่างกันใน episode เดียวกัน 1 strain ซึ่งแยกได้จากผู้ส่งตรวจชนิดเดียวกัน คือ น้ำไขสันหลัง แต่ในเวลาห่างกัน 12 วัน (B ใน Figure 5)
4. ไม่พบรูปแบบที่แตกต่างกันในสิ่งส่งตรวจที่ต่างกันในรายเดียวกันทั้งในกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี และ ไม่ติดเชื้อไวรัสเอช ไอ วี

นอกจากนี้ได้สุ่มเชื้อ 2-3 โคโลนีจาก original isolated plate จำนวน 5 ราย โดยเลือกจากความเข้มของ melanin pigment ที่ต่างกันหลังจากบ่มนาน 5 - 6 วัน พบว่า รูปแบบของโคโลนีจากผู้ป่วยรายเดียวกันมีรูปแบบที่เหมือนกัน

จากการ molecular typing ของเชื้อจำนวน 140 strains พบว่า มี 2 รูปแบบ โดย 96.5 % มีรูปแบบเช่นเดียวกับ genotype VNI ที่รายงานโดย Meyer และคณะ (1999) และอีก 3.5% มีรูปแบบที่แตกต่างไปจาก genotype VNI เล็กน้อย แสดงว่า มีความหลากหลายของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* ในผู้ป่วยรายเดียวกันและต่างรายกันโดยความหลากหลายนั้นมีน้อย และยังพบว่า วิธี PCR-RAPD นี้ยังสามารถแยกความหลากหลายของเชื้อใน episode ที่ต่างกัน และ episode ที่ต่างกัน

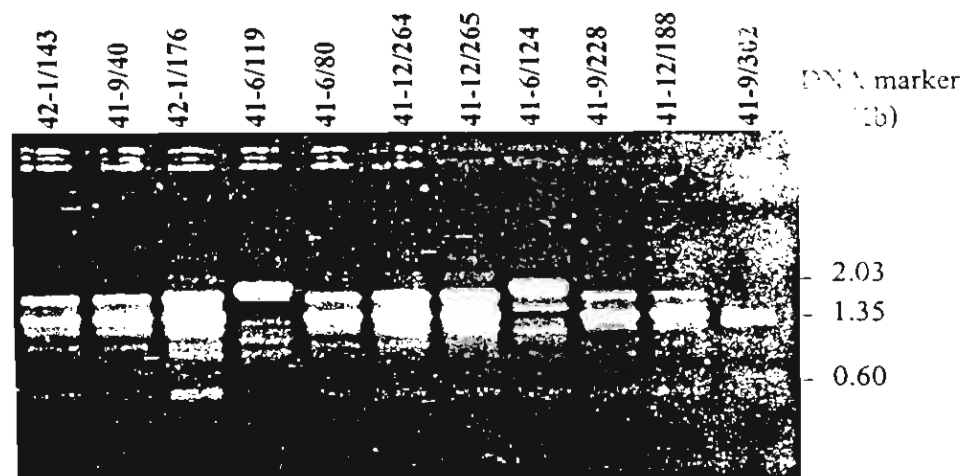


Figure 3 RAPD pattern using M13 primer of 11 individual clinical *C. neoformans* after ethidium bromide staining on 0.8% agarose. The numbers on the top represented each individual isolate. (Kb = kilobase)

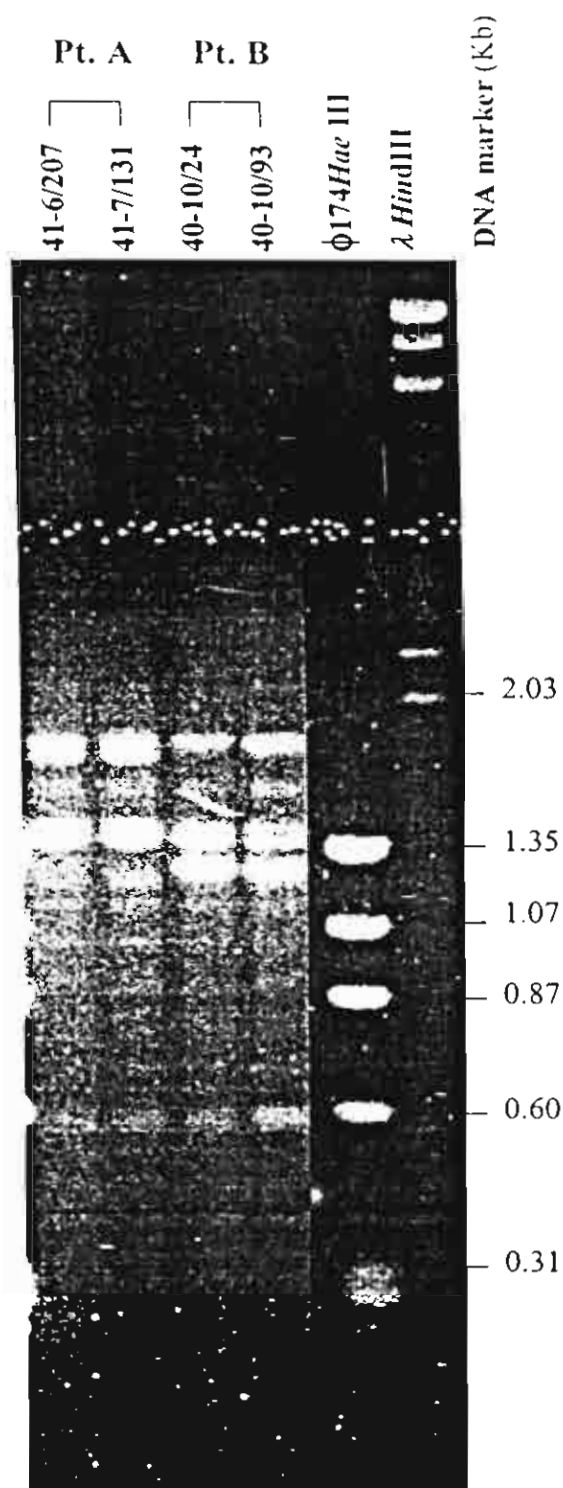
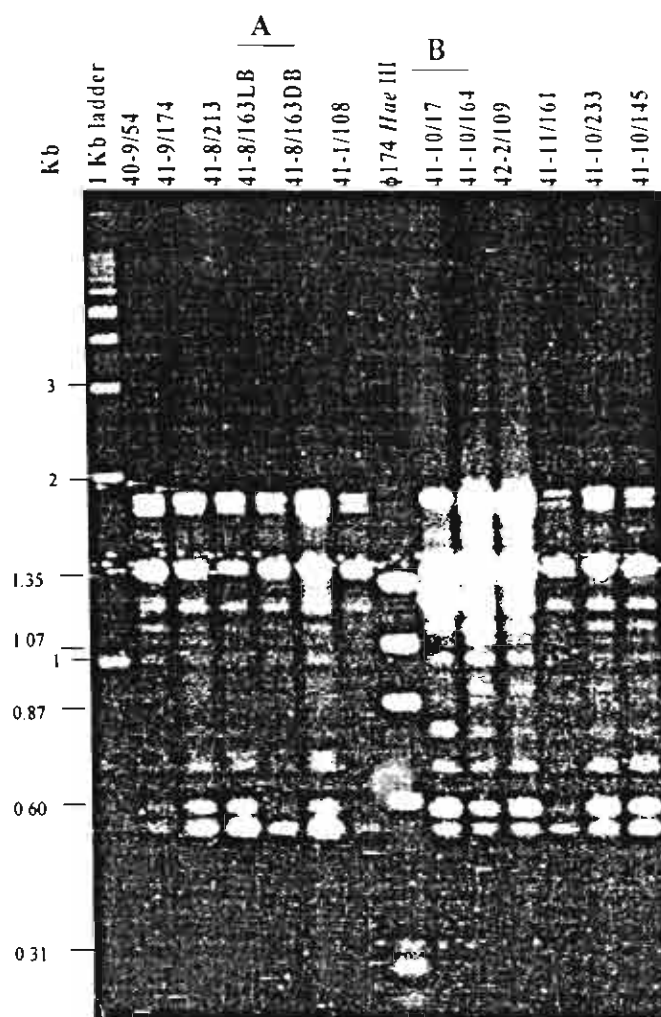


Figure 4 RAPD profiles using M13 single primer of *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype A. The numbers on the top represented each individual isolate. Two isolates from each patient (Patient A, Patient B) collected from different period during course of infection showed the same pattern. The profiles between these two patients were distinguished. Two standard DNA, λ *HindIII* & ϕ 174 *Hae III* were used as size markers. These RAPD products were separated on 1.5% agarose. (Kb = kilobase)

Figure 5 RAPD profiles using M13 single primer of *C. neoformans* var. *neoformans*, serotype A on 1.5 % agarose. The numbers on the top represented each individual isolate. "A" represented profiles of two isolates from the same specimens. "B" represented distinguished profiles from the same patient. These isolates collected from different period during course of illness. DNA size marker of 1 Kb ladder and ϕ 174Hae III were used. (Kb = kilobase)



ข้อเสนอแนะที่ควรทำต่อ

1. ควรยืนยัน genotype ที่หลากหลายนี้โดยใช้ primer อื่น หรือ เทคนิคอื่น
2. ควรติดตามข้อมูลของผู้ป่วยเพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะเชื้อที่ต่างกัน
3. ควรศึกษาระดับความไวของเชื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อรา

References

1. Chindamporn A., Nakagawa Y., Homma H., Chibana H., Doi M., and Tanaka K. Analysis of the Chromosomal Localization of the Repetitive Sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology* 1995; 141: 469-476.
2. Ellis HD. *Cryptococcus neoformans* var. *gatti* in Australia. *J Clin Microbiol* 1987; 25:430-431.
3. Franzot SP., Salkin IF., and Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 838–840.
4. Huffnagle KE., and Gander RM. Evaluation of Gen-probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* Accu Probes. *J Clin Microbiol* 1993; 31:419-421.
5. Kiska DI., Orkiszewski DR., Howell D., and Guilligan PH. Evaluation of New Monoclonal Antibody-based Latex Agglutination Kit for Detection of Cryptococcal Polysaccharide Antigen in Serum and Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2309-2311.
6. Kwon-Chung KJ., Polacheck I., and Bennett JE. Improved Diagnostic Medium for Separation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15:535-537.
7. Kwon-Chung KJ., Wickes BL., Stockman L., Roberts GD., Ellis D and Howard DH. Virulence, serotype, and Molecular Characteristics of Environmental Strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect Immune* 1992; 60: 1869-1874.
8. Malik R., Alderton B., Finlaison D., Krockenberger MB., Karaoglu H., Meyer W., Martin P., France ML., McGill J., Lester Sj., O'Brien CR., and Love DN. Cryptococcosis in Ferrets: A Diverse Spectrum of Clinical Disease. *Aust Vet J* 2002; 80:1-7
9. Meyer W., Mitchell TG., Freedman EZ., and Vilgalys R. Hybridization Probes for Conventional DNA Fingerprinting Used as Single Primers in the Polymerase Chain Reaction to Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2274-2280.

10. Mitchell TG., Freedman EZ., White TJ., and Taylor JW. Unique Oligonucleotide Primers in PCR for Identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:253-255.
11. Perfect JR., Magee BB., and Magee PT. Separation of *Cryptococcus neoformans* by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Infect Immune* 1989a; 57: 2624-2627.
12. Polacheck I., Lebens G., and Hicks JB. Development of DNA Probes for Early Diagnosis and Epidemiological Study of Cryptococcosis in AIDS Patients. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 925-930.
13. Rippon JW. Medical Mycology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes. Philadelphia: WB Saunders 1982: 542 – 558.
14. Saag SM. Editorial Response. Clinical and Host Differences between Infection with Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 35-36.
15. Satitnimankarn T., Na Nakorn S., Rigunti M. Cryptococcosis, Report of the First Case in Thailand. *J Med Assoc Thai* 1960; 43:787-790.
16. Sorrell TC., Chen SCA., Ruma P., Meyer W., Pfeiffer TJ., Ellis HD., and Brownlee AG. Concordance of Clinical and Environmental Isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis and PCR Fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1253-1260.
17. Speed B., and Dunt D. Clinical and Host Differences between Infection with Two Varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 28-34.
18. Spitzer ED., and Spitzer SG. Use of a Dispersed and Repetitive DNA Element to Distinguish Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1094-1097.
19. Sukroongreung S., Nilakul C., Ruangsomboon O., Chuakul W., and Eampokalap B. Serotypes of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Patients Prior to and During the AIDS Era in Thailand. *Mycopathologia* 1996; 135: 75-78
20. Varma A., and Kwon-Chung KJ. DNA Probe for Strain Typing of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2960-2967.
21. Vilgalys R., and Hester M. Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol* 1990; 172:4238-4246.